

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y Tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

**4G03A Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Micropropagación y estudios citogenéticos de piña miel (*Ananas comosus*)
realizados en el CIATEJ**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología. Ramón Efrén Espinoza Sosa

Profesor PAP: Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez

Tlaquepaque, Jalisco, mayo de 2023

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	4
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional.....	4
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto	7
1.2 Caracterización de la organización.....	8
1.3 Identificación de la(s) problemática(s).....	11
1.4. Planeación de alternativa(s).....	12
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora	15
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos	67
1.7. Bibliografía y otros recursos	69
1.8. Anexos generales.....	72
2. Productos	72
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia.....	73
3.1 Sensibilización ante las realidades	73
3.2 Aprendizajes logrados	74

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son experiencias socio-profesionales de los alumnos que desde el currículo de su formación universitaria- enfrentan retos, resuelven problemas o innovan una necesidad sociotécnica del entorno, en vinculación (colaboración) (co-participación) con grupos, instituciones, organizaciones o comunidades, en escenarios reales donde comparten saberes.

El PAP, como espacio curricular de formación vinculada, ha logrado integrar el Servicio Social (acorde con las Orientaciones Fundamentales del ITESO), los requisitos de dar cuenta de los saberes y del saber aplicar los mismos al culminar la formación profesional (Opción Terminal), mediante la realización de proyectos profesionales de cara a las necesidades y retos del entorno (Aplicación Profesional).

El PAP es un proceso acotado en el tiempo en que los estudiantes, los beneficiarios externos y los profesores se asocian colaborativamente y en red, en un proyecto, e incursionan en un mundo social, como actores que enfrentan verdaderos problemas y desafíos traducibles en demandas pertinentes y socialmente relevantes. Frente a éstas transfieren experiencia de sus saberes profesionales y demuestran que saben hacer, innovar, co-crear o transformar en distintos campos sociales.

El PAP trata de sembrar en los estudiantes una disposición permanente de encargarse de la realidad con una actitud comprometida y ética frente a las disimetrías sociales. En otras palabras, se trata del reto de “saber y aprender a transformar”.

El Reporte PAP consta de tres componentes:

El primer componente refiere al ciclo participativo del PAP, en donde se documentan las diferentes fases del proyecto y las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo de este y la valoración de las incidencias en el entorno.

El segundo componente presenta los productos elaborados de acuerdo con su tipología.

El tercer componente es la reflexión crítica y ética de la experiencia, el reconocimiento de las competencias y los aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

El PAP “Micropropagación y estudios citogenéticos de piña miel (*Ananas comosus*) realizados en el CIATEJ” pertenece al Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos. En el presente trabajo se abordaron problemáticas del cultivo de *A. comosus* en Jalisco. El objetivo general fue micropropagar y caracterizar citogenéticamente la variedad cultivada en Tomatlán para impulsar la producción agrícola. Los objetivos específicos fueron: establecer *in vitro* explantes, realizar la multiplicación *in vitro* por organogénesis y por proliferación de yemas axilares, llevar a cabo el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro*, adaptar a condiciones *ex vitro*, determinar el número cromosómico de la variedad, realizar hibridación *in situ* con genes de ADN ribosomal, y obtener el cariotipo e idiograma.

Se llevó a cabo el establecimiento *in vitro* de yemas axilares provenientes tanto de plantas adultas como de plántulas *in vitro*, así como la multiplicación de secciones proximales de hoja obtenidas de plántulas *in vitro* a través de organogénesis según un diseño experimental de nueve tratamientos. Se realizó citogenética tradicional conforme a la literatura.

La contaminación de explantes provenientes de plantas *ex vitro* permitió concluir que se necesitan nuevos protocolos de desinfección. Se encontró que la metodología de establecimiento de yemas es óptima y que la mejor formulación para la organogénesis consiste en 3.0 mg/L de BAP y 1.0-1.5 mg/L de ANA, la cual genera rizogénesis indirecta. Se halló una relación benéfica entre la presencia de microalgas y la morfogénesis. Se descubrió que la variedad de *A. comosus* posee un número cromosómico $2n = 50$.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

El PAP es una experiencia de aprendizaje y de contribución social integrada por estudiantes, profesores, actores sociales y responsables de las organizaciones, que de manera colaborativa construyen sus conocimientos para dar respuestas a problemáticas de un contexto específico y en un tiempo delimitado. Por tanto, la experiencia PAP supone un proceso en lógica de proyecto, así como de un estilo de trabajo participativo y recíproco entre los involucrados.

El presente PAP es de tipo experimental y se llevó a cabo en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ), que pertenece al Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), específicamente se halla integrado a la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación [1]. Fue fundado el 24 de agosto de 1976 [2] y su sede está en la ciudad de Guadalajara Jalisco, a la vez que cuenta con tres subsedes en las ciudades de Zapopan Jalisco (donde se realizó el presente trabajo), Apodaca, Nuevo León y Mérida, Yucatán. Su labor consiste en investigación, desarrollo tecnológico e innovación, así como en la oferta de servicios tecnológicos y en la formación de recursos humanos mediante programas de posgrado, educación continua e iniciación a la investigación. Todo esto lo hace a través de sus cinco líneas de investigación: biotecnología industrial, biotecnología vegetal, biotecnología médica y farmacéutica, tecnología alimentaria y tecnología ambiental; y de su capital humano conformado por 166 especialistas: 88 doctores en ciencias, 21 maestros en ciencias y 57 ingenieros, tecnólogos y técnicos [1].

En la unidad de biotecnología vegetal se busca atender a los sectores agrícola, agropecuario y agroindustrial al mejorar propiedades de variedades de plantas en función de los intereses agrícolas y de ornamentación. Para ello se cuenta con un equipo de 19 científicos y con cuatro sublíneas de investigación: micropropagación de especies vegetales, fitopatología, mejoramiento genético vegetal y fitoquímica y biocompuestos [3].

El objetivo general del presente trabajo es micropropagar y caracterizar citogenéticamente piña miel (*Ananas comosus*). Para lograrlo se tiene una serie de objetivos específicos:

- Establecer *in vitro* explantes de piña miel.
- Realizar la multiplicación *in vitro* por organogénesis y por proliferación de yemas axilares.
- Llevar a cabo el enraizamiento *in vitro* y *ex vitro* de las plántulas obtenidas.
- Adaptar a condiciones *ex vitro* las plántulas enraizadas.
- Determinar el número cromosómico de las plantas de piña.
- Realizar hibridación *in situ* con genes de ADN ribosomal.

- Obtener el cariotipo y el idiograma correspondientes.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

La piña miel (*A. comosus*) es un cultivo subtropical de climas cálidos y húmedos, lo que conduce a que su producción se lleve a cabo principalmente entre las latitudes 30° N y S. Por consiguiente, el trópico mexicano posee características agroecológicas aptas para este cultivo. De esta manera, catorce estados de México fueron productores de esta fruta en el año 2019, observándose la mayor actividad (80% de la producción) en la región del Bajo Papaloapan, que abarca municipios de Veracruz y Oaxaca [4].

No obstante, además de estas dos entidades, otras presentan rendimientos superiores a la media nacional, que en los cinco años anteriores al 2020 fue de 46.2 toneladas por hectárea. Entre dichos estados se hallan Colima, Quintana Roo y Jalisco [4]. Éste último produjo 35 mil toneladas en el año 2020, lo que lo posicionó como el quinto productor a nivel nacional. Específicamente, el municipio de Tomatlán ocupa el décimo lugar nacional en cuanto a producción de esta fruta se refiere con un rendimiento medio de 65 toneladas por hectárea [5].

Sin embargo, el estado de Jalisco se enfrenta a un reto en cuanto al cultivo de la piña, puesto que los hijuelos, o sea, el material vegetativo se compra a los productores del sureste mexicano, lo que acarrea un gasto de flete [5]. Este problema es de considerable relevancia si se toma en cuenta la tendencia mundial en el aumento del consumo de la fruta, lo que implica la expansión del cultivo [4].

Ante esto, la propagación vegetativa o micropropagación de la piña se está planteando como una alternativa en el estado de Jalisco. Esta tecnología ya se ha abierto camino en México desde hace años, a tal punto que casi todas las universidades estatales disponen de laboratorios de cultivo de tejidos vegetales. Además, existen otros laboratorios que son de naturaleza privada o pública, o bien, pertenecen a centros de investigación [6]. En cuanto a la piña jalisciense, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural (SADER) del estado ya creó un laboratorio de este tipo en Tomatlán [5]. De la mano de la propagación masiva, esta clase de infraestructura puede traer otros beneficios del cultivo *in vitro* como la mejora genética vegetal, dado que las técnicas de este campo son hoy en día una herramienta insustituible cuando de este fin se trata [7].

Es así como nace el proyecto al cual pertenece el presente Proyecto de Aplicación Profesional (PAP). Tras un convenio entre el CIATEJ y la SADER, Jalisco dio inicio la creación de protocolos para micropropagar la piña miel cultivada en el municipio de Tomatlán y así hacer frente a la pequeña cantidad de hijuelos que se generan naturalmente en las plantas, a la vez que se busca atacar el problema de la característica clónica de las plantas generadas por este método a través del desarrollo de una estrategia de mejoramiento genético. Para lograr dicho mejoramiento es necesario determinar el número cromosómico de la variedad en cuestión, hecho que también posibilitaría el conocimiento y estudio de genes específicos. Todo esto con el propósito de impulsar a los productores de piña de Tomatlán y, consecuentemente, el desarrollo económico del estado.

1.2 Caracterización de la organización

La subsede Zapopan del CIATEJ se ubica en la calle Camino Arenero #1227, El Bajío (figura 1) y alberga la infraestructura de tres unidades: Biotecnología industrial, Biotecnología vegetal y Tecnología alimentaria. Sus objetivos son brindar servicios de innovación y desarrollo tecnológico a los sectores agrícola y agroindustrial y formar recursos humanos. Del personal científico y tecnológico del CIATEJ, 53 investigadores laboran en Zapopan. En esta subsede se desarrollan cadenas de valor en torno al agave, a los biocombustibles, a los lácteos, a los cárnicos, a las plantas ornamentales, al frijol y a la denominación de origen del chile Yahualica. Por otro lado, ha generado proyectos como un destilador en continuo de

cítricos, el Banco de Alimentos de Tepatlán y proteínas microbianas a partir de residuos. La directora de la subsede es la Dra. Anne Christine Gschaedler Mathis, perteneciente a la línea de investigación de biotecnología industrial [8].

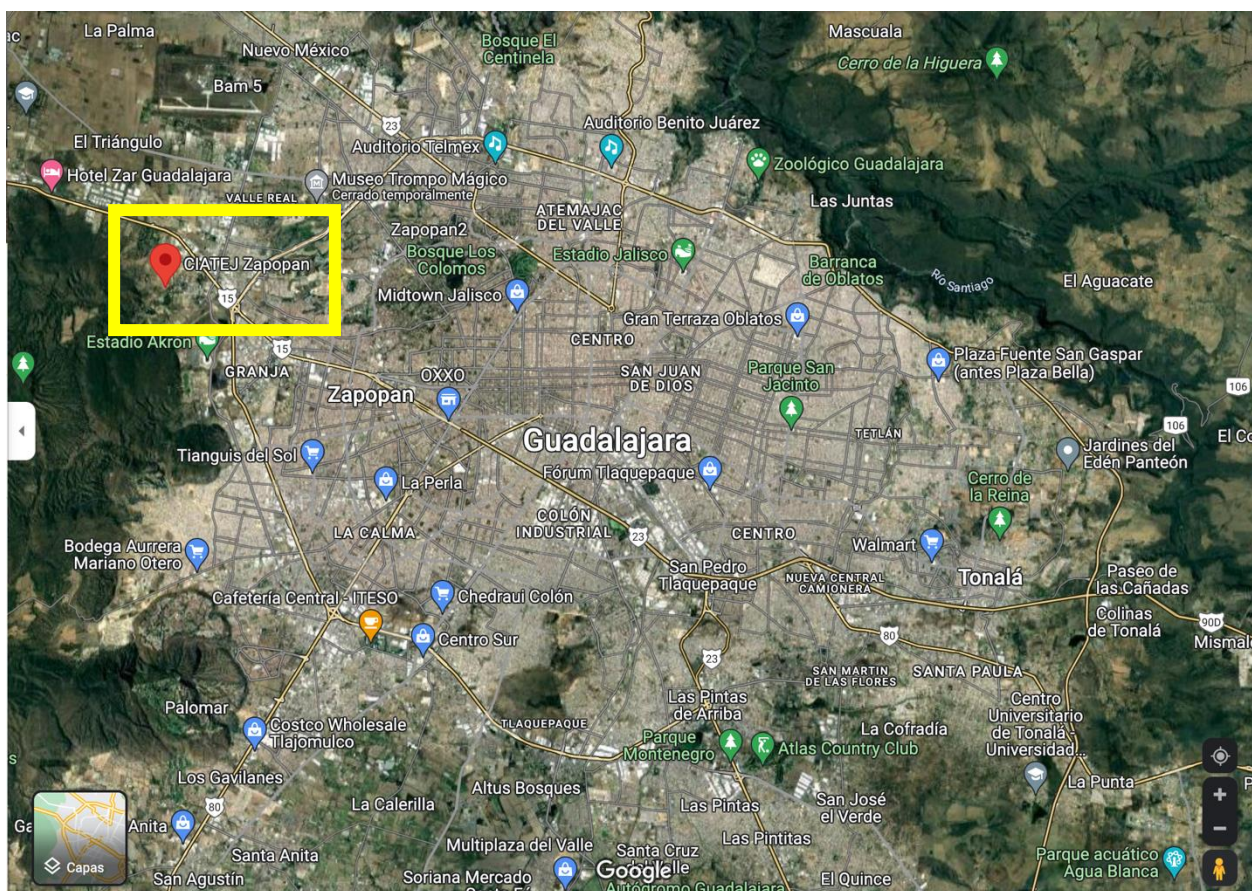


Figura 1. Ubicación del CIATEJ subsede Zapopan en el área metropolitana de Guadalajara [9].

En la unidad de Biotecnología vegetal lo que se busca es lograr la obtención de nuevos productos con características novedosas a partir de plantas e incrementar su productividad, volumen y resistencia a factores como patógenos y condiciones ambientales. Algunos de los proyectos que se trabajan en sus sublíneas de investigación se muestran en la tabla 1. La directora de la unidad es la Dra. Antonia Gutiérrez Mora, quien forma parte de las sublíneas de micropropagación y de mejoramiento genético. El investigador responsable del presente PAP es el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez, que igualmente es miembro de las sublíneas anteriores [3].

Tabla 1. Proyectos de las sublíneas de investigación que conforman la unidad de Biotecnología vegetal.

Sublínea de investigación	Proyectos
Micropropagación de especies vegetales	<ul style="list-style-type: none"> • Comportamiento de la formación de tres genotipos de la planta "Anturio" • Recuperación de la especie <i>Agave victoria-reginae</i> Moore • Micropropagación e identificación molecular de papayas resistentes al virus de la mancha anular
Fitopatología	<ul style="list-style-type: none"> • Axihuitl para control de enfermedades de nardo y cultivos ornamentales • Efectividad biológica de extractos de cempoalxóchitl • Aislamiento de hongos benéficos asociados a la rizósfera de <i>Agave tequilana</i> Weber var. Azul
Mejoramiento genético vegetal	<ul style="list-style-type: none"> • Cambios morfológicos, actividad bioquímica y molecular durante la transición floral en el género <i>Polianthes</i> • Regulación de la expresión de las fructosiltransferasas (FT) de la Dalia • Evaluación de nuevas líneas genéticas de papaya tolerantes al virus de la mancha anular
Fitoquímica y biocompuestos	<ul style="list-style-type: none"> • Agentes antifúngicos provenientes de plantas para el control de <i>Sphaceloma perseae</i> Jenkins en aguacate • Factibilidad técnica y comercial del aprovechamiento de <i>P. volubilis</i> y <i>P. pennienrvia</i> en México

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

A. comosus, comúnmente llamada piña, es una planta perenne frutal de clima tropical que pertenece a la familia *Bromeliaceae*. Originaria de Sudamérica, su sabor único la ha hecho conocida a nivel internacional y actualmente es fundamental para la industria alimentaria debido a que es parte de una gran cantidad de recetas, además de que también posee propiedades benéficas para distintos padecimientos y condiciones médicas. Su cultivo en distintas partes del mundo escala a una magnitud de 25 millones de toneladas anuales, de manera que es la tercera fruta más consumida a nivel global, sólo por detrás del plátano y de los cítricos [10]. En el caso de México, la producción de piña ha ido en aumento: para 2017, se produjeron 945 mil toneladas; para 2018, un millón de toneladas; para 2019, un millón 041 mil 161 toneladas; y para 2020, un millón 209 mil toneladas, año en el que el país se posicionó como el noveno productor a nivel mundial. Si bien el estado de Veracruz genera dos terceras partes de ésta producción, Jalisco también es relevante en esta actividad económica [11]. Uno de los municipios jaliscienses en los que se cultiva piña es Tomatlán, ubicado en la región de la Costa Norte.

Sin embargo, la multiplicación de la piña presenta ciertas dificultades. Naturalmente, la planta cuenta con la capacidad de reproducirse asexualmente a través de tres tipos de hijuelos: clavos, gallos y coronas. Si se consideran hijuelos de entre 5 y 6 meses de edad, los dos primeros tipos llegan a la floración luego de 12 meses, mientras que las coronas tardan entre 19 y 20 meses [12]; es decir, la propagación de piña de éste modo es muy lenta. La micropropagación o cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa, ya que permite la obtención de un gran volumen de plantas en tiempos y espacios mucho más reducidos que los observados con los métodos tradicionales; pero dichas plantas, como también lo son las que se consiguen gracias a los hijuelos y a otras formas de reproducción asexual, son clónicas [7], lo cual, a pesar de que suele ser una ventaja, implica que todas serán susceptibles a las mismas patologías. Una manera de atacar este problema es por medio de estrategias de mejoramiento genético que requieren el conocimiento del número cromosómico. Es aquí donde surge otra cuestión, pues, aunque lo más común en las variedades de *A. comosus* es el número $2n = 50$, se han encontrado clones triploides y

tetraploides [13], de forma que no se puede asegurar el número de cromosomas de una variedad de la especie sin hacer los estudios correspondientes.

1.4. Planeación de alternativa(s)

Como es posible deducir, el presente PAP se puede dividir en dos partes: micropropagación y estudios citogenéticos. Respecto a la primer área, existen tres estrategias distintas que pueden emplearse: proliferación de yemas axilares, organogénesis y embriogénesis somática. Las dos últimas pueden realizarse a partir de un explante (forma directa) o de un callo (forma indirecta) [7]. La proliferación de yemas axilares, que son un conjunto de células meristemáticas protegidas por los primordios foliares [14], es la metodología a la que más se recurre debido a su alta producción y a la ausencia de variación somaclonal en las plantas generadas. Se consigue inhibiendo la dominancia apical provocada por las auxinas realizando el cultivo de tejido en un medio con citocininas, las cuales estimulan el desarrollo de las yemas axilares [15].

En cuanto a la organogénesis, se refiere al desarrollo de órganos, ya sean hojas o raíces. En el caso de la forma directa, ocurre a partir de células destinadas a este fin, o bien, sometidas a reguladores de crecimiento. En el caso de la forma indirecta, primero se necesita dar lugar a una masa de células denominada callo que resulta de la dediferenciación de los tejidos gracias a reguladores de crecimiento y que puede usarse para generar órganos [15]. Finalmente, en la embriogénesis somática se induce a una célula somática a que se transforme en un embrión entero capaz de germinar y dar lugar a una planta. La embriogénesis somática generalmente se lleva a cabo de modo indirecto [7].

En el presente trabajo se micropropagó *A. comosus* mediante técnicas diferentes con el propósito de determinar la más adecuada. Las técnicas que se eligieron fueron la proliferación de yemas axilares y la organogénesis directa. La primera fue seleccionada debido a que, como ya se mencionó, evita variaciones somaclonales. Por otro lado, la organogénesis directa se prefirió sobre la embriogénesis somática porque esta última, al hacerse regularmente de forma indirecta, propicia la generación de plantas con fenotipos distintos a la planta madre. Por ejemplo, se ha visto que los callos pueden dar lugar a plantas con un nivel de ploidía

distinto. Puede ser que la planta original fuera diploide y la resultante del proceso de morfogénesis indirecta sea tetraploide, hecho que no se presenta cuando la micropropagación se realiza a partir de puntos de crecimiento organizados [16]. Además, las vías indirectas necesitan de tiempos más prolongados para lograrse porque requieren de un paso intermedio: el cultivo de callo o un cultivo en suspensión, a diferencia de las directas donde las células de los explantes se diferencian para la formación de órganos sin la necesidad de tal proceso intermedio [17].

Considerando las técnicas mencionadas, se decidió recurrir tanto a metodologías de citogenética tradicional como de citogenética molecular por la manera en que se complementan. La primera hace posible realizar un cariotipo gracias al cual se conocen la estructura y el número de los cromosomas. La segunda incluye la hibridación *in situ* fluorescente, mediante la cual sondas de ADN etiquetadas con fluorocromos se unen a un segmento de cromosoma correspondiente y se analizan con un microscopio de fluorescencia [18]. De esta manera, en el presente trabajo la determinación del número cromosomal se propone conseguir mediante citogenética tradicional; y la del nivel de ploidía, mediante citogenética molecular, con el fin último de tener el cariotipo y el idiograma de la variedad de piña miel cultivada en Tomatlán.

A continuación, se presenta el cronograma de actividades del presente PAP (tabla 2) y el significado de sus abreviaciones (tabla 3):

Tabla 2. Cronograma de actividades

Nombre de la actividad	Recursos	Tiempo (días)	Semana																
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	
Preparación de soluciones stock de medio MS y reguladores de crecimiento	BG BA	1																	
Trasplante de plantas de piña a nuevas macetas		1																	

Preparación de medios de cultivo de práctica (violetas y helechos)	PT AC	1																	
Siembra de explantes de práctica (violetas y helechos)	CFL	1																	
Riego de las piñas en el invernadero																			
Preparación de medio de cultivo de práctica (singonios)	PT AC	1																	
Preparación de medio de cultivo para subcultivo de piña	PT AC	1																	
Subcultivos de piña	CFL	1																	
Colecta de raíz de piña		1																	
Tratamiento de la raíz de piña	IB	8																	
Preparación de laminillas con acetoriceína	CE	4																	
Revisión al microscopio de las laminillas	MF	4																	
Establecimiento de yemas axilares de piña <i>in vitro</i>	CFL	7																	
Cultivo de piña por proliferación de yemas axilares	CFL	Variable																	
Cultivo de piña por organogénesis directa	CFL	Variable																	
Observación de laminillas por contraste de fases	MF	4																	

Tabla 4. Composición del medio de cultivo MS [20].

Compuesto	Concentración (mg/L)
Macronutrientes	
NH ₄ NO ₃	165
KNO ₃	190
MgSO ₄ ·7H ₂ O	37
KH ₂ PO ₄	17
CaCl ₂ ·2H ₂ O	44
FeSO ₄ ·7H ₂ O	2.78
Micronutrientes	
H ₃ BO ₃	0.62
MnSO ₄ ·H ₂ O	1.69
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.86
KI	0.083
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.0025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.0025
Compuestos orgánicos	
Tiamina HCl	0.01
Piridoxina HCl	0.05
<i>Myo</i> -inositol	10
Ácido nicotínico	0.05
Glicina	0.2
Agente quelante	
Na ₂ ·EDTA	3.73

Como ya se dijo, entre los componentes más importantes de los medios de cultivo están los reguladores de crecimiento que determinan la respuesta morfogénica que presenta el explante

in vitro [20]. Dos de los grupos de reguladores más importantes son las auxinas y las citocininas. Las primeras participan en la formación de raíces adventicias y en el crecimiento por elongación celular [21], mientras que las segundas contribuyen a la aparición de brotes adventicios, al desarrollo de yemas axilares y a la floración *in vitro* [22].

Preparación de medios de cultivo

Para preparar el medio de cultivo MS se realizan cinco soluciones: una de macronutrientes, una de micronutrientes, una de compuestos orgánicos, una de cloruro de calcio y una de sulfato ferroso con agente quelante, todas a concentraciones que al mezclarse de la manera en que lo indica la tabla 5 y al aforarse dan origen a 1 litro de medio MS con una concentración de sales diez veces mayor a la mostrada en la tabla 4 (10X). De esta forma, cuando ya se desea hacer una cierta formulación con reguladores de crecimiento se agrega una décima parte de dicho concentrado para obtener las concentraciones de la tabla 4 (1X).

Tabla 5. Soluciones requeridas para preparar el concentrado MS 10X [20].

Solución	Volumen (mL)
Macronutrientes	10
Micronutrientes	5
Compuestos orgánicos	10
Cloruro de calcio	22
Sulfato ferroso y agente quelante	10

Como se mencionó anteriormente, al preparar el medio de cultivo MS 1X se agrega, generalmente, sacarosa. Lo más común es emplear una concentración de 30 g/L (3%), aunque en ocasiones se hace uso de una concentración de 20 g/L (2%). También se añaden los reguladores de crecimiento. Entre las auxinas se encuentran el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (AIB), el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D); mientras que entre las citocininas se hallan la 6-bencilaminopurina (BAP), la kinetina (KIN), la zeatina y el thidiazurón (TDZ) [16]. Después de añadir estos compuestos, el medio de cultivo se afora y su potencial de hidrógeno (pH) es ajustado. Normalmente el

valor adecuado para el cultivo de tejidos vegetales se encuentra en el rango de 4.5 a 5.7. Por último, en el caso de que el medio de cultivo vaya a ser semisólido se incorpora un agente gelificante. El más habitual es el agar, una mezcla de polisacáridos derivada de distintas especies de algas rojas, la cual es lo suficientemente fuerte para sostener el cultivo, pero crea una consistencia lo suficientemente líquida para que los nutrientes y el aire puedan difundirse hacia los explantes. Además, tiene la ventaja de no reaccionar con el resto de componentes del medio y de no ser digerido por las enzimas vegetales [16].

Esterilización de medio de cultivo y material

El uso de la autoclave o de una olla de presión es indispensable ya que las esporas de bacterias y hongos que se encuentren en el medio de cultivo recién preparado y en el material que vaya a usarse después solo serán eliminadas por métodos de esterilización como este. Las condiciones habituales de operación son de 121 °C y 15 lb/in². El escape de los gases puede ser rápido o lento. Lo primero se programa cuando un líquido se esteriliza, y lo segundo, cuando únicamente se está esterilizando material [16].

Algunas sustancias orgánicas son termolábiles, es decir, se degradarían a las temperaturas del proceso de autoclavado. Por lo tanto, se recurren a métodos de esterilización como la filtración. Aquí se usa una jeringa estéril en la que se carga el líquido, el cual se hace pasar a través de un filtro igualmente estéril dejándose caer en el medio de cultivo ya autoclavado. Algunos componentes para los que se implementa este método son hormonas, vitaminas y antibióticos [16].

Desinfección de explantes vegetales

Las plantas de las que se toman los explantes se encuentran infestadas de manera superficial o endógena por virus, bacterias y hongos. Por consiguiente, se necesita implementar agentes desinfectantes o técnicas de desinfección. Entre estos se hallan el alcohol, fungicidas, bactericidas, el peróxido de hidrógeno, el hipoclorito de sodio, el cloruro de mercurio, el uso de luz ultravioleta, el choque térmico, etc. La elección de estos se basa en el tipo de explante con el cual se esté trabajando [20]. El cloro comercial, que es hipoclorito de sodio en una concentración entre 3 y 6%, suele usarse en proporciones de 1:20, 1:10 y 1:5 [16].

Existe un preservativo y bactericida de amplio espectro que se vende bajo el nombre de *Plant Preservative Mixture* (PPM). Una de sus ventajas es que es autoclavable, pero debe entrar en contacto con cada célula bacteriana para surtir efecto [16].

Preparación del medio de cultivo para el establecimiento de yemas axilares

Primeramente, se prepararon 5 litros de concentrado MS 10X. Para ello, se pesaron las cantidades suficientes de los componentes enlistados en la tabla 4 usando una balanza granataria o una balanza analítica según fuera conveniente. Luego, se disolvieron los compuestos en las cinco mezclas planteadas en la tabla 5 con planchas de termoagitación. Es importante mencionar que en la preparación de cada una de estas soluciones, los componentes se disolvieron en el orden mostrado en la tabla 4. En el caso de la solución de fierro, tanto este como el agente quelante se disolvieron juntos. Una vez hecha la mezcla de las cinco soluciones el concentrado se guardó en un congelador a -20 °C para su posterior uso.

Llegado el momento, se descongeló la cantidad suficiente de concentrado MS 10X para hacer un medio de cultivo que permitiera el establecimiento *in vitro* de yemas axilares de *A. comosus*. La concentración de sacarosa utilizada fue de 30 g/L y como regulador de crecimiento se incorporó KIN en una concentración de 2 mg/L. Adicionalmente, se añadieron PPM y una dispersión coloidal de nanopartículas de plata como agentes biocidas en concentraciones de 1 mL/L y 10 mL/L, respectivamente. El pH se ajustó a 5.8 ± 0.02 con un potenciómetro y con soluciones de HCl y NaOH 1.0 N y se agregaron 8 g/L de agar. Un segundo medio fue hecho con las mismas características, pero sin PPM ni nanopartículas de plata.

Preparación del medio de cultivo para la organogénesis

Para crear un diseño experimental se consultó la literatura [23, 24, 25, 26, 27, 28]. De esta manera, se plantearon los tratamientos que se muestran en la tabla 6. De la misma forma que se hizo para el medio de cultivo de yemas axilares, se descongeló la cantidad necesaria de concentrado MS 10X y se usó una concentración de 30 g/L de sacarosa. Los reguladores de

crecimiento se agregaron y el pH fue ajustado a 5.8 ± 0.02 . En este caso no se agregó agar, pues se decidió emplear medios líquidos. Tampoco se adicionaron biocidas.

Tabla 6. Diseño experimental para la organogénesis.

Tratamiento	BAP (mg/L)	ANA (mg/L)
1	3.0	2.0
2	2.5	2.0
3	2.0	2.0
4	3.0	1.5
5	2.5	1.5
6	2.0	1.5
7	3.0	1.0
8	2.5	1.0
9	2.0	1.0
Control	0.0	0.0

Esterilización de los medios de cultivo para establecimiento de yemas y para organogénesis

Los medios de ambos experimentos fueron esterilizados en autoclave a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ y 15 lb/in^2 por 15 minutos junto con el material requerido para hacer la siembra de los explantes.

Establecimiento in vitro de yemas axilares

Se seleccionaron plantas adultas de *A. comosus* que se encontraban en el invernadero de aclimatación de la subsede Zapopan del CIATEJ. Las hojas fueron retiradas manualmente y las raíces, así como la parte inferior del tallo, se cortaron empleando un cúter. Después, el material vegetal se lavó con agua y jabón para luego extraer las yemas axilares empleando un bisturí. Estas se colocaron en una solución de ácido cítrico en una plancha de termoagitación. Se realizó entonces un choque térmico colocando las yemas en agua a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ y después en agua a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$. Como último paso y fuera de condiciones de asepsia, se colocaron las yemas en una mezcla de Agrymicin®, Bactrol®, Captán® y Aliette® (todos a una concentración de 1 g/L) con jabón potásico (a una concentración de 1 mL/L) durante 2 horas.

Debido al tiempo que se demoró el proceso, las yemas se guardaron hasta el día siguiente en un recipiente con el primer medio de establecimiento de yemas. Al día siguiente se preparó una campana de flujo laminar desinfectando su superficie con alcohol etílico al 70% v/v y esterilizándola con luz ultravioleta por 15 minutos. Todo el material que se introdujo fue desinfectado previamente con etanol al 70% v/v. En el área aséptica las yemas se colocaron usando pinzas estériles en un tubo cónico de 50 mL con hipoclorito de sodio al 0.12%. Para mejorar la desinfección se agitó invirtiendo el tubo de modo manual por 7 minutos. Para retirar los restos de cloro se hicieron tres enjuagues con agua destilada estéril por 5 minutos cada uno en el mismo tubo. Finalmente, se llevó a cabo una desinfección con dispersión coloidal de nanopartículas de plata a 10 mL/L durante 10 minutos. Usando las pinzas nuevamente se sembraron entre 4 y 5 yemas por bote, teniéndose 6 botes en total (figura 2).



Figura 2. Yemas de *A. comosus* establecidas en medio de cultivo con PPM y nanopartículas de plata.

Una semana después, las yemas se transfirieron a un medio con las mismas características pero sin nanopartículas de plata. Se descartó una que presentaba el crecimiento de un hongo en su superficie (figura 3).

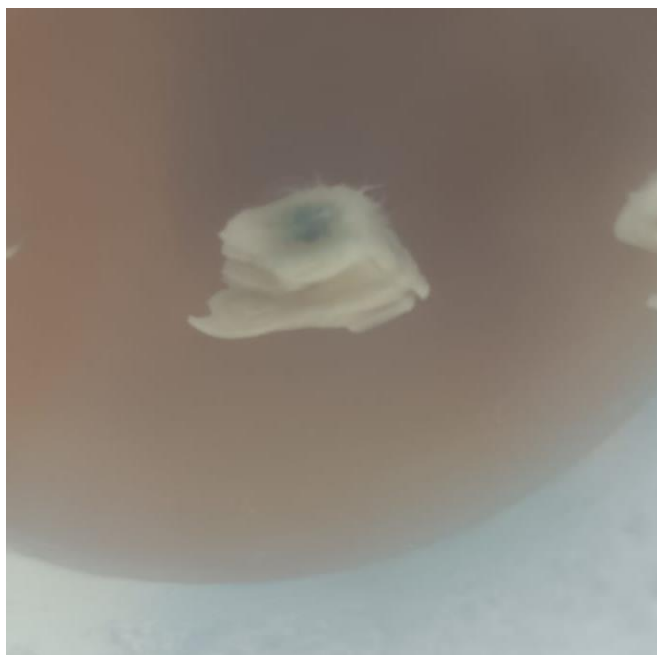


Figura 3. Yema contaminada con hongo filamentoso.

En el caso del experimento con el segundo medio (el que no poseía PPM ni nanopartículas de plata) se seleccionaron plántulas de *A. comosus* previamente establecidas *in vitro* que se encontraban en la unidad de Biotecnología vegetal de la subsede Zapopan del CIATEJ. Debido a que algunas de las plántulas presentaban contaminación (figura 4) se hizo un proceso de desinfección. Dentro de la campana de flujo laminar y en un vaso de precipitado estéril se sumergieron las plántulas en cloro al 0.6% por 7 minutos agitando levemente con pinzas estériles. Luego, se eliminaron los restos de cloro con dos lavados con agua destilada estéril por 5 minutos cada uno. Al final, se hizo una segunda desinfección con PPM 10 mL/L y dispersión coloidal de nanopartículas de plata 10 mL/L.



Figura 4. Contaminación presentada por las plántulas de *A. comosus* previamente establecidas *in vitro*.

Después del proceso de desinfección se retiraron las hojas de las plántulas cortando con un bisturí sobre un vidrio, ambos estériles. Los tallos resultantes se depositaron en una caja de Petri plástica estéril (figura 5). Una vez que se reunieron suficientes tallos de *A. comosus* se colocaron 4 en cada uno de los 7 botes con medio de cultivo. En ambos experimentos los botes se colocaron en un cuarto de incubación con un fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad y con una temperatura de 25 ± 2 °C.

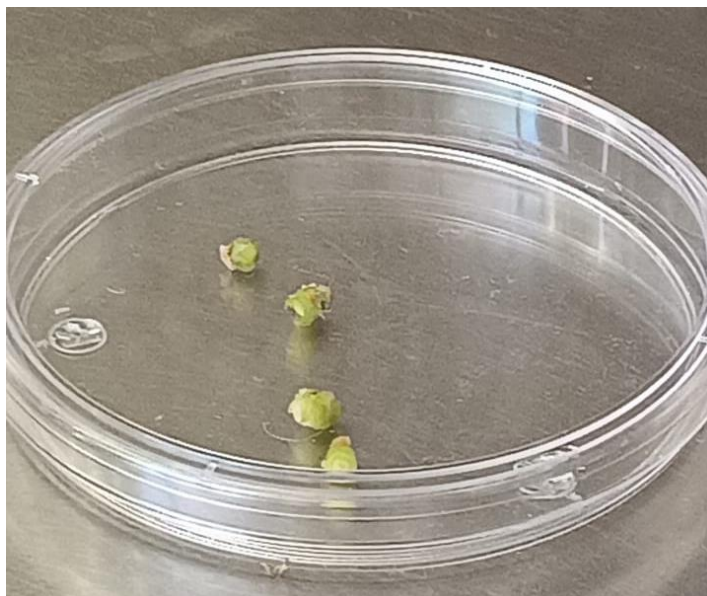


Figura 5. Tallos de las plántulas de *A. comosus* después de cortarse las hojas.

Siembra de explantes para organogénesis

Se escogieron plántulas de *A. comosus* previamente establecidas *in vitro*. Las condiciones de asepsia y esterilidad de los materiales fueron las mismas que en los experimentos de yemas axilares. Dado que en apariencia las plántulas no presentaban contaminación no se sometieron a un protocolo de desinfección. Haciendo uso de pinzas y bisturí se cortaron explantes de aproximadamente 1 cm² de la sección proximal de las hojas de la plántula (figura 6). Se sembraron tres explantes por frasco de cultivo (figura 7), teniendo 10 repeticiones por cada uno de los tratamientos de la tabla 6 (figura 8). Los frascos se incubaron del mismo modo que los botes de yemas.

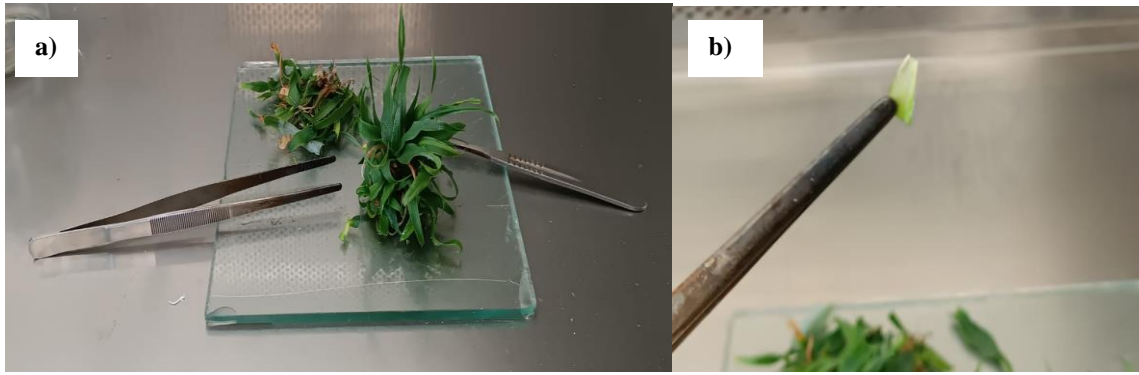


Figura 6. Siembra de explantes para organogénesis. a) Plántula de *A. comosus* colocada sobre el vidrio de corte. b) Explante listo para la siembra.

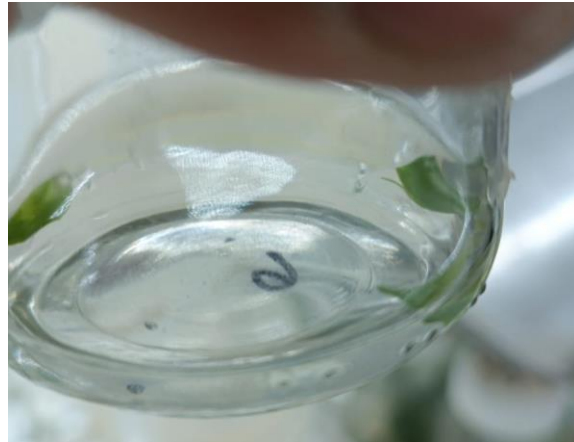


Figura 7. Explantes colocados en medio de cultivo para organogénesis.

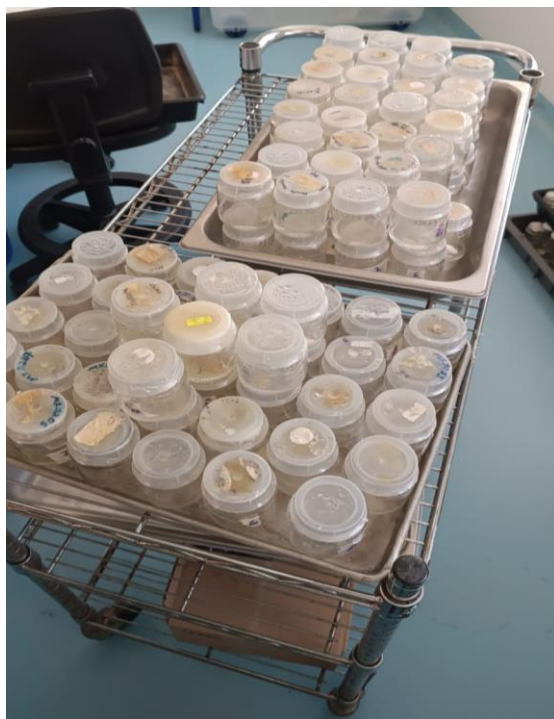


Figura 8. Frascos de cultivo de organogénesis.

Desarrollo de las yemas axilares establecidas in vitro

En el caso del experimento en el que se utilizaron yemas de plantas de *A. comosus* provenientes de invernadero, luego de aproximadamente una semana de la colocación de los explantes en el medio con dispersión coloidal de nanopartículas de plata se comenzó a notar que estos presentaban áreas necrosadas como resultado de una intoxicación por la exposición prolongada a dichas nanopartículas. Esta fue la razón por la que se hizo el cambio al medio que no contenía nanopartículas de este tipo. Sin embargo, el proceso de muerte del tejido no se detuvo (figura 9).



Figura 9. Yemas axilares de *A. comosus* necrosadas como resultado de una exposición prolongada a nanopartículas de plata en el medio de cultivo.

Precisamente, esta fue la razón por la cual se optó por emplear plántulas *in vitro* de *A. comosus* para un segundo experimento. En este, cuatro días después de la siembra pudo verse contaminación bacteriana en uno de los botes (figura 10). En los quince días posteriores a la siembra todavía no se observaba ningún crecimiento, pero lo que se registró fue contaminación por microalgas que se evidenció por colonias de color verde (figura 11). Finalmente, a los veinte días se presentaron los primeros crecimientos derivados de las yemas (figura 12). A los aproximadamente 30 días el desarrollo de las yemas fue más significativo. No obstante, a causa de la contaminación por microalgas se decidió cambiar el medio de cultivo de las yemas para reducir la concentración de estas. Las técnicas y condiciones de asepsia fueron las mismas que para los otros procedimientos. Con pinzas estériles se retiraron las yemas del medio de cultivo y se reservaron en una caja de Petri hasta el momento de su colocación en el recipiente con medio nuevo. Una de las plántulas de *A. comosus* que se había desarrollado hasta este momento en el experimento presentó raíz (figura 13). Sin embargo, dado que no se hizo un proceso de desinfección al momento de realizar la transferencia al

medio de cultivo nuevo, el crecimiento de las microalgas no se detuvo. De hecho, pareció acelerarse, como se observa en la figura 11b.

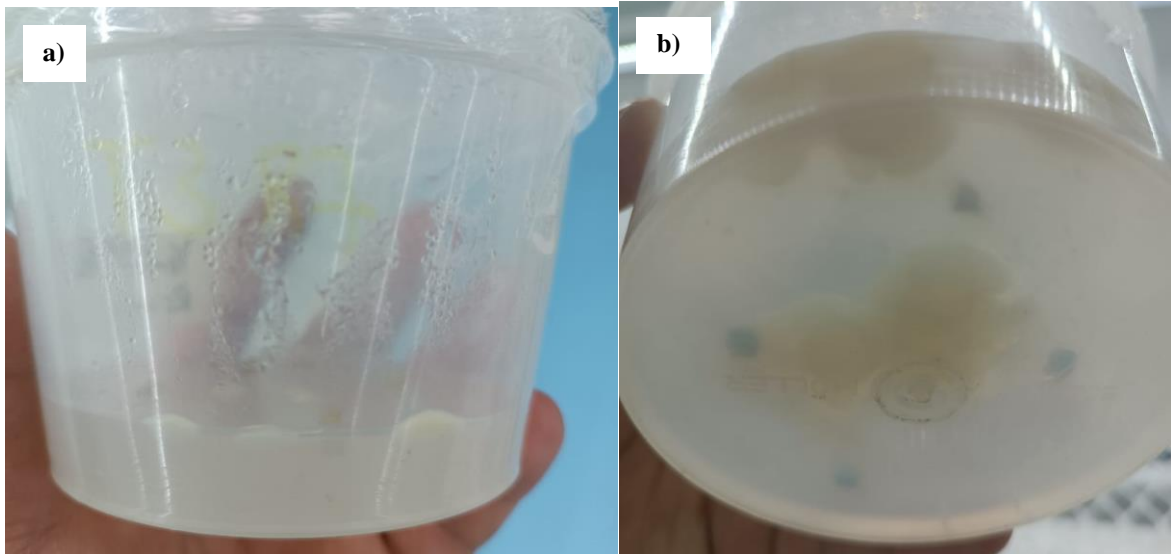


Figura 10. Contaminación bacteriana en uno de los frascos con yemas extraídas de plántulas *in vitro* de *A. comosus*. a) Un estado inicial de dicha contaminación. b) Un estado avanzado de la contaminación.

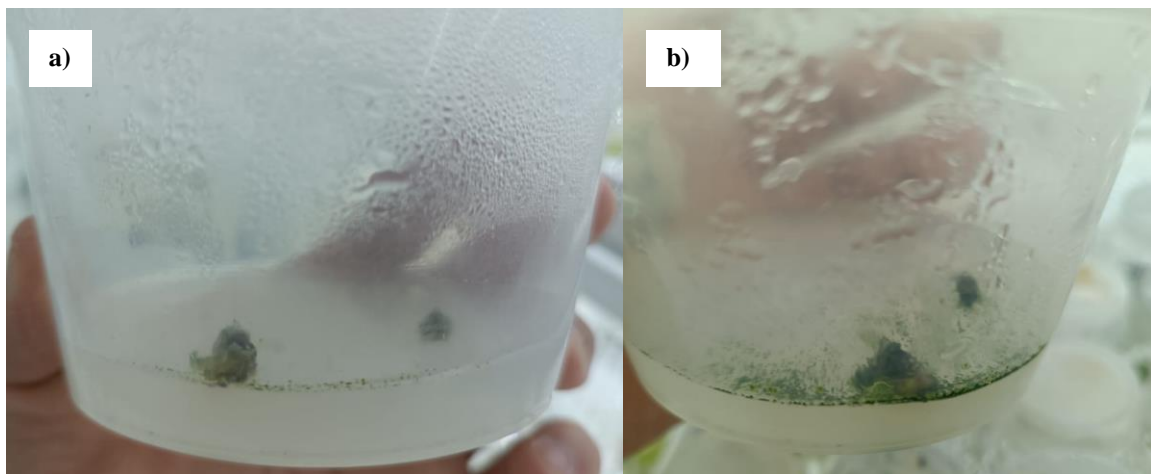


Figura 11. Contaminación por microalgas observada en los recipientes sembrados con yemas extraídas de plántulas *in vitro* de *A. comosus*. a) Un estado inicial de dicha contaminación. b) Un estado avanzado de la contaminación.



Figura 12. Uno de los primeros crecimientos de yemas axilares extraídas de plántulas *in vitro* de *A. comosus*.

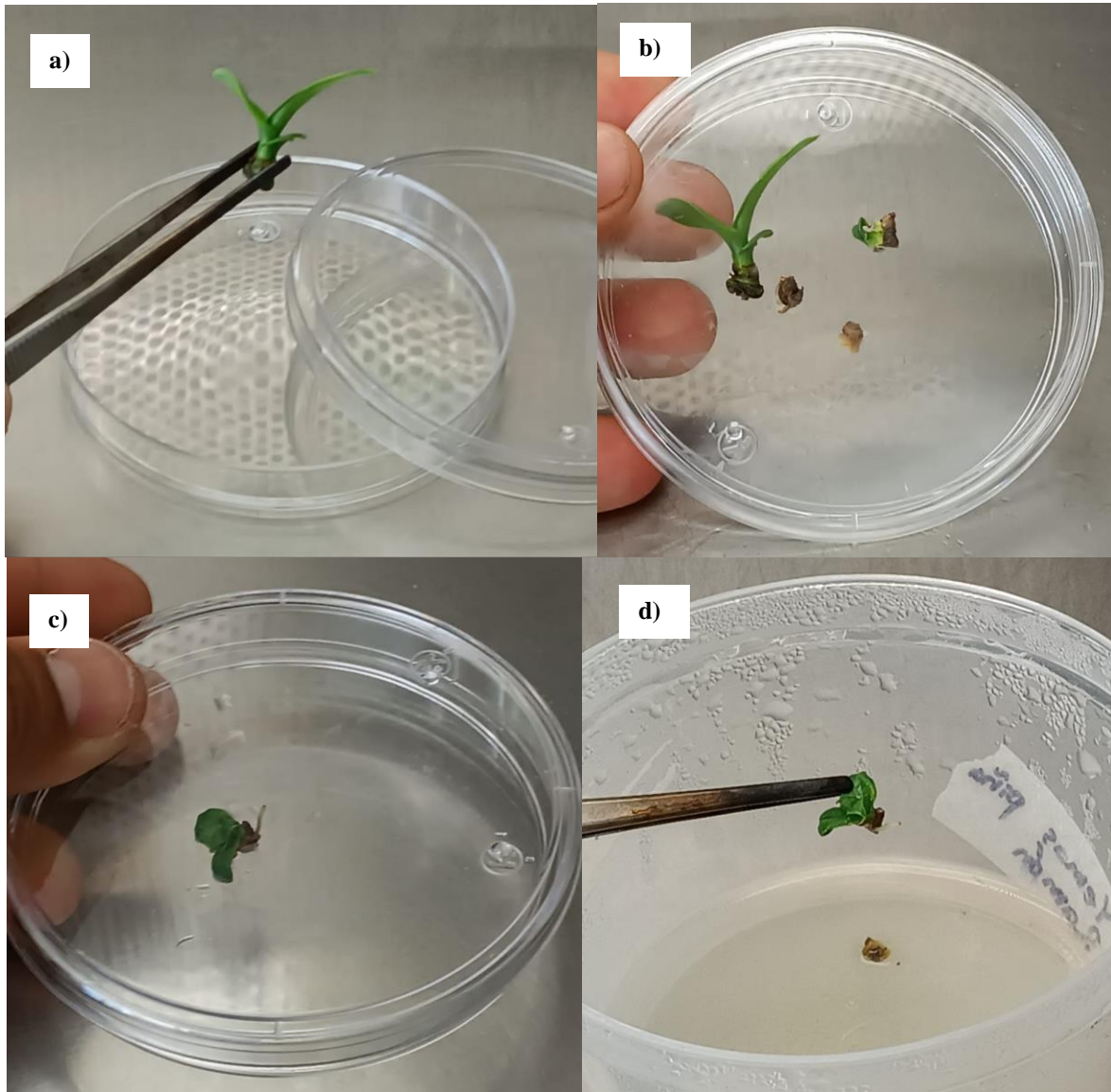


Figura 13. Transferencia de las yemas desarrolladas a un medio de cultivo nuevo. a) Plántula de *A. comosus* extraída de un recipiente. Se observa un crecimiento significativo respecto a lo mostrado en la figura 12. b) Yemas reservadas en una caja Petri de plástico. c) Plántula de *A. comosus* que desarrolló raíz. d) Colocación de la plántula de *A. comosus* en el medio de cultivo nuevo.

Las plántulas de *A. comosus* del experimento que partió de plántulas *in vitro* mantuvieron su crecimiento. Alrededor de 45 días posteriores a la siembra inicial el desarrollo de estas plántulas (figura 14), así como el crecimiento de las microalgas (figura 15), era más notorio, incluso en el recipiente que exhibía contaminación bacteriana (figura 10). Debido a esto, se decidió someter las yemas de dicho recipiente al mismo proceso de desinfección que se realizó cuando se extrajeron las yemas de las plántulas de *A. comosus in vitro*. Dado el tamaño

de las yemas, se decidió realizar el procedimiento en un tubo cónico estéril de 15 mL (figura 16).

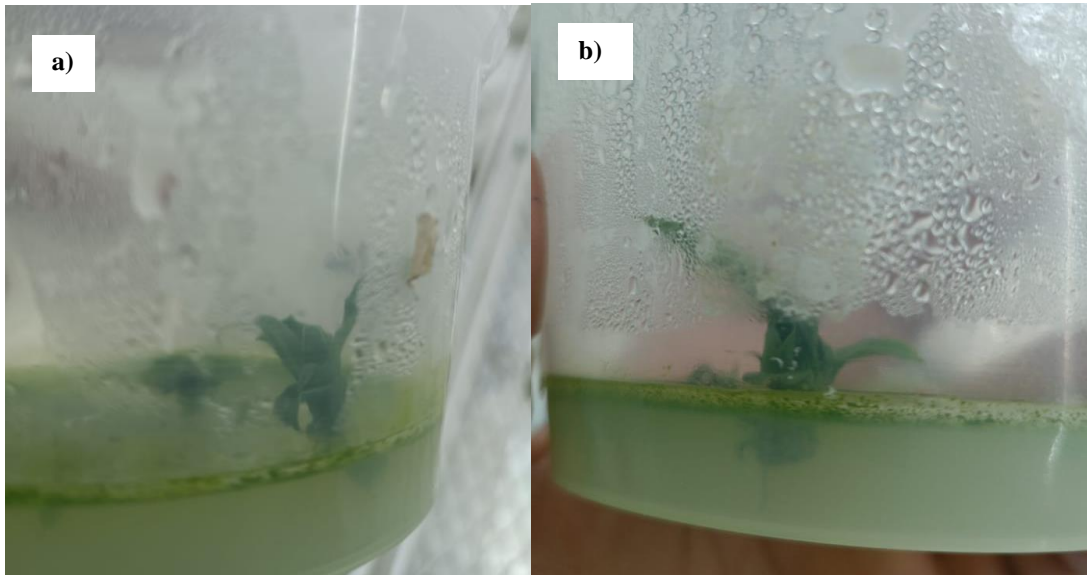


Figura 14. Desarrollo de plántulas derivadas de yemas axilares tras 45 días. Las dos imágenes únicamente son tomas de dos distintos recipientes.

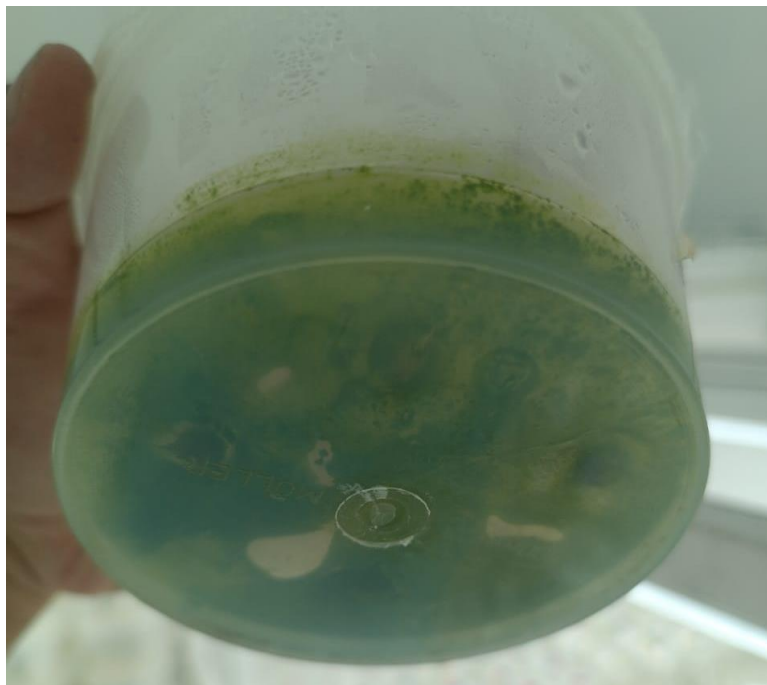


Figura 15. Crecimiento abundante de microalgas después del cambio de medio de cultivo.

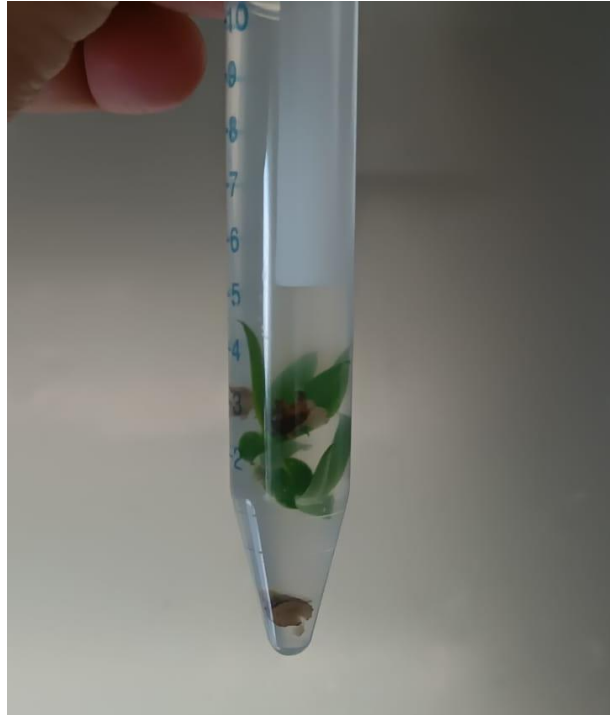


Figura 16. Desinfección del material vegetal que se encontraba en el recipiente contaminado por bacterias de la figura 10.

Por cuestiones de tiempo, no fue posible realizar una etapa de multiplicación. A pesar de ello, en la tabla 7 se exponen los resultados del número de yemas que proliferaron en el medio de establecimiento por contenedor. Para esto se numeran los explantes de cada recipiente del 1 al 4 y se especifica a cuántos brotes dio origen cada uno. En total, 13 tallos tuvieron respuesta y 16 yemas proliferaron.

Tabla 7. Establecimiento de yemas axilares in vitro.

Recipiente	Número de Explante	Número de yemas que proliferaron
1	1	2
	2	2
	3	1
	4	1
2	1	1
	2	0
	3	0
	4	0
3	1	1
	2	1
	3	1
	4	0
4	1	1
	2	1
	3	0
	4	0
5	1	1
	2	0
	3	0
	4	0
6	1	1
	2	0
	3	0
	4	0
7	1	2

	2	0
	3	0
	4	0

Organogénesis

Cinco días después de la siembra de los explantes, se comenzó a notar que algunos de los frascos mostraban contaminación de color verde de la misma manera que se vio en los recipientes con yemas (figura 17). Ante esto, se decidió tomar una muestra del medio de cultivo para analizarla bajo el microscopio óptico. Dicha muestra se extrajo de uno de los frascos que todavía no exhibía la contaminación para revisar si esta ya se encontraba también en el resto de los contenedores. Al observar con el objetivo de 20X se encontraron células verdes (figura 18). Se interpretó entonces que estas eran microalgas (cabe mencionar que esta observación fue la que también llevó a la conclusión de que las colonias presentes en los recipientes de yemas habían sido formadas por este tipo de microorganismos).



Figura 17. Contaminación de color verde observada en los frascos de cultivo de organogénesis.

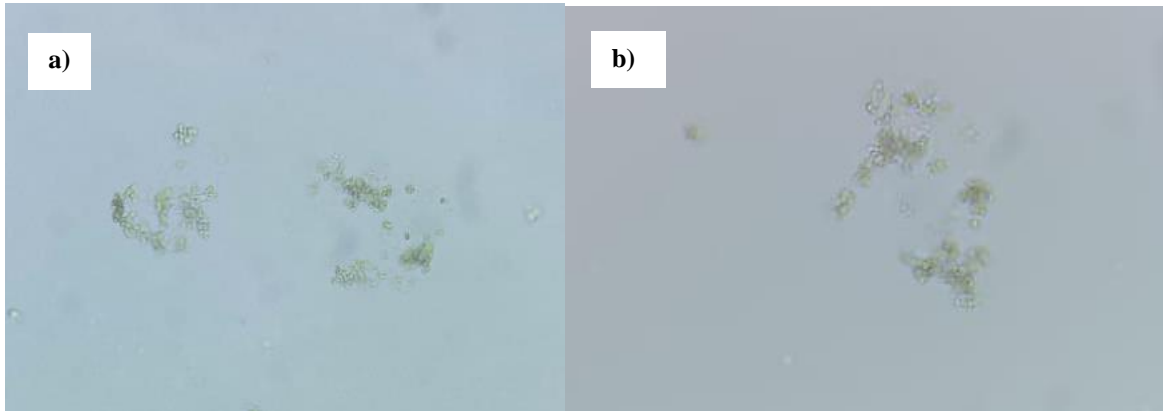


Figura 18. Microalgas vistas al microscopio (20X). Cada imagen corresponde a un campo diferente.

La primera comparación entre los tratamientos se hizo a los 20 días posteriores a la siembra. Enumerando las repeticiones del 1 al 10, en la tabla 8 se indican la cantidad de explantes por frasco que para ese punto presentaban una respuesta. A partir de la información de esta tabla, se decidió seleccionar los cinco tratamientos más prometedores para darles seguimiento. Como puede verse, las mayores respuestas hasta ese momento se dieron en los tratamientos 1, 2, 4, 6, 7 y 8. Sin embargo, cabe mencionar que el resultado que se esperaba era el de la caulogénesis, es decir, la clase de organogénesis en la que se da lugar a brotes o a la parte aérea de la planta [20] y no el de la rizogénesis, que es aquella en la cual se generan raíces [20], además de que el diseño experimental se hizo con base en literatura referente a la caulogénesis de *A. comosus*. Dicho esto, debe mencionarse que en la repetición 2 del tratamiento 2 se produjo una raíz de forma directa (motivo por el que se marca con un “*” en la tabla 8), de forma que se descartó del grupo de los cinco tratamientos más prometedores; o sea, los tratamientos elegidos fueron el 1, 4, 6, 7 y 8. Desde la figura 19 hasta la figura 28 se muestran explantes con respuestas representativas de cada tratamiento vistos al estereoscopio a los 15 o 20 días. En la figura 29 se observa un explante del control, el cual evidencia la ausencia de respuesta morfogénica.

Tabla 8. Respuesta morfogénica obtenida a los 20 días de realizada la siembra de explantes.

Tratamiento	Número de repetición	Explantos con respuesta	Total de explantes con respuesta por tratamiento
1	1	2	6
	2	1	
	3	1	
	4	1	
	5	1	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
2	1	2	5
	2	1*	
	3	2	
	4	0	
	5	0	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
3	1	1	1
	2	0	
	3	0	
	4	0	

	5	0	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
4	1	1	5
	2	1	
	3	1	
	4	1	
	5	1	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
5	1	1	2
	2	1	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
6	1	1	5
	2	2	

	3	1	
	4	1	
	5	0	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
	1	1	
	2	3	
	3	1	
	4	0	
7	5	0	5
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
	1	2	
	2	1	
	3	1	
	4	1	
	5	1	
8	6	1	7
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	

9	1	2	2
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	
Control	1	0	0
	2	0	
	3	0	
	4	0	
	5	0	
	6	0	
	7	0	
	8	0	
	9	0	
	10	0	

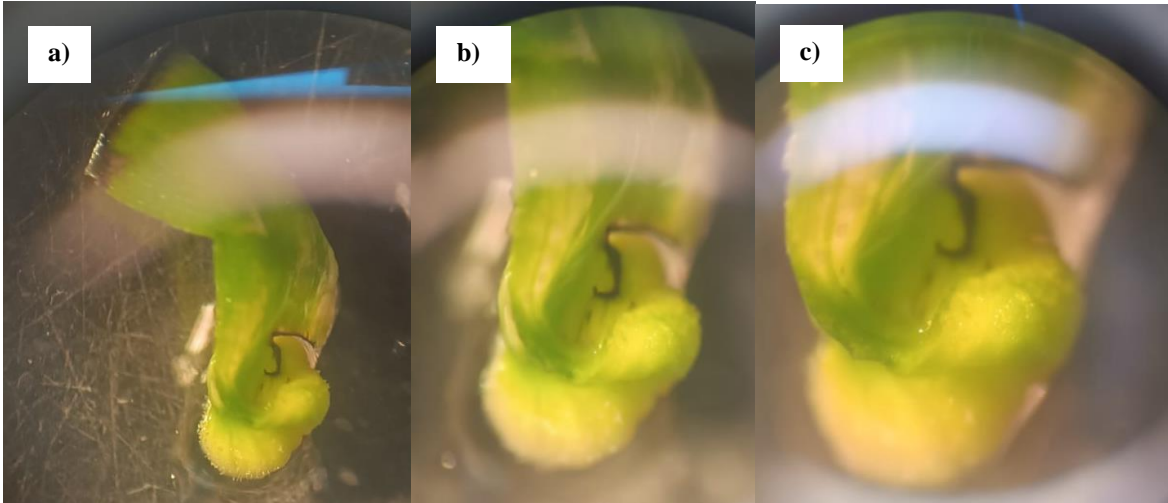


Figura 19. Explante con respuesta representativa del tratamiento 1 a los 15 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2X. c) Zoom de 3X.

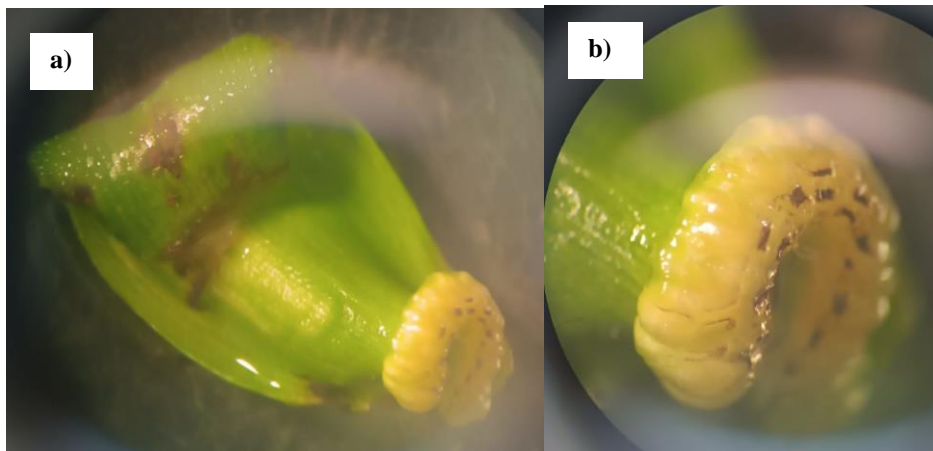


Figura 20. Explante con respuesta representativa del tratamiento 2 a los 15 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2.7X.

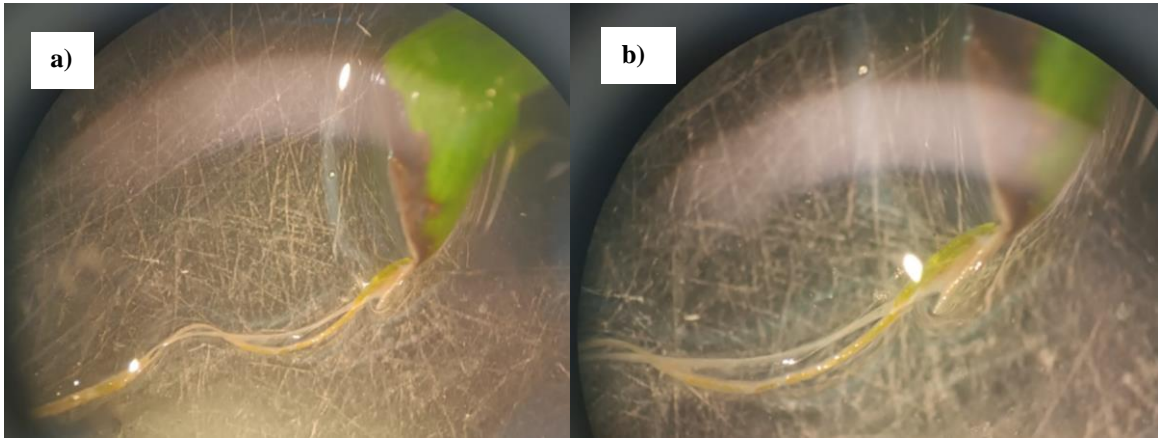


Figura 21. Explante con respuesta rizogénica del tratamiento 2 a los 15 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.7X.

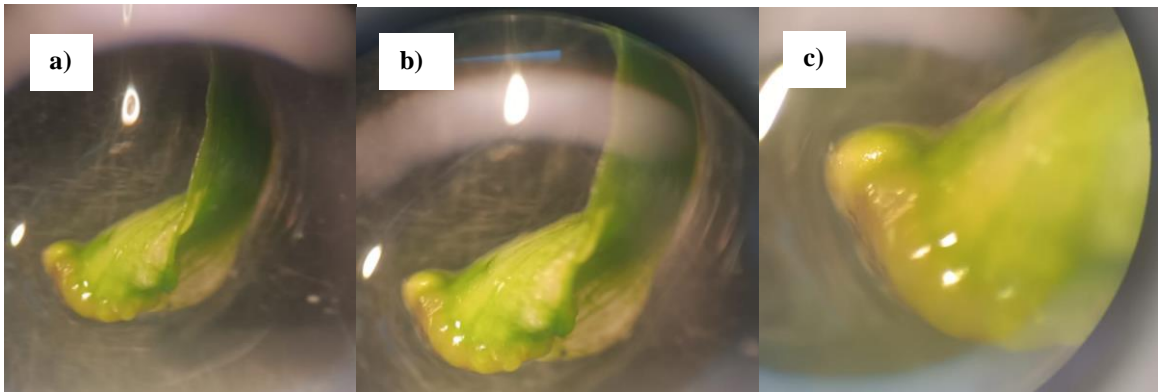


Figura 22. Explante con respuesta representativa del tratamiento 3 a los 15 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.5X. c) Zoom de 3X.

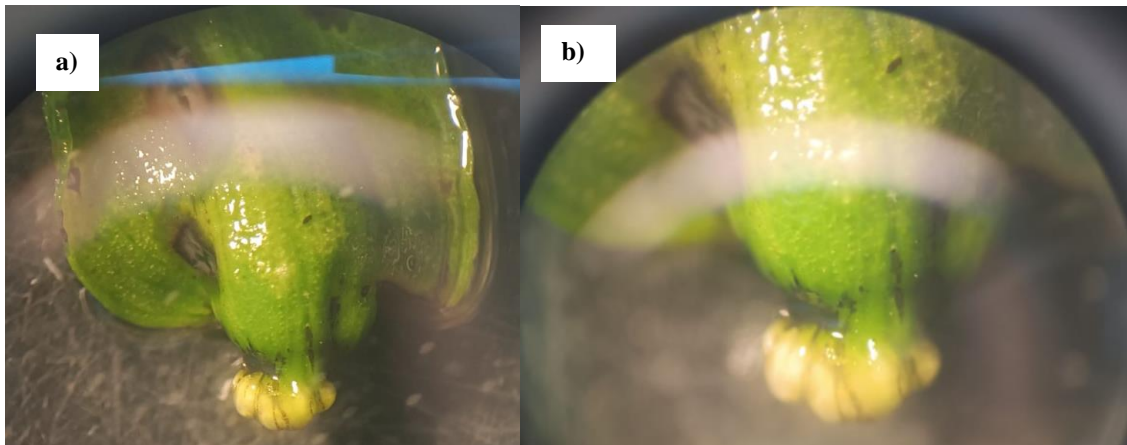


Figura 23. Explante con respuesta representativa del tratamiento 4 a los 15 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2X.

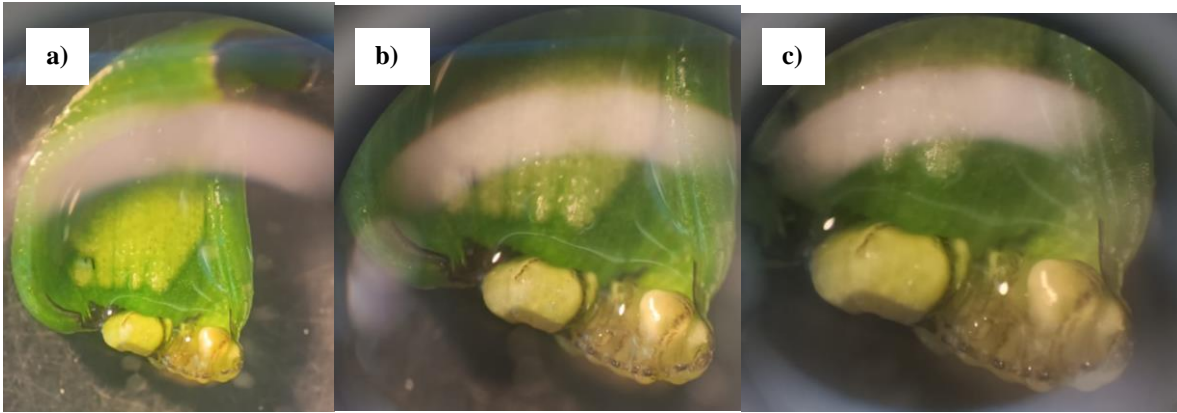


Figura 24. Explante con respuesta representativa del tratamiento 5 a los 20 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.8X. c) Zoom de 2.9X.

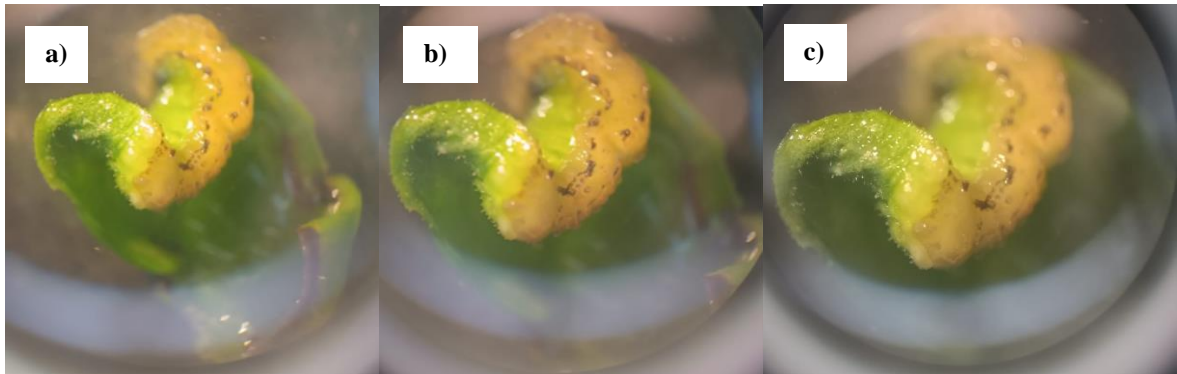


Figura 25. Explante con respuesta representativa del tratamiento 6 a los 20 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.4X. c) Zoom de 1.7X.



Figura 26. Explante con respuesta representativa del tratamiento 7 a los 20 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.3X. c) Zoom de 1.8X.

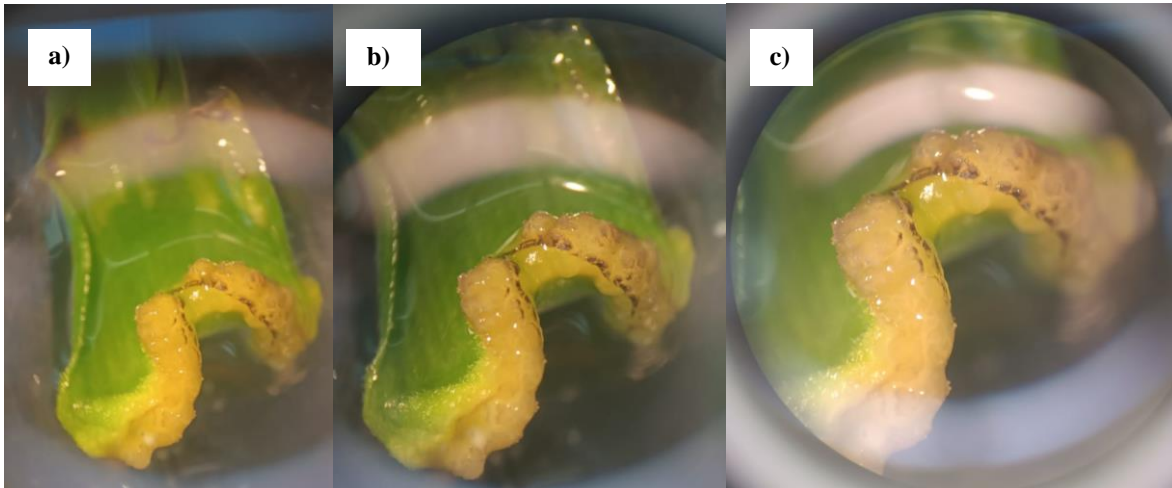


Figura 27. Explante con respuesta representativa del tratamiento 8 a los 20 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.3X. c) Zoom de 2.1X.

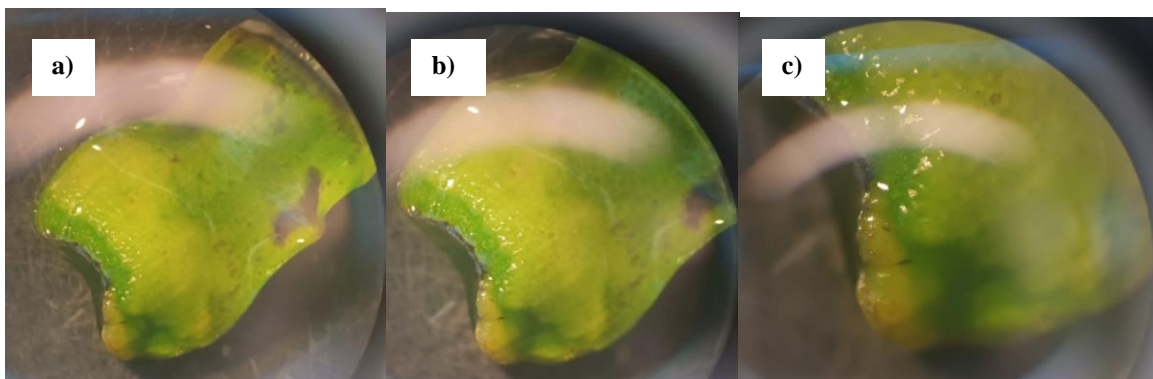


Figura 28. Explante con respuesta representativa del tratamiento 9 a los 20 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.4X. c) Zoom de 2.5X.

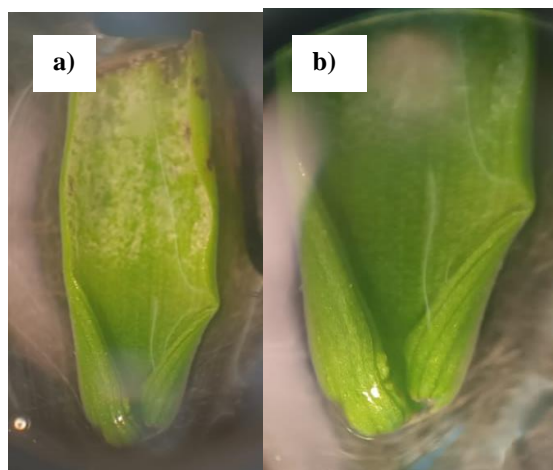


Figura 29. Explante que muestra el estado del control a los 20 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 1.3X.

Con el fin de reducir la concentración de microalgas presentes en los cultivos de los tratamientos escogidos se realizaron cambios de medios de cultivo. No obstante, estas volvieron a crecer muy rápidamente (figura 30). Ante esto, se optó por agregar 10 mL/L de PPM a los medios de cultivo, lo que se realizó en las condiciones de asepsia brindadas por la campana de flujo laminar y de manera previa (y en estas mismas condiciones asépticas) se esterilizó el PPM por filtración utilizando una jeringa y un filtro de 0.22 μm estériles (figura 31). Nuevamente las microalgas continuaron creciendo. Además, se notó que varios explantes comenzaron a exhibir oscurecimiento de las zonas donde se había visto respuesta, razón por la que se volvió a hacer un cambio de medio; esta vez sin PPM.



Figura 30. Crecimiento de microalgas tras cambiar el medio de cultivo de los tratamientos seleccionados.

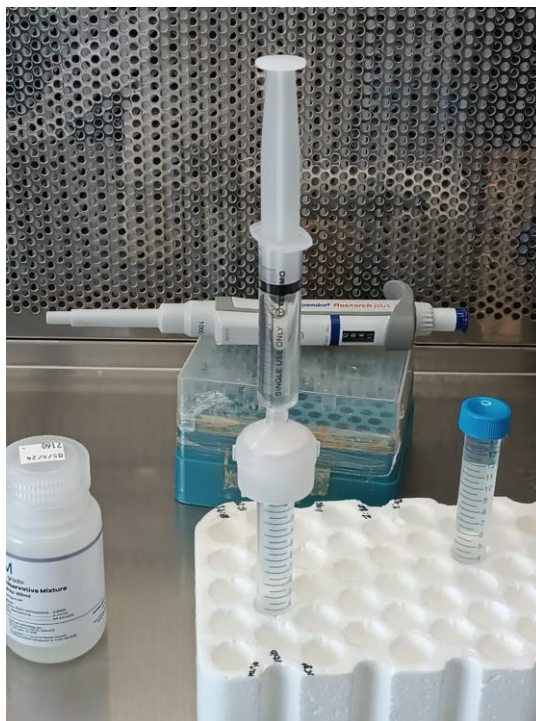


Figura 31. Esterilización de PPM por filtración.

Se dejaron entonces incubando los cultivos hasta el día 55 luego de la siembra inicial. En este punto se revisaron otra vez los explantes y se registró, además del número que mostraban respuesta, el número de explantes en los que se veía que dicha respuesta se había oxidado como resultado, presuntamente, de la exposición a la dosis alta de PPM en el medio de cultivo; el posible tipo de respuesta exhibido, la presencia de microalgas y el hecho de si el medio se veía turbio. Todas estas anotaciones se compilan en la tabla 9, donde también se indica con un “*” las repeticiones en las que fue posible percatarse de un incremento notorio en el tamaño de los explantes. Desde la figura 32 hasta la figura 41 se muestran explantes con respuestas representativas de cada tratamiento vistos al estereoscopio a los 50 días.

Tabla 9. Respuesta morfológica obtenida a los 55 días de realizada la siembra de explantes.

Repetición	Explantes con respuesta	Explantes con respuesta oxidados	Posible tipo de respuesta	Presencia de microalgas	Medio de cultivo turbio
Tratamiento 1					
1	3	0	Callo	No	Sí
2	1	0	Callo	No	Sí
3	1	1	Callo	No	Sí
4	0	0	---	No	Sí
5	1	0	Callo	Sí	No
6	0	0	---	No	No
7	0	0	---	Sí	No
8	0	0	---	No	Sí
9	0	0	---	No	No
10	0	0	---	Sí	No
Tratamiento 4					
1	1	1	Callo	No	Sí
2	2	0	Callo	Sí	No
3	1	1	Callo	No	Sí
4	1	1	Callo	Sí	No
5	1	1	Callo	Sí	No
6	0	0	---	No	No
7	0	0	---	No	No
8	0	0	---	No	No
9	0	0	---	Sí	No
10	0	0	---	Sí	No
Tratamiento 6					
1	1	1	Callo	No	Sí

2*	3	0	Callo y raíz	No	Sí
3	1	1	Callo	No	Sí
4	1	1	Callo	No	No
5	0	0	---	No	No
6	0	0	---	No	No
7	0	0	---	No	No
8	0	0	---	No	No
9	0	0	---	No	Sí
10	0	0	---	No	No
Tratamiento 7					
1	1	1	Callo	No	Sí
2*	3	1	Callo y raíz	No	Sí
3	1	1	Callo	No	Sí
4	0	0	---	No	No
5	0	0	---	No	No
6	0	0	---	No	Sí
7	0	0	---	No	No
8	0	0	---	No	No
9	0	0	---	No	No
10	0	0	---	Sí	No
Tratamiento 8					
1*	2	0	Callo	No	Sí
2	1	0	Callo	No	Sí
3	1	0	Callo	No	Sí
4	1	1	Callo	No	Sí
5	1	1	Callo	No	No
6	1	1	Callo	No	Sí
7	0	0	---	No	No

8	1	1	Callo	No	No
9	0	0	---	No	No
10	0	0	---	No	No

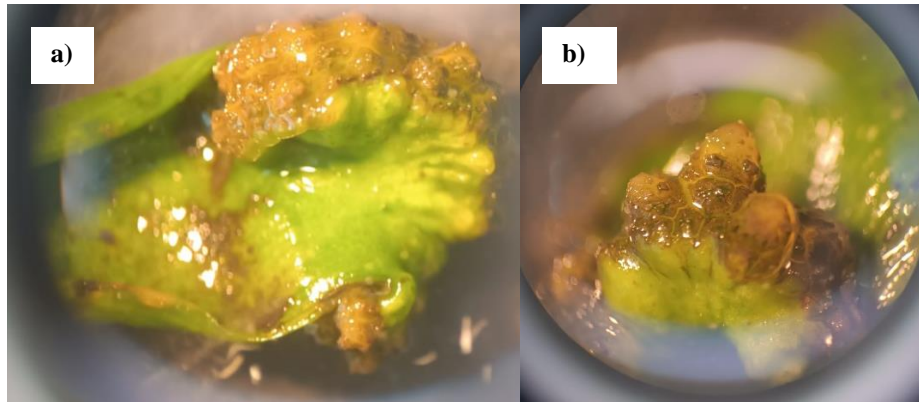


Figura 32. Explante con respuesta representativa del tratamiento 1 a los 50 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2.1X.

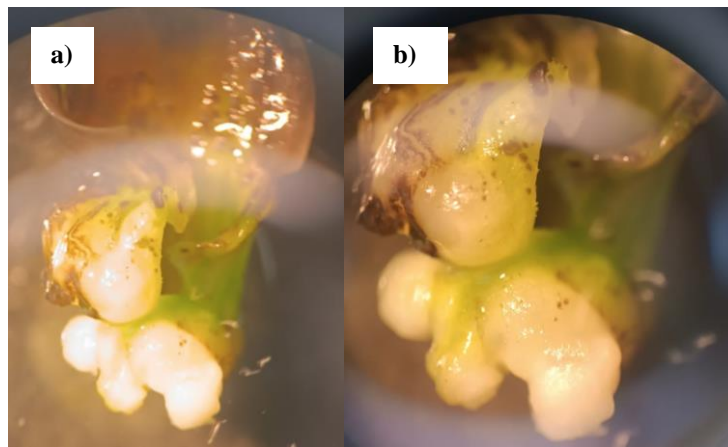


Figura 33. Explante con respuesta representativa del tratamiento 4 a los 50 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2X.

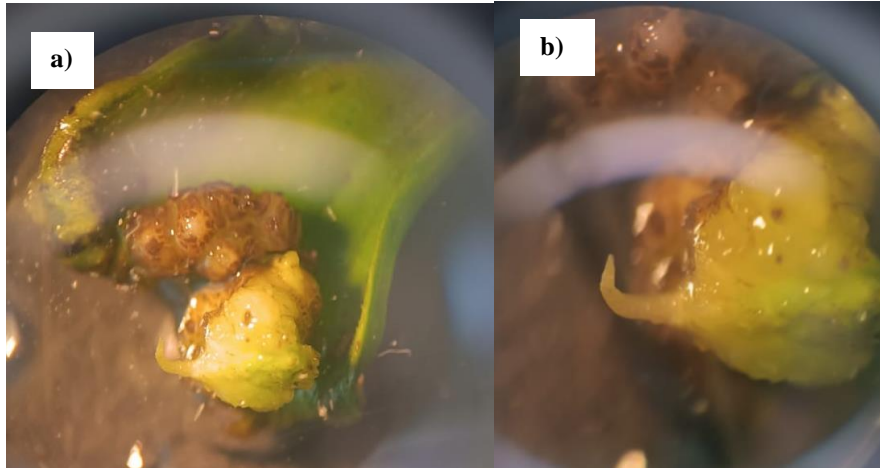


Figura 34. Explante con respuesta representativa del tratamiento 6 a los 50 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2.1X.

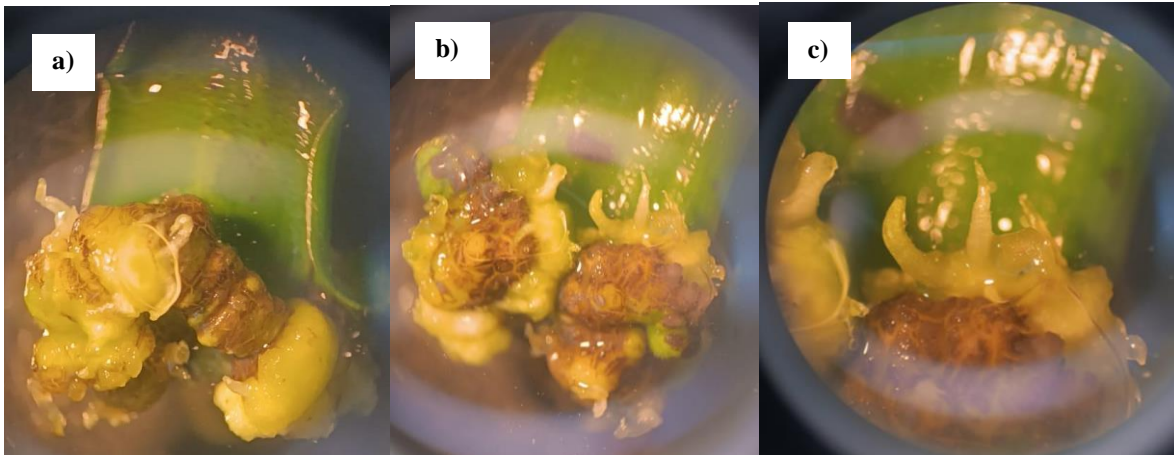


Figura 35. Explante con respuesta representativa del tratamiento 7 a los 50 días posteriores a la siembra. a) y b) Zoom de 1X. c) Zoom de 2X.

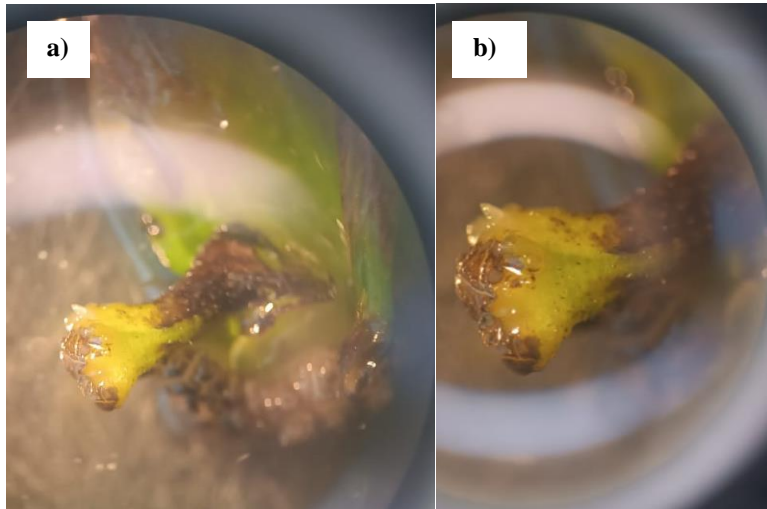


Figura 36. Explante con respuesta representativa del tratamiento 8 a los 50 días posteriores a la siembra. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2X.

Además, se observaron respuestas bastante notables en una repetición del tratamiento 2 en la que el medio estaba turbio (figura 37) e, inesperadamente, en un frasco de cultivo control contaminado con microalgas (figura 38). Es importante mencionar que en estos casos, a diferencia de lo señalado en la tabla 9 para los tratamientos seleccionados, se tuvo formación de brotes, o sea, caulogénesis.

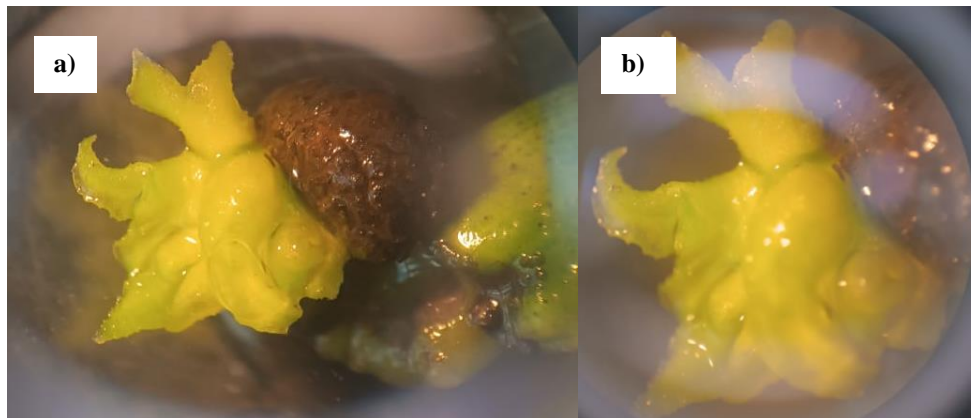


Figura 37. Brotes formados en un explante del tratamiento 2. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2X.

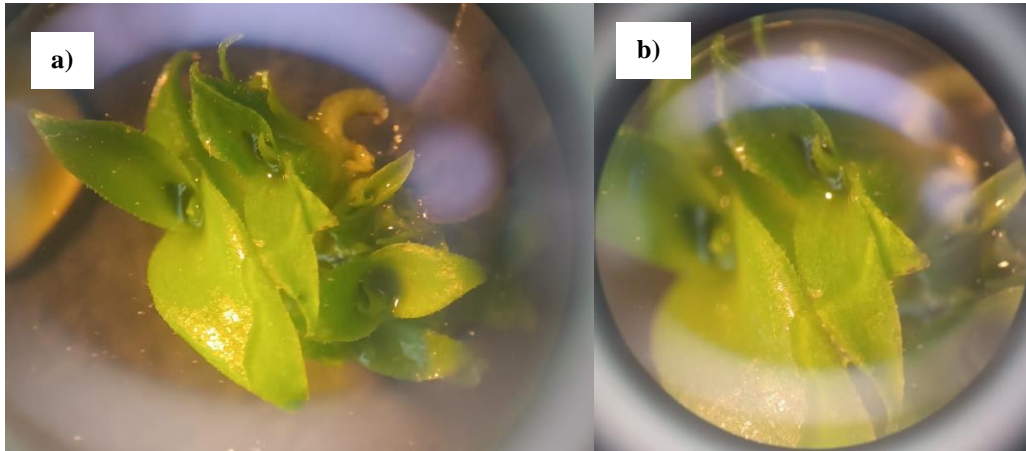


Figura 38. Brotes formados en un explante del control. a) Zoom de 1X. b) Zoom de 2X.

Regresando a los tratamientos de la tabla 9, es posible darse cuenta de que la formulación que más explantes con respuesta generó en términos absolutos fue el tratamiento 8 (tabla 10). Sin embargo, para comparar la cantidad media de explantes con respuesta por repetición se llevó a cabo un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor mediante el software STATGRAPHICS 18, considerándose un nivel de confianza del 95%. Al hacer esto se encontró que, efectivamente, las desviaciones estándar de cada tratamiento no presentaban una diferencia estadísticamente significativa entre sí, ya que la prueba de Levene arrojó un valor P de 0.8050; lo cual implica que es válido realizar un ANOVA. Asimismo, la prueba de rangos múltiples (tabla 11) indicó que, según el procedimiento de la diferencia menos significativa (LSD) de Fisher, no existen diferencias estadísticamente significativas entre ninguno de los promedios al tomar en cuenta un nivel de confianza del 95%. Esto se ilustra en la figura 39.

Tabla 10. Total de explantes con respuesta por tratamiento.

Tratamiento	Total de explantes con respuesta	Promedio de explantes con respuesta por repetición
1	6	0.6
4	6	0.6
6	6	0.6
7	5	0.5
8	8	0.8

Tabla 11. Comparación entre la cantidad media de explantes con respuesta por repetición de cada tratamiento.

Comparación	Significancia estadística	Diferencia
Tratamiento 1 - Tratamiento 4	No	0
Tratamiento 1 - Tratamiento 6	No	0
Tratamiento 1 - Tratamiento 7	No	0.1
Tratamiento 1 - Tratamiento 8	No	-0.2
Tratamiento 4 - Tratamiento 6	No	0
Tratamiento 4 - Tratamiento 7	No	0.1
Tratamiento 4 - Tratamiento 8	No	-0.2
Tratamiento 6 - Tratamiento 7	No	0.1
Tratamiento 6 - Tratamiento 8	No	-0.2
Tratamiento 7 - Tratamiento 8	No	-0.3

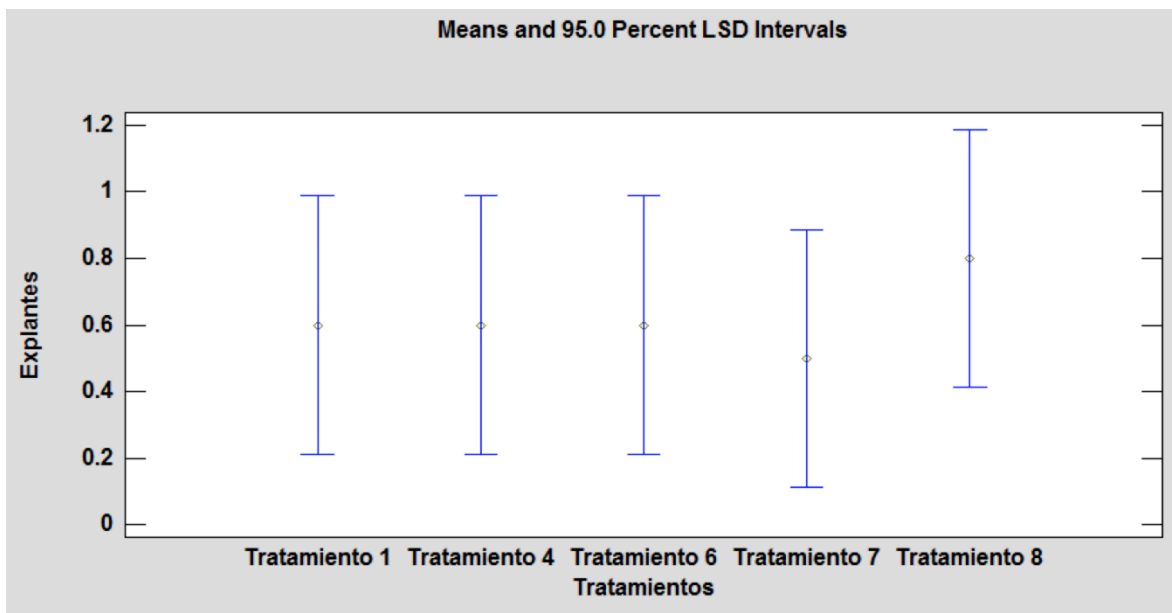


Figura 39. Gráfica que ilustra lo señalado en la tabla 11.

Frente a los resultados estadísticos obtenidos, se determinó el mejor tratamiento con base en el desarrollo que presentaban las diferentes respuestas a los 55 días. Es así que, mediante una comparación visual que se ejemplifica con el grupo de figuras que va desde la figura 32 hasta la figura 36, se plantea que la mejor formulación de medio de cultivo se encuentra en un punto entre las concentraciones de BAP y ANA que poseían los tratamientos 4 (3.0 mg/L de BAP y 1.5 mg/L de ANA) y 7 (3.0 mg/L de BAP y 1.0 mg/L de ANA); como se puede ver en la figura 33, la cual evidencia un gran desarrollo de callo; y en la figura 35, en donde se observa una abundante formación de raíces de modo indirecto. Cabe mencionar entonces que, si bien la literatura que se tomó como base para el planteamiento del diseño experimental [23, 24, 25, 26, 27, 28] es referente a metodologías para conseguir la caulogénesis directa, los presentes resultados experimentales que se muestran desde la figura 32 hasta la figura 36, así como en la tabla 9, indican claramente la rizogénesis indirecta de *A. comosus* a partir de segmentos proximales de hoja.

Ahora, como también se expone en la tabla 9, varios de los explantes con respuesta se desarrollaron en frascos en los que las microalgas estaban presentes. Dicha respuesta llegó a ser tan notable como la mostrada en la figura 40, que corresponde al explante observado al

estereoscopio en la figura 33; o la de la figura 41, en la cual se ve el explante control de la figura 38. Igualmente, en la tabla 9 se habla de turbidez, una característica que, en general, presentaba el medio de cultivo de aquellos frascos que exhibían respuesta, pero no presencia de microalgas; y que puede asociarse con la existencia de otro microorganismo contaminante diferente. Una comparativa se hace en la figura 42.



Figura 40. Desarrollo abundante de tejido calloso en un frasco del tratamiento 4 con notable presencia microalgal.



Figura 41. Desarrollo abundante de brotes en un frasco control con notable presencia microalgal.

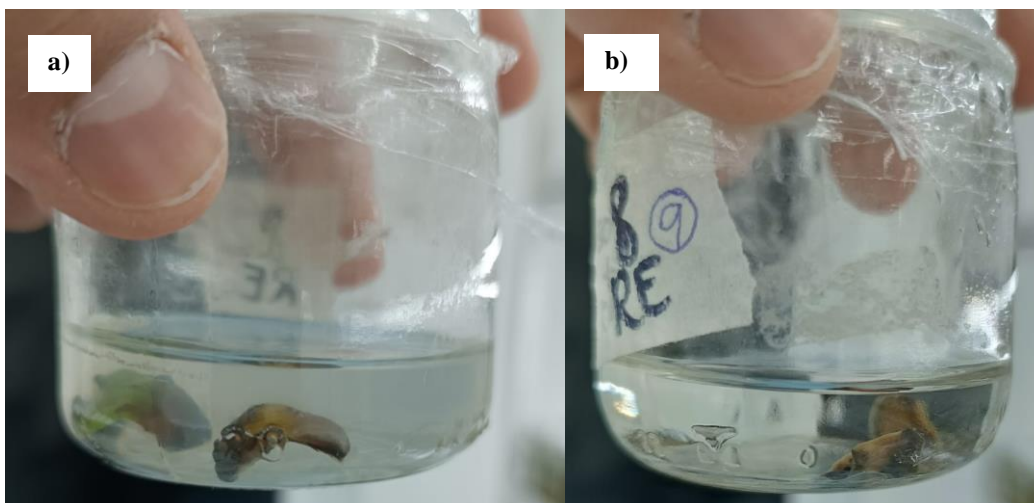


Figura 42. Frascos de cultivo sin presencia de microalgas. a) Medio de cultivo turbio en el que se desarrollaron explantes con respuesta. b) Medio de cultivo no turbio en el que no se tuvo respuesta.

A causa de estas observaciones, se decidió realizar una prueba de χ^2 con el propósito de determinar si existió una relación entre la presencia de microalgas o la turbidez con el desarrollo de una respuesta morfogénica. Para ello, debe considerarse la tabla 12, que es una tabla de contingencia donde se consideran la cantidad de explantes con respuesta que hubo en cada una de tres condiciones: medio de cultivo con presencia de microalgas, medio de cultivo turbio y medio de cultivo no turbio. Nuevamente se utilizó STATGRAPHICS 18 y un nivel de confianza de 95.0%. La prueba arrojó como resultado un valor P de 0.0000, algo que implicó que el número de explantes con respuesta depende de la condición en la que terminó el frasco de cultivo.

Tabla 12. Tabla de contingencia para la realización de la prueba de χ^2 .

Explantes	Medio de cultivo con presencia de microalgas	Medio de cultivo turbio	Medio de cultivo no turbio	<i>Total filas</i>
Con respuesta	5	23	3	<i>31</i>
Sin respuesta	22	37	60	<i>119</i>
<i>Total columnas</i>	<i>27</i>	<i>60</i>	<i>63</i>	<i><u>150</u></i>

Propagación de microalgas

Debido al fenómeno que se observó cuando las microalgas estaban presentes en los frascos de cultivo de organogénesis se decidió propagarlas de manera independiente al cultivo de *A. comosus*. Para ello, al realizar el último cambio de medio de cultivo se reservó aquel que evidenciaba la presencia de estas. Posteriormente, se preparó medio MS líquido con 30 g/L de sacarosa y pH de 5.8 ± 0.02 y sin reguladores de crecimiento. En la campana de flujo laminar se vertió este en tubos de vidrio de 50 mL estériles, colocando en cada uno 45 mL de medio. En las mismas condiciones de asepsia se inoculó cada tubo con 5 mL de suspensión de microalgas, de tal forma que se tuvo una dilución de 1:10 (figura 43). Los tubos se llevaron a incubación a 25 ± 2 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad (figura 44).

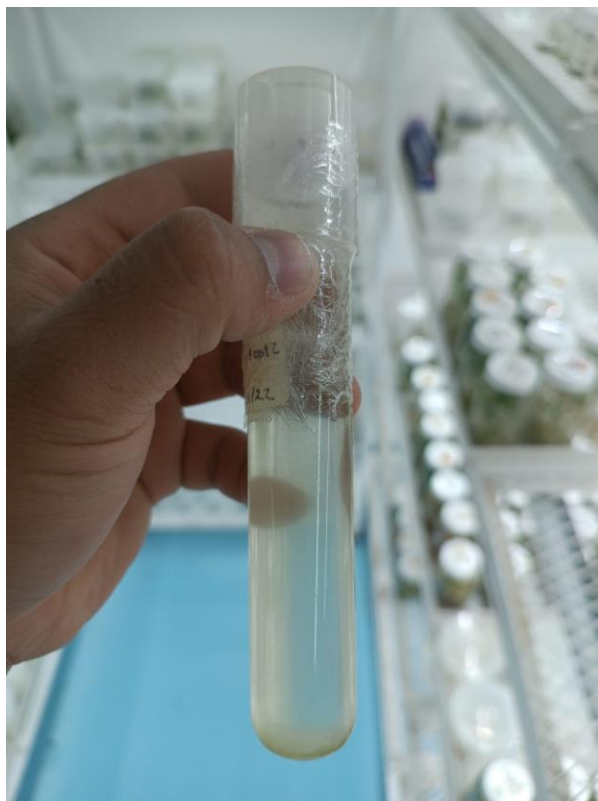


Figura 43. Tubo inoculado con la suspensión de microalgas.



Figura 44. Cultivos de microalgas en el incubador.

Cromosomas y citogenética

En el interior de las células el ácido desoxirribonucleico (ADN) no se encuentra libre, sino que está asociado a proteínas. Dicha asociación recibe el nombre de cromosoma, una estructura que puede hallarse tanto en células eucariotas como procariotas e, incluso, en virus. Los cromosomas existen por varias razones. En primer lugar, el cromosoma es una forma condensada del ADN que cabe con facilidad en la célula. Por otro lado, esta organización le confiere una enorme estabilidad al ADN protegiéndolo de lesiones y hace posible que el material genético se transmita con eficiencia a las células hijas en cada división. Finalmente, el cromosoma regula qué tan accesible se halla el ADN y, por consecuencia, también regula los procesos celulares en los que este participa [29].

Los cromosomas son estructuras en forma de bastón que se visualizan con mayor facilidad al microscopio cuando se tiñen, en las cuales los genes se encuentran ordenados linealmente a lo largo de toda su longitud y que cuentan con una constricción denominada centrómero a la que se unen las fibras del huso mitótico durante la división celular. Cada especie de ser

vivo posee un número cromosómico característico. Por ejemplo, el ser humano es un organismo diploide con un número cromosómico $2n = 46$, es decir, posee dos juegos de cromosomas, uno heredado de la madre y otro, del padre, cada uno con 23 cromosomas. Cromosomas iguales en tamaño y en posición del centrómero (cada uno de distinto juego) reciben el nombre de cromosomas homólogos [30].

El estado de los cromosomas varía según la etapa del ciclo celular. Si se comienza por hablar de la interfase se debe decir que esta posee tres fases: *gap 1* (G_1), *synthesis* (S) y *gap 2* (G_2). Es en la segunda cuando los cromosomas se replican para luego condensarse en G_2 . Posteriormente la célula pasa a la fase M, en la que sucede la división y la distribución de los cromosomas entre las células hijas. La primera parte de esta es la profase, en la que la condensación de los cromosomas continúa. Le sigue la metafase, etapa donde los cromosomas se alinean en el plano ecuatorial, que es una línea imaginaria ubicada a la mitad de la célula [30]. Precisamente, debido a este acomodo de los cromosomas es que la metafase es la etapa ideal para su observación al microscopio. Luego se tiene la anafase, en la cual los cromosomas replicados son separados en sus dos cromátidas por los microtúbulos del huso mitótico para que las dos células hijas cuenten con el mismo número de cromosomas. Por último, en la telofase los cromosomas condensados se relajan para separarse en dos células una vez llegada la citoquinesis [30].

De la gran relevancia de los cromosomas y de los avances en microscopía surge la citogenética, ciencia que estudia la estructura, función y comportamiento de estos. Se trata de un área que abarca desde la observación de los cromosomas teñidos bajo el microscopio hasta el estudio más avanzado por medio de microscopía de fluorescencia y de análisis de imagen [30].

Arresto mitótico y tinción de cromosomas

Como ya se dijo, el mejor punto del ciclo celular para la observación de los cromosomas es la metafase. Por esta razón es que en los estudios citogenéticos se recurren a inhibidores o arrestadores mitóticos, que son compuestos capaces de detener la mitosis y, consecuentemente, el ciclo celular [31]. De esta manera, su empleo incrementa el número de células en metafase y la condensación de los cromosomas. Entre dichos agentes se hallan la colchicina, la 8-hidroxiquinolina y el agua helada [32].

Una vez aplicado el arrestador mitótico, se realiza una fijación para la conservación del ácido nucleico. Comúnmente, esto puede realizarse con solución Carnoy, usada también para citogenética de células animales. Después, se necesita destruir la pared celular por medio de enzimas como celulasas y pectinasas, o bien, haciendo uso de ácido clorhídrico. Luego, los cromosomas se tiñen con un colorante afín a los nucleótidos como el acetocarmín, el lactopropiónico, la acetorceína y el fulgen. Por último, se presiona la muestra para que las células se expandan (lo cual es posible gracias a la previa desintegración de la pared celular) y así se encuentren listas para su observación al microscopio [32].

Se debe mencionar que, como podría deducirse, los mejores tejidos para la obtención de células en mitosis son aquellos que se encuentran en constante división. En el caso de las plantas, estos tejidos son los meristemas, regiones capaces de crecer y dividirse y las cuales se clasifican de acuerdo con su localización anatómica en apicales, laterales e intercalares. Los primeros se hallan en los extremos de brotes y raíces, siendo responsables del crecimiento del cuerpo primario de la planta al permitir la extensión de estos [33].

Preparación de laminillas para la observación de cromosomas de A. comosus

Empleando un bisturí no estéril se colectaron extremos de raíces jóvenes (caracterizadas por un color blanco) de plantas adultas de *A. comosus* que se hallaban en el invernadero de aclimatación de la subsede Zapopan del CIATEJ. A continuación, se siguió una metodología conseguida en la literatura [34] con ligeras modificaciones. Las raíces colectadas se

colocaron en microtubos con una solución acuosa 1:1000 del arrestador mitótico α -bromonaftaleno y se guardaron en un refrigerador a 4 °C por 24 horas. Posteriormente, el α -bromonaftaleno se retiró y se añadió solución de Carnoy compuesta de metanol y ácido acético en proporción 3:1. Las raíces volvieron a dejarse a 4 °C por 24 horas. Transcurrido este tiempo se lavaron las raíces con agua desionizada durante 10 minutos. Después, se extrajo el tejido meristemático, identificable por un color lechoso, utilizando un bisturí no estéril y se desechó el resto de la raíz. Luego, los meristemas se pusieron en microtubos con buffer de citrato 10 mM con pH de 4.5 por 10 minutos. El buffer se desechó y se colocaron 50 μ L de una mezcla enzimática conformada por pectoliasa Y23, celulasa RS y citohelicasa, todas en una concentración de 0.2% w/v y con buffer de citrato pH 4.5 como solvente. Es importante comentar que este pH es en el que las enzimas funcionan de manera óptima, siendo esta también la razón por la que las raíces se pusieron previamente en el buffer.

Los meristemas colocados en la mezcla de enzimas se llevaron a un incubador a 37 °C durante 3 horas. Tras este proceso se inició la preparación de la suspensión celular. Primeramente, el tejido fue disgregado mecánicamente haciendo uso de pinzas no estériles para posteriormente agitar los microtubos en un vórtex. Las partículas de mayor tamaño que no se disgregaron fueron retiradas con una pipeta Pasteur. Se adicionaron 600 μ L de agua desionizada a los microtubos y estos se llevaron a una microcentrífuga a 6150 \times g por 45 segundos. El sobrenadante se retiró con una micropipeta y se añadieron 600 μ L de metanol. Se volvió a centrifugar, pero ahora a 7440 \times g durante 30 segundos. El sobrenadante se desechó por decantación. Por último, se colocó un cierto volumen de metanol dependiendo del tamaño del botón celular y las suspensiones celulares resultantes se almacenaron a 4 °C hasta su uso.

Para preparar las laminillas que permitieran visualizar los cromosomas al microscopio se trabajó en una campana de extracción. En esta, se tomaron laminillas nuevas que se sumergieron en etanol al 96% para limpiarlas y enseguida introducirlas en ácido acético. Luego, una por una se tomaron del lado esmerilado con pinzas y se inclinaron levemente hacia abajo. Con una micropipeta de volumen 0.5-10 μ L se tomaron 7 μ L de suspensión

celular de *A. comosus* resuspendida de modo previo manualmente y con la misma micropipeta, los cuales se colocaron cerca de la parte esmerilada de la laminilla. Inmediatamente, se agregaron sobre la muestra dos gotas de ácido acético con una micropipeta de 10-100 μ L y se distribuyó la mezcla a lo largo de la laminilla. También de forma inmediata se expuso la cara de la laminilla con la muestra al vapor de un baño María preparado con anticipación a 55 °C por 5 segundos. Al final, las laminillas se secaron al aire dentro de la campana de extracción.

Tinción de laminillas

Para teñir las laminillas primeramente se limpiaron cubreobjetos con alcohol etílico al 96%. Tras esto, se pusieron unas gotas de acetorceína en las laminillas preparadas y luego se les colocó un cubreobjetos. El exceso de colorante se retiró con una toalla de papel. Inicialmente, la acetorceína con la que se contaba tenía muchos residuos sólidos, por lo que se filtró de la misma forma que se muestra en la figura 31, solo que sin material estéril ni condiciones asépticas. Las laminillas teñidas se guardaron en un refrigerador a 4 °C hasta su observación al microscopio.

Observación de laminillas al microscopio

Para observar los cromosomas en las laminillas se utilizó un microscopio de fluorescencia acoplado a una computadora (figura 45). Esta contaba con el software de microscopía Image-Pro AMS, el cual, entre muchas otras cosas, permite visualizar en el monitor el campo visto a través del microscopio. Con este equipo se vieron cada una de las laminillas teñidas en busca de células que mostraran cromosomas que estuvieran bien condensados y separados entre sí, de tal modo que pudiera realizarse un conteo sin mayor dificultad. Las observaciones se realizaron con todos los objetivos disponibles. Los aumentos de 5X, 10X y 20X fueron empleados para hacer una primera localización de los cromosomas (figura 46).



Figura 45. Microscopio de fluorescencia utilizado para observar las laminillas. Se encontraba acoplado a una computadora.

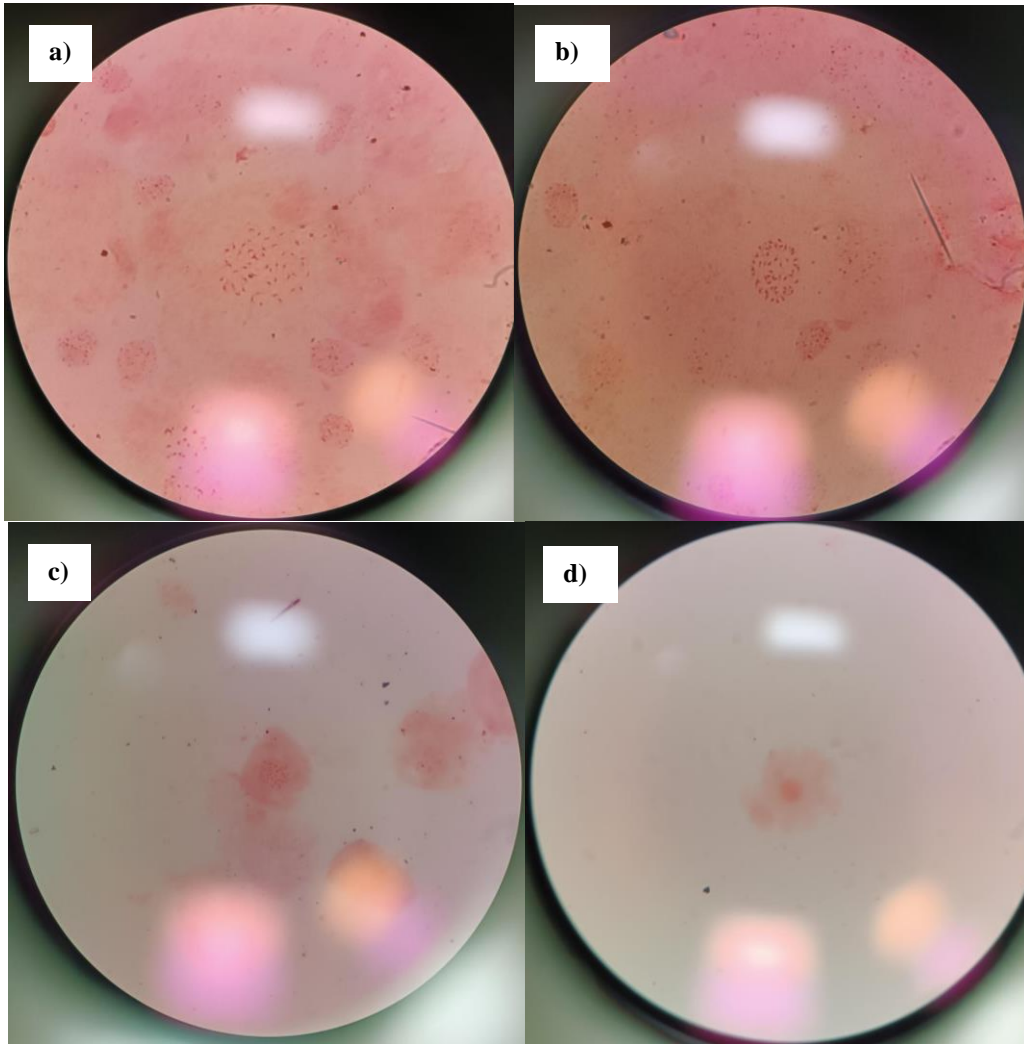


Figura 46. Observaciones hechas con el objetivo de 20X. a) Cromosomas poco condensados. b) Cromosomas con mayor condensación. c) Célula que se aprecia con cromosomas en su núcleo. d) Célula en la que no se aprecian los cromosomas.

Por su parte, los objetivos de 40X y 100x (para el cual fue necesario usar aceite de inmersión) se emplearon para tomar fotografías mediante una cámara también acoplada al microscopio que se visualizaban en el software de microscopía. Una vez que se consiguieron diez fotografías de buena calidad (figura 47) se llevó a cabo un conteo para conocer el número cromosómico de la variedad de *A. comosus* cultivada en Tomatlán.

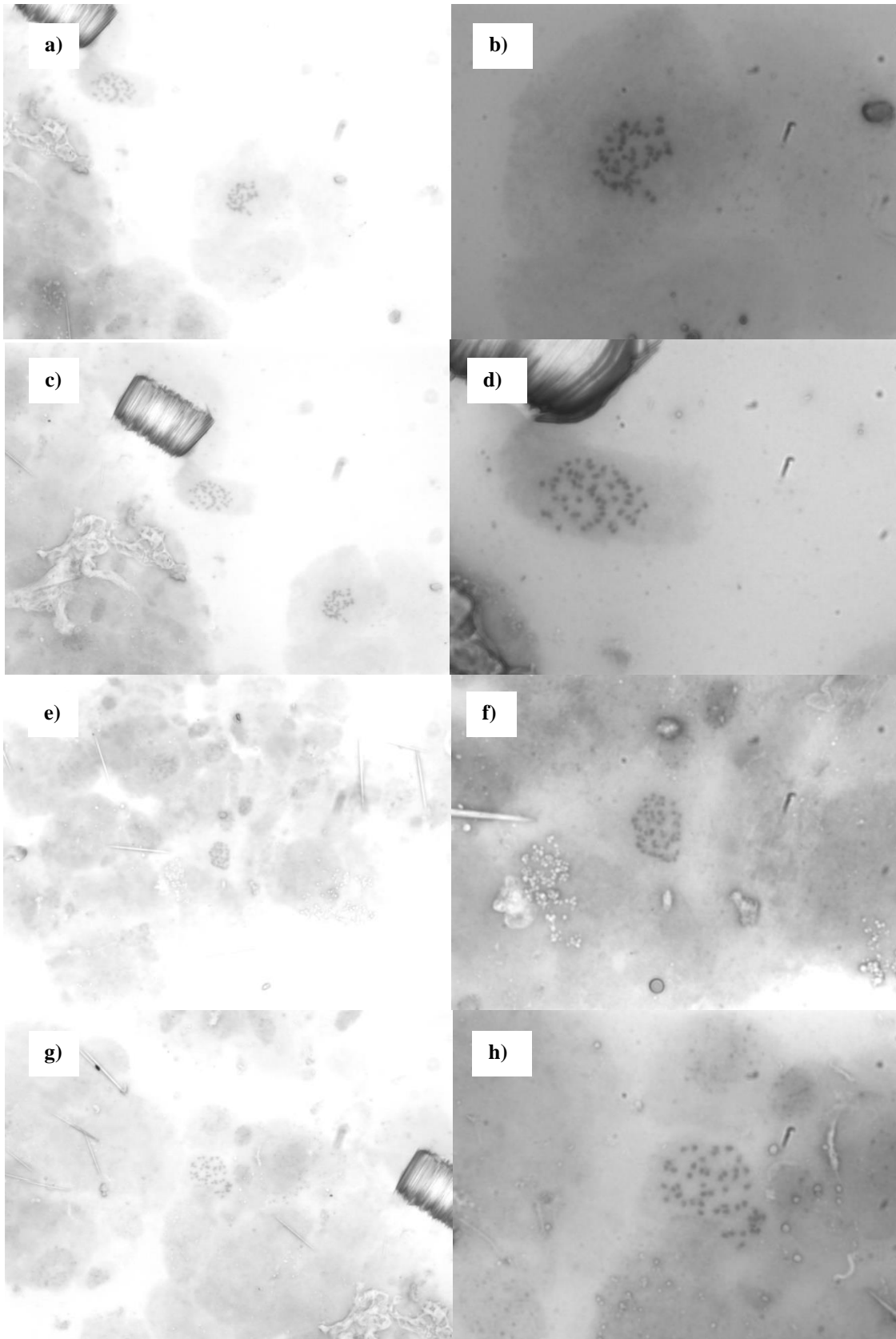


Figura 47. Fotografías tomadas con el software Image-Pro AMS. Las fotografías de la izquierda se tomaron con el objetivo de 40X; y las de la derecha, con el objetivo de 100X.

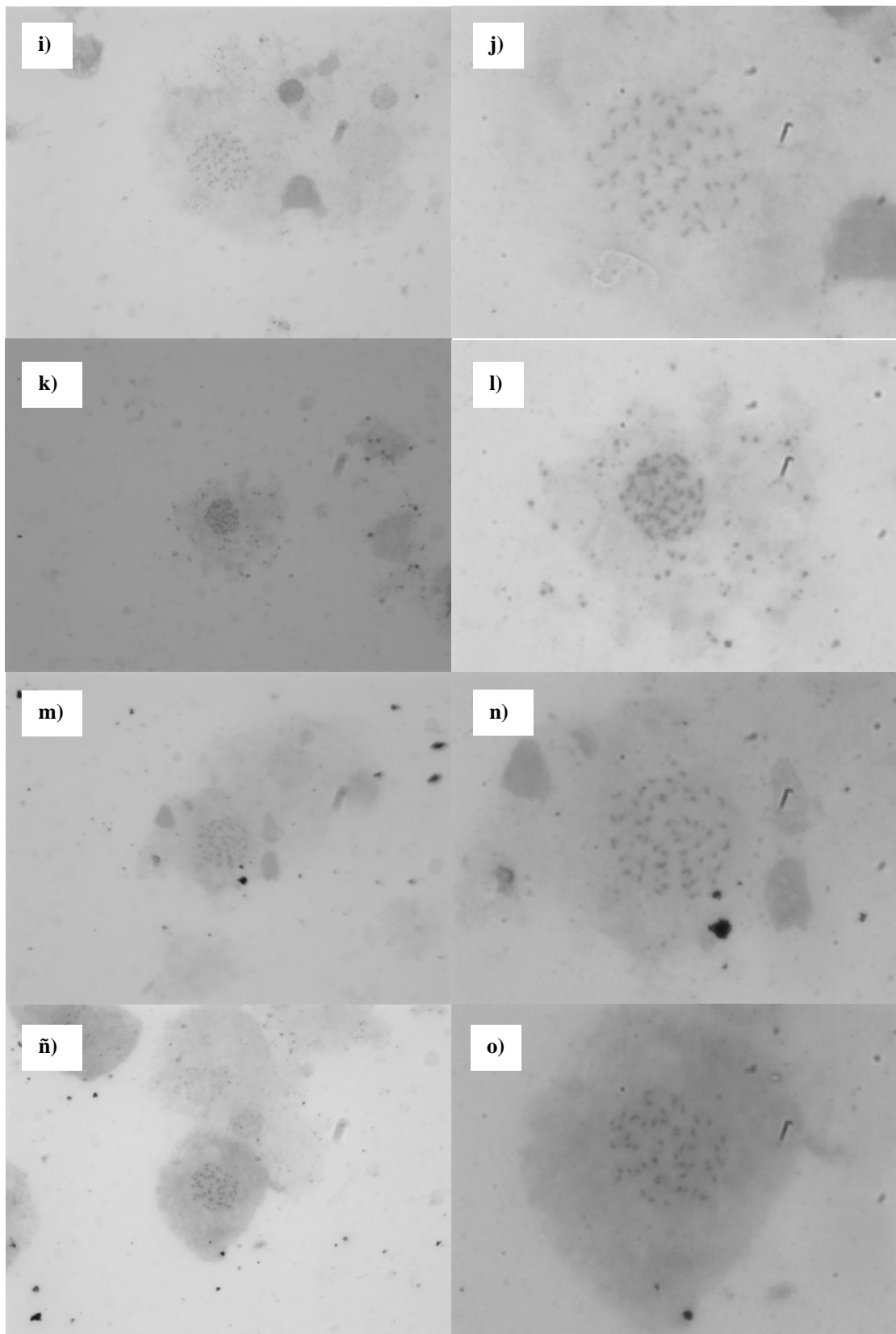


Figura 47 (continuación). Fotografías tomadas con el software Image-Pro AMS. Las fotografías de la izquierda se tomaron con el objetivo de 40X; y las de la derecha, con el objetivo de 100X.

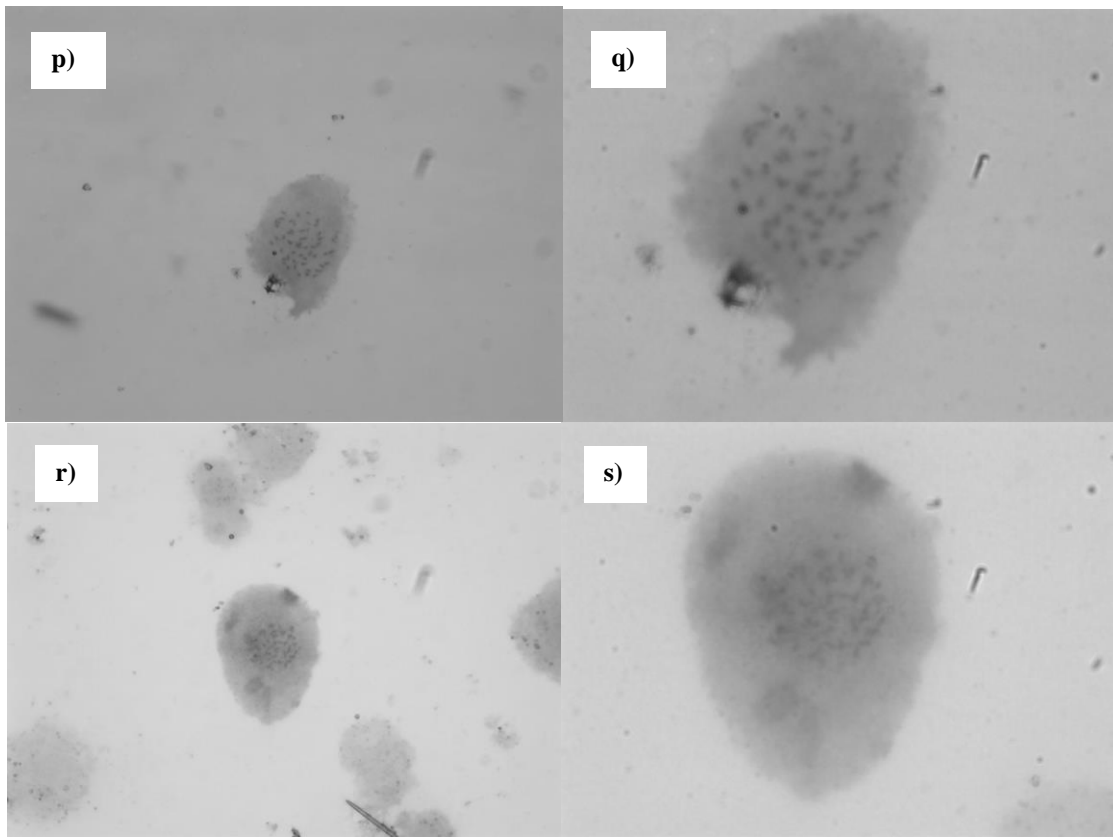


Figura 47 (continuación). Fotografías tomadas con el software Image-Pro AMS. Las fotografías de la izquierda se tomaron con el objetivo de 40X; y las de la derecha, con el objetivo de 100X.

Lo siguiente que se hizo fue introducir estas fotografías en el software de citogenética KaryoMeasure con el propósito de obtener el cariotipo y el idiograma de la variedad de *A. comosus* cultivada en Tomatlán. No obstante, los cromosomas resultaron demasiado pequeños para medirse en este programa, de manera que lo único que se realizó fue un conteo manual de los cromosomas. En la tabla 13 se muestran los resultados de dicho conteo para cada una de las fotografías que se ven en la figura 47 en orden descendente.

Tabla 13. Conteo manual del número de cromosomas para cada par de fotografías.

Fotografías	Número de cromosomas
a y b	46
c y d	50
e y f	39
g y h	49
i y j	50
k y l	47
m y n	49
ñ y o	50
p y q	50
r y s	42

Anteriormente se había mencionado que el número cromosómico normalmente reportado para *A. comosus* es $2n = 50$ [13]. Es posible percatarse que el conteo sugiere que la variedad del presente trabajo cumple con esto. Además, si bien no se hizo ningún procedimiento para determinar el nivel de ploidía, el número total de cromosomas hace pensar que la presente variedad de *A. comosus* es diploide como casi siempre sucede para los individuos de la especie.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

En cuanto a la parte de micropropagación, el trabajo con yemas axilares permitió conocer la dificultad que existe para la desinfección del tejido de *A. comosus* obtenido *ex vitro*. Esto sugiere la búsqueda o creación de otros protocolos de desinfección en los que se empleen agentes desinfectantes y/o tiempos de aplicación distintos. Por otro lado, el establecimiento *in vitro* de explantes de *A. comosus* obtenidos de material proveniente de condiciones *in vitro* y el subsecuente crecimiento de microalgas que no afectaban a las plántulas señala la existencia de microbiota que no perjudica el desarrollo *in vitro*. De hecho, se sabe que en la microbiota que poseen la plantas se encuentran, además de procariotas, hongos, virus y viroides, algas [16]. Al mismo tiempo, se comprobó que el protocolo implementado para la fase de establecimiento *in vitro* de la micropropagación de *A. comosus* a través de yemas axilares brinda resultados considerablemente buenos cuando no se utiliza un medio de cultivo con nanopartículas de plata.

En el caso del procedimiento de organogénesis, igualmente se reveló la relación entre el tejido de *A. comosus* y las microalgas. De hecho, mostró el papel que estas pueden

desempeñar en la respuesta morfogénica, ya que, como se ve en la figura 38, su presencia puede llevar a una respuesta bastante prolífica. Este hecho se respalda en trabajos anteriores efectuados en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la subsede Zapopan del CIATEJ, en los cuales utilizando hidrolizados de microalgas se han obtenido muy buenos resultados en la micropropagación de ciertas especies.

Si bien el resultado esperado de caulogénesis directa (que es lo obtenido en la literatura usada como base del diseño experimental) no se consiguió, se obtuvieron un par de formulaciones que conducen a la rizogénesis indirecta. Las raíces de *A. comosus* obtenidas se pueden someter entonces a una fase de formación de brotes, para lo que se necesitaría hacer un nuevo diseño experimental de manera que las vitroplantas pueden llevarse a la etapa de adaptación o aclimatación en condiciones *ex vitro*, luego de la cual se tendrían finalmente plantas aptas para la producción agrícola de piña.

Los resultados de micropropagación pueden ser usados para establecer un protocolo completo para la propagación masiva de la variedad de *A. comosus* cultivada en Tomatlán, Jalisco, dado que brindan concentraciones de BAP y ANA ideales para la organogénesis. Además, lo observado en ambos experimentos permite conocer la relación benéfica con las microalgas, de manera que a la hora de crear nuevos protocolos de desinfección se evite la inversión de recursos y tiempo en la búsqueda de agentes capaces de eliminarlas y los esfuerzos se enfoquen en el resto de contaminantes frecuentes encontrados en el tejido de *A. comosus* obtenido *in vitro* o *ex vitro*.

La metodología para rizogénesis indirecta o, incluso, el mismo material vegetal producido podría ser retomado en futuros trabajos para crear el protocolo completo de micropropagación de la variedad de *A. comosus* cultivada en Tomatlán, Jalisco, de modo que se impulse la producción de piña en este municipio; especialmente a través de la eliminación o disminución del gasto que implica la compra del material vegetal a productores del sureste mexicano. Igualmente, en un próximo trabajo podría volverse a experimentar con yemas axilares de *A. comosus* para crear un diseño experimental que permita su proliferación, es

decir, que haga posible la etapa de multiplicación o, inclusive, que genere el resto de un protocolo de micropropagación basado en esta estrategia de cultivo de tejidos vegetales.

Respecto a la parte de citogenética, la determinación del número de cromosomas de la variedad de *A. comosus* cultivada en Tomatlán abre las puertas a experimentos de mejoramiento genético. Una técnica con potencial en este caso podría ser la poliploidización, en la que se usan arrestadores mitóticos para generar un doblamiento cromosómico. Entre sus beneficios se hallan el enmascaramiento de genes recesivos perjudiciales y el aumento de tamaño de los órganos vegetales [35].

1.7. Bibliografía y otros recursos

- ^[1] CIATEJ, «Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible,» [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>. [Último acceso: 2 February 2023].
- ^[2] ffffff. [En línea].
- ^[3] CIATEJ, «Biotecnología vegetal,» [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>. [Último acceso: 2 February 2023].
- ^[4] A. Vélez-Izquierdo, J. A. Espinosa-García, J. Uresti-Gil, J. L. Jolalpa-Barrera, J. Rangel-Quintos y D. Uresti-Duran, «Estudio técnico-económico para identificar áreas con potencial para producir piña en el trópico húmedo de México,» *Revista Mexicana Ciencias Agrícolas*, vol. 11, n° 7, pp. 1619-1632, 2020.
- ^[5] N. Gutiérrez, «SADER Jalisco impulsará cultivo in vitro de piña en la región costa,» 4 August 2020. [En línea]. Available: <https://sader.jalisco.gob.mx/prensa/noticia/3110#:~:text=Tomatl%C3%A1n%20ocupa%20el%20d%C3%A9cimo%20lugar,de%20la%20exportaci%C3%B3n%20de%20pi%C3%B1a..> [Último acceso: 3 March 2023].
- ^[6] S. A. Hinojosa Huizar, M. A. Guzmán Noguera y G. Arroyo Kuribreña, «Laboratorio de micropropagación para el centro de desarrollo tecnológico Tezocuya,» Banco de México, 2012.
- ^[7] J. M. Seguí Simarro, *Biología y biotecnología reproductiva de las plantas*, Valencia : Universitat Politècnica de València, 2010.
- ^[8] CIATEJ, «Subsede Zapopan,» [En línea]. Available: <https://ciatej.mx/el-ciatej/sede/zapopan>. [Último acceso: 3 March 2023].
- ^[9] TerraMetrics, «CIATEJ Zapopan,» Google, 2023. [En línea]. Available: <https://www.google.com/maps/place/CIATEJ+Zapopan/@20.6772958,-103.4168886,25359m/data=!3m1!1e3!4m6!3m5!1s0x8428a92017ebb535:0xe99c008fb>

942ccea!8m2!3d20.7012189!4d-103.4743952!16s%2Fg%2F11b6xh84m_. [Último acceso: 29 April 2023].

- [10] N. Wali, «Pineapple (Ananas comosus),» de *Nonvitamin and Nonmineral Nutritional Supplements*, Academic Press, 2019, pp. 367-373.
- [11] Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural, «Crece 16.2% producción de piña en México durante 2020,» 29 March 2021. [En línea]. Available: [https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crece-16-2-produccion-de-pina-en-mexico-durante-2020?idiom=es#:~:text=Pesquera%20\(SIAP\).- ,La%20Secretar%C3%ADa%20de%20Agricultura%20y%20Desarrollo%20Rural%20report%C3%B3%20que%20M%C3%A9xico,comparaci%C3%B3n%20con%20el.](https://www.gob.mx/agricultura/prensa/crece-16-2-produccion-de-pina-en-mexico-durante-2020?idiom=es#:~:text=Pesquera%20(SIAP).- ,La%20Secretar%C3%ADa%20de%20Agricultura%20y%20Desarrollo%20Rural%20report%C3%B3%20que%20M%C3%A9xico,comparaci%C3%B3n%20con%20el.) [Último acceso: 2 February 2023].
- [12] Directorate of Plant Protection, Quarantine & Storage, «IPM package of practices for pineapple (for producing quality fruits for export),» Directorate of Plant Protection, Quarantine & Storage, Faridabad, 2022.
- [13] S. Parveen, H. Mir, T. Ranjan, A. K. Pal y M. Kundu, «Effect of surface sterilants on in vitro establishment of pineapple (Ananas comosus (L.) Merrill.) cv. Kew,» *Current Journal of Applied Science and Technology*, vol. 33, n° 2, pp. 1-6, 2019.
- [14] kiokoko.
- [15] J. J. Castañeda Nava y E. Lazcano Díaz, «Los sistemas de inmersión temporal una alternativa para la micropropagación,» de *Tópicos de herramientas biotecnológicas para el desarrollo agrícola*, Guadalajara, CIATEJ, 2021, pp. 28-35.
- [16] L. Kyte, J. Kleyn, H. Scoggins and M. Bridgen, *Plants From Test Tubes. An Introduction to Micropropagation*, Portland: Timber Press, 2013.
- [17] R. Ifthikar, *Recent Advances in Plant in Vitro Culture*, Ashland: Delve Publishing, 2019.
- [18] Center for pathobiochemistry and genetics Medical University of Vienna, «Cytogenetics,» [En línea]. Available: <https://pbg.meduniwien.ac.at/en/for-patients-and-referring-physicians/cytogenetics/>. [Último acceso: 3 March 2023].
- [19] J. A. Guzmán Nava, *Optimización de un medio de cultivo para la germinación in vitro de semillas de Drosera capensis*, Piedras Blancas: Universidad Autónoma del Estado de México, 2018.
- [20] J. M. Rodríguez Domínguez, J. J. Castañeda Nava, F. O. del Toro de la Cruz, A. Gutiérrez Mora y A. P. Plaza Ávila, *Manual de Prácticas de Laboratorio para la Micropropagación de Plantas*, Guadalajara: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 2021.
- [21] A. I. Bautista-Castellanos, J. R. Enríquez-del Valle, V. A. Velasco-Velasco y G. Rodríguez-Ortiz, «Enraizado de brotes in vitro y aclimatación de plantas de Agave potatorum Zucc.,» *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, vol. 7, n° 3, pp. 1-13, 2020.
- [22] S. Guillén-Rodríguez, C. Cruz-López, J. G. Martínez-Ávalos y A. Martínez-Palacios, «Efecto de N6-benciladenina y Fotoperiodo en la Floración de Protocormos in vitro de Bletia urbana (orchidaceae),» *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 45, n° 4, pp. 475-482, 2022.

- [²³] S. Sripaoraya, R. Marchant, J. B. Power and M. R. Davey, "Plant regeneration by somatic embryogenesis and organogenesis in commercial pineapple (*Ananas comosus* L.)," *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, vol. 39, pp. 450-454, 2003.
- [²⁴] E. Firoozabady and Y. Moy, "Regeneration of Pineapple Plants Via Somatic Embryogenesis and Organogenesis," *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, vol. 40, no. 1, pp. 67-74, 2004.
- [²⁵] R. M. Hamasaki, E. Purgatto and H. Mercier, "Glutamine Enhances Competence for Organogenesis in Pineapple Leaves Cultivated in vitro," *Brazilian Journal of Plant Physiology*, vol. 17, no. 4, pp. 383-389, 2005.
- [²⁶] F. Farahani, "MICROPROPAGATION AND GROWTH OF IN VITRO PINEAPPLE (*ANANAS COMOSUS* L. MERR) IN IRAN," *Plant Archives*, vol. 14, no. 1, pp. 337-341, 2014.
- [²⁷] A. Awal, N. Nor Fazilah, M. P. Azvin, M. Najwa, A. Shamsiah and J. S. Norrizah, "MICROPROPAGATION OF PINEAPPLE (*ANANAS COMOSUS* L. MERR. 'JOSAPINE')," in *XXVIII International Horticultural Congress on Science and Horticulture for People (IHC2010): International Symposium on Micro and Macro Technologies for Plant Propagation and Breeding in Horticulture*, 2011.
- [²⁸] C. A. Chacín Zambrano, Y. P. Quintero Avila, L. G. Rodríguez González y J. A. Gómez Santos, «Evaluación del crecimiento in vitro de explantes de piña perolera (*Ananas comosus*) usando la técnica de organogénesis,» *Revista Colombiana de Investigaciones Agroindustriales*, vol. 7, n° 2, pp. 32-39, 2020.
- [²⁹] J. D. Watson, T. A. Baker, S. P. Bell, A. Gann, M. Levine y R. Losick, *Biología Molecular del Gen*, Ciudad de México: Editorial Médica Panamericana, 2016.
- [³⁰] C. Natividad, Título: *Genetics, Molecular Biology, Cell Biology, Ecology, and Evolution*, Oakville: Delve Publishing, 2020.
- [³¹] National Cancer Institute, "Mitotic Inhibitor," National Institutes of Health, [Online]. Available: <https://www.cancer.gov/publications/dictionaries/cancer-terms/def/mitotic-inhibitor>. [Accessed 7 May 2023].
- [³²] G. C. Ciprián Salcedo, *Niveles de Ploidía de Plantas Androgénicas de Aguaymanto (*Physalis peruviana* L.) Asociado a Caracteres Citogenéticos y Morfológicos*, Lima: Universidad Nacional Agraria, 2022.
- [³³] Encyclopædia Britannica, "Meristem," Encyclopædia Britannica, 17 March 2020. [Online]. Available: <https://www.britannica.com/academic-eb-com.ezproxy.iteso.mx/levels/collegiate/article/meristem/52139>. [Accessed 7 May 2023].
- [³⁴] J. Rodríguez-Domínguez, L. Ríos-Lara, E. Tapia-Campos and R. Barba-Gonzalez, "An Improved Technique for Obtaining Well-spread Metaphases from Plants with Numerous Large Chromosomes," *Biotechnic & Histochemistry*, vol. 92, no. 3, pp. 159-166, 2017.
- [R. Barba González, «Herramientas Biotecnológicas para el Mejoramiento Genético de 3 Plantas Ornamentales, con Énfasis en la Poliploidización,» de *Tópicos de Herramientas 5 Biotecnológicas para el Desarrollo Agrícola*, Guadalajara, CIATEJ, 2021, pp. 63-72.]

1.8. Anexos generales

No se cuenta con anexos.

2. Productos

A través de un diseño experimental y del cultivo de explantes de secciones proximales de hojas se obtuvo un protocolo que permite la micropropagación de la variedad de *A. comosus* cultivada en Tomatlán. Asimismo, mediante citogenética tradicional se consiguió el número cromosómico de dicha variedad. Esta información se comunicó al CIATEJ, haciéndose entrega, además del presente trabajo. No existen conflictos por confidencialidad debido a que no se trata de un trabajo hecho para una empresa privada.

Ficha descriptiva de: protocolo de organogénesis.

Nombre y código del PAP	4G03A Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos de piña miel (<i>Ananas comosus</i>) realizados en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Protocolo que permite la micropropagación de la variedad de <i>A. comosus</i> cultivada en Tomatlán. Incluye la formulación del medio de cultivo y las concentraciones de reguladores de crecimiento, así como los procedimientos que deben seguirse para hacer el cultivo <i>in vitro</i> . Se encuentra destinado para su uso por el CIATEJ.
Autores:	Ramón Efrén Espinoza Sosa

Ficha descriptiva: Información del número cromosómico

Nombre y código del PAP	4G03A Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos I
-------------------------	---

Nombre del proyecto	Micropropagación y estudios citogenéticos de piña miel (<i>Ananas comosus</i>) realizados en el CIATEJ
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Información sobre el número total de cromosomas, así como de la cantidad de juegos de cromosomas. Está destinada a ser usada por el CIATEJ.
Autores:	Ramón Efrén Espinoza Sosa

Los productos en sí ya vienen contenidos en el presente trabajo.

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

El RPAP tiene también como propósito documentar la reflexión sobre los aprendizajes en sus múltiples dimensiones, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto para compartir una comprensión crítica y amplia de las problemáticas en las que se intervino.

3.1 Sensibilización ante las realidades

A lo largo de la realización de mi PAP pude percatarme de que a través de la carrera que estoy estudiando puedo ayudar a resolver problemáticas regionales. En este caso, me percaté que mi trabajo de una u otra forma terminaría ayudando a los productores de piña miel de la costa jalisciense a reducir sus gastos de producción, a contar con una mayor cantidad de material vegetal disponible para la actividad agrícola y a tener la posibilidad, en un futuro cercano, de mejorar a nivel genético la variedad que trabajan así como al desarrollo de la biotecnología vegetal en esta región.

Por otro lado, el trabajo en el laboratorio de un centro de investigación me hizo darme cuenta de la importancia de tener respeto por el trabajo de los demás. En más de una ocasión me enteré que algunas personas movían material experimental, apagaban equipos o dejaban desorden en las área de trabajo, lo que claramente entorpecía el trabajo de todos. También pude ver la importancia de descontaminar el material que presentara crecimiento de

microorganismos. En mi caso, terminé trabajando indirectamente las microalgas, por lo que cada vez que utilizaba la campana de flujo laminar la esterilizaba por medio de luz ultravioleta, dado que la que utilizaba estaba destinada a trabajar tejidos vegetales y no microorganismos; de no haber hecho la esterilización habría arriesgado los cultivos de otras personas que emplearan el equipo.

Honestamente, el trabajo a lo largo de todo el PAP me hizo sentirme fascinado, no solo por el gusto hacia lo que hacía, sino por la idea de cómo un ingeniero en biotecnología puede incidir en escenarios que a muchas personas les pueden parecer muy comunes, como lo es el sector agrícola.

3.2 Aprendizajes logrados

El desarrollo del protocolo de organogénesis me permitió darme cuenta de que soy capaz de establecer un diseño experimental e interpretar los resultados por medio de la estadística. Esto implicó también un gran reto en el sentido de que nunca antes había trabajado con un experimento tan grande, lo que me hizo ver la cantidad de tiempo que se requiere cuando verdaderamente se desea obtener un resultado de utilidad. Asimismo, los diferentes cuestionamientos que se me presentaron a lo largo de este experimento me llevaron a la necesidad de buscar estrategias para conseguir la información que quería aun cuando se presentaba algo imprevisto.

Los procedimientos de micropropagación en sí me permitieron trabajar con agentes desinfectantes nuevos, con medios de cultivo tanto sólidos como líquidos y llevar a cabo cambios de medio. Estas experiencias en laboratorio me permitieron ampliar mucho los aprendizajes que había obtenido en la asignatura de Cultivo de Células y Tejidos Vegetales del programa de Ingeniería en Biotecnología del ITESO.

Por otro lado, los estudios citogenéticos fueron algo completamente nuevo para mí. Entonces, terminé el PAP sabiendo realizar procedimientos de citogenética tradicional de células vegetales.

3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP).

	Competencia	Evidencia	Relevancia/Fortaleza *	Competencias nuevas	Competencias potencializadas		
<p>Categoriza las competencias en conocimientos, habilidades y actitudes.</p> <p>Escribe la o las evidencias de cada competencia y su relevancia.</p>	Conocimientos	Uso de material de laboratorio.	Prácticas y proyectos realizados en distintas asignaturas.	El uso adecuado del material es necesario para obtener resultados experimentales confiables.	Trabajo con medios de cultivo líquidos	Preparación de medios de cultivo	
		Preparación de soluciones y medios de cultivo.	Prácticas y proyectos realizados en distintas asignaturas.	Las preparaciones a las concentraciones correctas son necesarias para que los experimentos se lleven a cabo de la manera en la que se tienen planeados.	Elaboración de soluciones stock de medio MS	Uso del autoclave	Trabajo en campana de flujo laminar
		Técnicas de asepsia.	Prácticas y proyectos realizados en distintas asignaturas.	Poseer correctas técnicas de asepsia permite trabajar con cultivos de distintos tipos sin que estos se contaminen.	Elaboración de soluciones de reguladores de crecimiento	Siembra de explantes vegetales	Diseño experimental
		Técnicas químicas para la cuantificación de sustancias.	Prácticas y proyectos realizados en distintas asignaturas.	La cuantificación de sustancias como metabolitos, así como de células, a través de métodos como la espectrofotometría, la gravimetría y la microscopía es necesaria para el análisis de los resultados experimentales.	Desinfección de explantes con PPM y con nanopartículas de plata	Monitoreo de experimentos	Análisis estadístico
		Conocimientos matemáticos y uso de software.	Asignaturas cursadas en las que se trabaja con estos.	La aplicación de los conocimientos matemáticos en programas como Excel y MATLAB es necesaria para el análisis de datos en una	Esterilización por filtración	Uso del microscopio	
						Cambios de medio de cultivo	
				Desinfección de explantes previamente establecidos <i>in vitro</i>			
				Elaboración de suspensiones celulares con			

				gran cantidad de ocasiones.	arrestador mitótico	
Habilidades	Diseño de experimentos .	Asignatura completamente en torno a esto y proyectos de otras asignaturas.	Realizar un diseño de experimentos es una parte esencial del planteamiento de una investigación.		Elaboración de laminillas para la observación de cromosomas	
	Relación de resultados de laboratorio con modelos matemáticos.	Prácticas y proyectos realizados en distintas asignaturas.	Establecer una relación entre resultados obtenidos en el laboratorio por medio de un modelo matemático es esencial para la predicción de otros valores, para el manejo en software, para el escalamiento, etc.		Observación de cromosomas al microscopio para la determinación de su número	
	Interpretación de resultados.	Prácticas y proyectos realizados en distintas asignaturas.	Interpretar los resultados con base en la teoría establecida permite comprender lo sucedido tras la experimentación.		Uso de software de microscopía	
	Comparación de los resultados obtenidos con la bibliografía.	Trabajos realizados en distintas asignaturas.	Contrastar los resultados propios con los de otros autores permite interpretar mejor el significado de los primeros para la emisión de conclusiones y para situarlos en un contexto global.		Conteo de cromosomas	
	Toma de decisiones.	Proyectos en asignaturas como Cinética química y biológica	Decidir cuáles son las acciones por ejecutar tras el análisis de los resultados es indispensable para llevar a cabo una nueva experimentación que permita continuar con el trabajo.			
	Actitudes	Trabajo en equipo.	Trabajo hecho en todas las asignaturas de la carrera.	Ser capaz de trabajar en equipo es indispensable cuando hacerlo de forma		

			individual sería poco viable.		
	Responsabilidad.	Trabajos entregados en diferentes asignaturas.	Realizar el trabajo de manera responsable es un factor crucial al momento de cumplir con los objetivos establecidos y con la calidad deseada.		
	Puntualidad.	Trabajos entregados en diferentes asignaturas.	Entregar el trabajo de manera puntual es necesario para cumplir con el calendario establecido y así no requerir de tiempo que no estaba originalmente asignado para ello.		
	Análisis objetivo y crítico de la situación	Trabajo hecho en todas las asignaturas de la carrera.	Saber analizar la situación en la que el curso del trabajo se encuentra tras la aparición de un problema es necesario para encontrar la solución adecuada.		
	Empatía	Trabajos en equipo hechos en distintas asignaturas.	La empatía es un elemento esencial de la inteligencia emocional para llevar a cabo un buen trabajo en equipo.		