

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN DINÁMICA CELULAR

“Establecimiento de la embriogénesis gamética de *Euphorbia pulcherrima* y *Echeveria* para la obtención de variedades vegetales por el método de dobles haploides”

TESIS PROFESIONAL PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRÍA EN CIENCIAS

PRESENTA:

DIEGO ARMANDO FLORES BAUTISTA

DIRECTOR: Dr. NELSON AVONCE VERGARA

SINODALES: Dra. VERÓNICA LIRA RUAN  
Dr. IVÁN MARTÍNEZ DUNCKER RAMÍREZ  
Dr. LUIS CÁRDENAS TORRES  
Dra. CLAUDIA DÍAZ CAMINO

CUERNAVACA, MORELOS

NOVIEMBRE , 2023

# Resumen

México es uno de los principales países productores de flores en Latinoamérica, algunas de las especies mexicanas que tienen gran importancia en esta actividad son *Echeveria* y *Euphorbia pulcherrima*. La generación de nuevas variedades mexicanas favorece la protección de las especies endémicas en sus hábitats naturales, además de evitar el pago de regalías a empresas extranjeras con lo que se reducen los costos de producción. Una alternativa para la generación acelerada de nuevas variedades genéticamente estables es la aplicación de la tecnología de dobles haploides mediante la técnica de androgénesis, sin embargo, esta requiere de la estandarización de un protocolo de androgénesis específico para cada especie. Con el objetivo de estandarizar protocolos de androgénesis para *Echeveria* y *E. pulcherrima*, en este proyecto se utilizaron 4 especies de *Echeveria* y 7 variedades de *E. pulcherrima*. Los resultados principales de este proyecto fueron la obtención de un protocolo de androgénesis mediante la utilización de anteras para una de las especies de *Echeveria*, una solución para la extracción de tétradas y la solución de extracción de núcleos de hojas de *Echeveria* para citometría. Además de la descripción de los tamaños de las tétradas de las especies utilizadas.

# Índice

Resumen	2
Índice	3
Tabla de abreviaciones	6
1.- Introducción	8
1.1.- Estructura floral	8
1.2.- Pasado y presente de la importancia de las flores para la sociedad	9
1.3.- La floricultura como actividad económica en México	11
1.4.- Características de <i>Echeveria</i> y <i>E. pulcherrima</i>	12
1.5.- Variedades vegetales y su importancia	14
1.6.- Métodos utilizados para la creación de nuevas variedades de <i>Echeveria</i> y <i>E. pulcherrima</i>	15
1.7.- TDH y su importancia en la investigación vegetal	16
1.8.- Metodología para crear PDH mediante la embriogénesis gamética	17
1.9.- Embriogénesis vegetal y tipos de embriogénesis	20
1.10.- Tipos de embriogénesis gamética	20
1.11.- Estados de desarrollo del polen	21
1.12.- Desarrollo de un embrión vegetal	23
1.13.- El uso de hormonas vegetales en la inducción de la embriogénesis	24
2.- Antecedentes	26
3.- Justificación	29
4.- Hipótesis	29
5.- Objetivos	30
5.1.- Objetivo general	30
5.2.- Objetivos particulares	30
6.- Metodología	31
6.1.- Condiciones de cultivo de las plantas parentales de <i>Echeveria</i>	31

6.2.- Condiciones de cultivo de las plantas parentales de <i>E. pulcherrima</i>	31
6.3.- Caracterización del desarrollo del grano de polen basado en el tamaño del capullo floral de <i>Echeveria</i> (cfE) y el ciato de <i>E. pulcherrima</i> (cEp)	33
6.4.- Esterilización de los cfE y los cEp	34
6.5.- Extracción de células haploides de los cfE y los cEp	35
6.6.- Inducción a la embriogénesis gamética de anteras de <i>Echeveria</i>	36
6.7.- Inducción a la embriogénesis gamética de tétradas de <i>Echeveria</i>	36
6.8.- Uso de citometría de flujo para la identificación de callos haploides desarrollados a partir de anteras de <i>Echeveria</i>	37
6.9.- Diferenciación y desarrollo de los callos obtenidos de anteras de <i>Echeveria</i>	38
6.10.- Estadística de los datos obtenidos	39
7.- Resultados	40
7.1.- Análisis de la relación entre el estado de desarrollo del polen y el tamaño de los cfE y los cEp	40
7.2.- Tinción del material genético en el desarrollo del grano de polen en los cfE y los cEp	44
7.3.- Estimación del tamaño de las tétradas de <i>Echeveria</i> y <i>E. pulcherrima</i>	47
7.4.- Cuantificación de la eficiencia de los medios para la extracción de tétradas de <i>E. caribbean blue</i>	49
7.5.- Formación de callos obtenidos a partir del cultivo de anteras de <i>E. caribbean blue</i>	54
7.6.- Diferenciación de los callos de <i>E. caribbean blue</i>	57
7.7.- Estandarización de la extracción de núcleos de <i>E. caribbean blue</i>	60
7.8.- Estimación del contenido nuclear de <i>E. caribbean blue</i>	63

7.9.- Protocolo de embriogénesis gamética (androgénesis ) en <i>E. caribbean blue</i>	66
8.- Discusión de resultados	71
8.1.- Permeabilización del grano de polen	71
8.2.- Desarrollo del gameto e identificación de tétradas de Euphorbia y Echeveria	73
8.3.- Variabilidad en la formación de callos en medios de inducción a la embriogénesis	77
8.4.- Endo ploidía en el género Echeveria	77
8.5.- El papel de la concentración de auxinas y citocininas en la diferenciación de los callos de <i>E. caribbean blue</i>	80
9.- Conclusiones	82
10.- Bibliografía	84

## Tabla de abreviaciones

Abreviación	Significado
2,4-D	Ácido 2,4-diclorofenoxiacético
6-BAP	6-bencilaminopurina
cfE	Capullos florales de <i>Echeveria</i>
cEp.	Ciotos de <i>Euphorbia pulcherrima</i>
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
<i>E. caamani</i>	<i>Echeveria caamani</i>
<i>E. caribbean blue</i>	<i>Echeveria caribbean blue</i>
<i>E. compresscaulis</i>	<i>Echeveria compresscaulis</i>
<i>E. diffractens</i>	<i>Echeveria diffractens</i>
<i>E. pulcherrima</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> .
<i>E. pulcherrima Beatriz</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>Beatriz</i>
<i>E. pulcherrima Festival</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>Festival</i>
<i>E. pulcherrima Juanita</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>Juanita</i>
<i>E. pulcherrima Leticia</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>Leticia</i>
<i>E. pulcherrima One red</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>One red</i>
<i>E. pulcherrima Victoria</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>Victoria</i>
<i>E. pulcherrima Ximena</i>	<i>Euphorbia pulcherrima</i> variedad <i>Ximena</i>
h	Horas
H <sub>2</sub> Ode	Agua destilada estéril
AIA	Ácido indol acético
IP	Yoduro de propidio
KIN	Kinetina
min.	Minutos
MS	Murashige y Skoog
ANA	Ácido 1-naftaleno acético
PBS	Buffer de fosfatos (por sus siglas en inglés de Phosphate Buffer Solution)

<b>PDH</b>	Plantas Doble Haploides
<b>PH</b>	Plantas Haploides
<b>RAM</b>	Meristemo apical de la raíz (por sus siglas en Ingles Root Apical Meristem.)
<b>S</b>	Segundos
<b>SAM</b>	Meristemo apical aéreo (por sus siglas en Ingles shoot Apical Meristem.)
<b>TDH</b>	Tecnología Doble Haploide

# 1.- Introducción

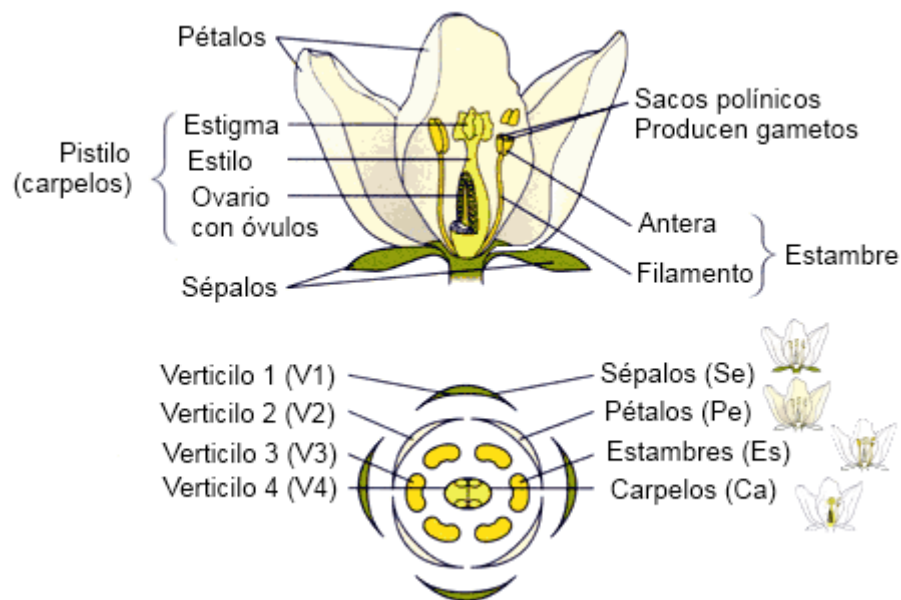
Las angiospermas o plantas con flores constituyen gran parte de las especies vegetales modernas; se engloban en el filo de las Anthophytas que abarca alrededor de 300,000 a 450,000 especies (1). Son un grupo de plantas con características muy diversas, un ejemplo de esto es el tamaño, dentro de esta clasificación se pueden encontrar especies de lenteja de agua que apenas mide un mm de largo o especies de árboles que crecen más de 100 metros como los eucaliptos (1). Dentro de este grupo se encuentran dos grandes líneas evolutivas que son las monocotiledóneas que incluyen plantas como lirios, orquídeas, poáceas y palmeras; y las dicotiledóneas que incluyen familias de cactáceas, asteráceas, Fabáceas entre otras (1). Se cree que este grupo comenzó a diversificarse hace más de 140 millones de años; lo cual se ve reflejado en la diversidad floral de hoy en día (2).

## 1.1.- Estructura floral

Las flores son los órganos reproductivos de las plantas, se originan de meristemas determinados, es decir, tiene un crecimiento definido y las células que lo integran terminan finalmente diferenciándose (1). La estructura floral clásica se compone de cuatro verticilos concéntricos: el verticilo externo son los sépalos que forman el cáliz, en segundo lugar, se encuentran los pétalos que forman la corola, el tercer verticilo son los estambres, que son las estructuras reproductivas masculinas, y al centro se encuentran los carpelos, que forman la estructura reproductiva femenina (Figura 1) (3). En la naturaleza existen diferentes variantes de la estructura ya mencionada; se denominan flores completas a las que presentan los cuatro verticilos como, es el caso de las flores del género *Echeveria*. En cambio, aquellas flores que no poseen alguno de estos verticilos se conocen como flores incompletas un ejemplo de esta estructura son las flores de *Euphorbia*



*pulcherrima* (*E. pulcherrima*) las cuales no presentan sépalos ni pétalos (la estructura a detalle se describe en una sección más adelante). Las flores que poseen ambos verticilos reproductivos se conocen como flores perfectas, mientras que las flores unisexuales son flores imperfectas, por lo tanto, una flor puede ser completa perfecta, incompleta perfecta o incompleta imperfecta (4).



**Figura 1. Partes y estructura clásica de la flor.** En la imagen se muestran las distintas estructuras de la flor y como es la distribución de los verticilos florales. Tomado de B.log.ia 2.0 (5)

## 1.2.- Pasado y presente de la importancia de las flores para la sociedad

Las plantas han tenido gran importancia a lo largo de la historia de los seres humanos, los primeros ancestros del género *Homo* tenía una dieta basada en la recolección de frutas, semillas, brotes, hojas, raíces y raramente animales producto de la cacería (1). La domesticación de las especies vegetales inicio hace aproximadamente 13 000 años, este proceso resultó en cambios de los ancestros originales de especies animales y vegetales debido a la selección de los

cazadores-recolectores. Además, de cambios en el comportamiento humano ya que conforme cambiaron las especies cultivadas se volvieron más dependientes del cuidado de los primeros agricultores y estos se volvieron más dependientes de las plantas para su alimentación (1,6), lo que permitió el establecimiento de las antiguas civilizaciones, ya que al poder cultivar sus propios alimentos se volvieron sedentarios y se establecieron en pequeñas comunidades (6). Las flores adquirieron una gran importancia en las diferentes civilizaciones antiguas tomando diferentes significados, un ejemplo son las rosas rojas en la cultura romana, las cuales se consagraban a Venus y formaban parte del culto a los muertos (7). En las culturas prehispánicas de Mesoamérica, las flores no solo tenían un significado decorativo, también representaban respeto y preocupación por el bienestar de los dioses (8). Otro papel importante de las flores es su uso como materia prima, un ejemplo de esto fue en la antigua civilización egipcia, donde por medio de la maceración de las flores se extraían aceites y grasas esenciales, lo que sentó las bases para la industria perfumista (9). En la actualidad, las flores también forman parte de la dieta alimenticia de la humanidad algunos ejemplos de esto son la coliflor (*Brassica oleracea* variedad botrytis), el brócoli (*Brassica oleracea* variedad italica) y el huauzontle (*Chenopodium nuttalliae*), además, de ser utilizadas como ofrendas a los dioses, y a nuestros seres queridos, las flores representan una fuente importante de ingresos para las familias que se dedican a su cultivo.

La floricultura es el cultivo de plantas ornamentales, involucra la producción y comercialización de flores de corte, bulbos, semillas y follajes (10,11). Actualmente, es una industria que depende de varias economías de distintos países. Existen más de 120 países productores, destacando Países Bajos como el mayor accionista, con el 52.3% de la producción mundial. En las últimas tres décadas, la producción floral pasó de los 10 mil millones de dólares a los 60 mil millones. Los países considerados como principales productores y consumidores de esta industria son Estados Unidos, China, Japón y los países del oeste de Europa (12). En la actualidad los países de Latinoamérica que sobresalen como productores son Colombia, Ecuador y México.

### **1.3.- La floricultura como actividad económica en México**

La floricultura en México es una actividad agrícola que genera los mayores ingresos económicos por superficie cultivable, superando por mucho a los cultivos de cereales y granos. El Estado de México es el principal productor de flor de corte, y aporta el 80% de la producción total de nuestro país, de este porcentaje Villa Guerrero es responsable del 56% (12). En el Estado de México se dedican 5,547 hectáreas para la floricultura, principalmente en el corredor florícola integrado por Tenancingo, Coatepec Harinas, Ixtapan de la Sal, Tonalico, Zumpahuacán, y Villa Guerrero (12). Mientras que Morelos es el mayor productor de la nochebuena (*E. pulcherrima*) y genera el 41.1% de la producción nacional de este cultivo (10).

El cultivo de *E. pulcherrima* y su comercialización durante la época navideña, es sumamente importante en la floricultura mexicana ya que se considerada como símbolo de la Navidad. Es considerada la planta de ornato con mayor importancia económica en el mundo, ejemplo de esto son los Estados Unidos, cuyas ventas anuales superan los 100 millones de dólares. En el año 2012, el cultivo de esta especie generó alrededor de 3000 empleos, y produjo 20 millones de plantas, lo cual fue equivalente a 700 millones de pesos (13).

Durante los últimos años, la producción de varias especies de los géneros Echeverias, Sedum, Aeoniums, Crasulas, etc, se han destacado en la industria de la floricultura mundial como plantas de ornato, países como Inglaterra, Estados Unidos, China, Alemania, Australia, Japón y Corea del Sur (14) se han convertido en grandes consumidores., En los últimos años la creciente demanda de esta especie ha convertido su cultivo en una importante fuente de ingresos en la economía de los productores nacionales, ya que en el año 2010 se produjeron 10 mil ejemplares tan solo en invernaderos de Cuemanco y Xochimilco que cuentan con registro de UMA (Unidad de Manejo para la Conservación y Aprovechamiento de la Vida Silvestre) (14).

#### 1.4.- Características de Echeveria y *E. pulcherrima*

El género *Echeveria* se clasifica dentro de la familia de las *Crassulaceae*, México es origen de cerca del 83%, equivalente a más de 130 especies. La mayor riqueza de este género se encuentra al sur del país, donde Oaxaca posee el mayor número de especies endémicas representado por 47 (15). *Echeveria* es una planta cosmopolita que prefiere formaciones rocosas como riscos, laderas y paredes, es una planta de tipo suculenta con hojas que poseen una cutícula gruesa distribuidas en forma de roseta basal o apical y tienen una gran variedad de tonos que van desde los verdes azulados hasta los tonos rojizos, y presenta diferentes tipos de inflorescencia (Figura 2-A) (16). Las flores son perfectas completas y presentan una simetría radial, usualmente pentámeras o a veces tetrámeras, pueden presentar uno o dos verticilos de estambres y tienen el mismo número de pétalos y sépalos (Figura 2-B) (17).

A)



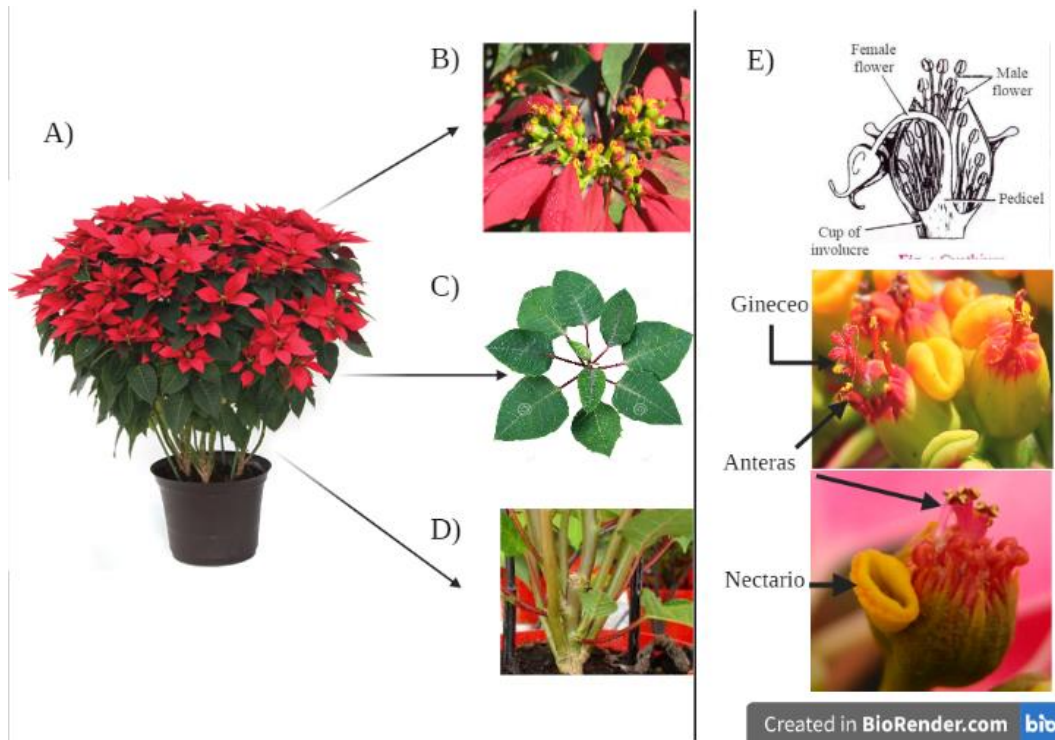
B)



**Figura 2. Morfología de Echeveria.** A) Se muestra una planta adulta de *Echeveria imbricata*, tomado de “Todo para tu huerta” (18). B) Flor de *Echeveria*

*pulvinata* en la cual se señalan las distintas estructuras florales, tomado de Andrés Zúñiga Orozco (16).

Por otro lado, *E. pulcherrima* pertenece a la familia *Euphorbiaceae* y al género *Euphorbia* que comprende 200 especies, incluyendo árboles, arbustos, plantas herbáceas, y suculentas(19). *E. pulcherrima* es una especie originaria de México (20)se encuentra en climas cálidos y húmedos. Presenta crecimiento arbustivo y desarrolla tallos semi leñosos, (Figura 3-A y D), con hojas simples con forma cordada de color verde oscuro (Figura 3-C), y con una disposición alternada entre ellas. Su flor es de tipo incompleta y pueden ser perfecta o imperfecta, a esta inflorescencia en particular se le llama ciato (Figura 3-E), que es característico del género *Euphorbia*. Esta estructura está constituida por flores femeninas centrales reducidas al gineceo. Alrededor de las flores femeninas se encuentran cinco grupos de anteras sobresalientes y en los márgenes de la estructura podemos encontrar el nectario (Figura 3-E). Las inflorescencias se encuentran rodeadas por un conjunto de hojas modificadas de color rojo llamadas brácteas, (Figura 3-B) (21). Desde hace algunos años se han creado nuevas variedades para ambas especies con el fin de satisfacer las necesidades de los productores ornamentales, pero ¿qué es una nueva variedad y cuál es la diferencia con una especie?



**Figura 3. Anatomía de *E. pulcherrima*.** En la imagen se muestra la anatomía de *E. pulcherrima* **A)** Un ejemplar adulto de *E. pulcherrima* **B)** Inflorescencias, **C)** Hojas, **D)** Tallo y **E)** Muestra en detalle de la estructura de un ciato de *E. pulcherrima* Creado en BioRender: <https://app.biorender.com>

### 1.5.- Variedades vegetales y su importancia

Para poder entender qué es una variedad, es necesario definir qué es una especie. El concepto de especie hace referencia a un grupo de individuos que comparte características similares, tienen la capacidad de reproducirse entre ellos en la naturaleza y producir descendencia fértil (1,4). Las especies están compuestas por dos o más subespecies, en botánica conocidas como variedades; una variedad es un conjunto de individuos de una especie que comparten ciertas características entre ellos y los diferencian de otras subespecies (1). Según la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) “la especie es una unidad de la clasificación botánica del reino vegetal, y dentro de

ella puede haber muchos tipos diferentes de variedades” (22), mientras algunos autores consideran que una variedad debe de considerarse igual a subespecie, otros consideran que las variedades deben de clasificarse como miembros de subespecie (1,4).

Con la selección de nuevas variedades se busca satisfacer las necesidades de los agricultores, cada uno necesita plantas que se adapten a su entorno y prácticas de cultivo, también se busca aumentar el rendimiento de la producción en un área menor de cultivo o plantas que sean resistentes a ciertas plagas y evitar consigo el menor uso de plaguicidas (23). En cuanto a la selección de nuevas variedades de plantas ornamentales una de las principales razones es proteger las especies del saqueo de su habidad natural(23), se buscan especies que tengan un tamaño compacto, aromas agradables, colores vistosos, más número de inflorescencias, etc.

Una de las técnicas más utilizadas tradicionalmente para la selección de nuevas variedades es la reproducción cruzada, el mayor inconveniente que tiene esta técnica es que para fijar una característica deseada en el genoma se necesitan varios ciclos de reproducción lo cual lo hace muy tardado y costoso, además que al utilizar este método se deben considerar factores como la viabilidad del polen, la receptividad estigmática y el tipo de polinización (24). por lo que se busca desarrollar nuevas técnicas que permitan obtener mayor variabilidad en menor tiempo.

### **1.6.- Métodos utilizados para la creación de nuevas variedades de Echeveria y *E. pulcherrima***

Entre las técnicas de biotecnología aplicadas al mejoramiento de Echeveria se encuentran la alteración de la ploidía utilizando colchicina (16), este fármaco se une fuertemente a la tubulina y evita la polimerización de los microtúbulos del uso mitótico, produciendo una segregación desigual entre el número de cromosomas de las células hijas (25). Otro método utilizado para la obtención de nuevas

variedades de esta especie es la transformación genética mediada por *Agrobacterium thumefasciens* para obtener plantas transgénicas (16).

El mejoramiento genético en *E. pulcherrima* se ha enfocado principalmente a la obtención de variedades con brácteas de color rojo (y sus diferentes tonalidades), una característica que prefiere el mercado. Los métodos utilizados en la producción de nuevas variedades de *E. pulcherrima* son la hibridación, que aprovecha los efectos no aditivos de los genes. Estos híbridos se realizan mediante el cruzamiento de especies (principalmente comerciales). El segundo método es la mutagénesis, el cual se realiza mediante la aplicación de radiación ionizante sobre semillas o esquejes (26), la principal desventaja de ambos métodos es el tiempo, ya que necesitan varios ciclos de polinización para poder obtener un híbrido estable. Un método utilizado para la propagación de estas variedades es la inducción de la embriogénesis vegetal que emplea distintos tejidos para el cultivo *in vitro*.

Como se mencionó anteriormente ambas especies cuentan con el potencial ornamental para la creación de nuevas variedades, mediante métodos más rápidos y que produzcan mayor variabilidad, un método que cumple con estas características es la tecnología dobles haploides (TDH), la cual se ha utilizado para acelerar programas de mejoramiento en especies como cebada (*Hordeum vulgare*), trigo (*Triticum aestivum*) y maíz (*Zea mays*) (27).

### **1.7.- TDH y su importancia en la investigación vegetal**

La TDH se basa en la obtención de plantas haploides (PH) por diferentes estrategias como pueden ser: el uso de líneas inductoras de haploides, el empleo de cromosomas artificiales para inducir la haploidía, la utilización de polen irradiado para la fertilización y la aplicación de la embriogénesis gamética. Posteriormente las plantas resultantes de estos procesos son organismos haploides que mediante una duplicación cromosómica dan como resultado plantas



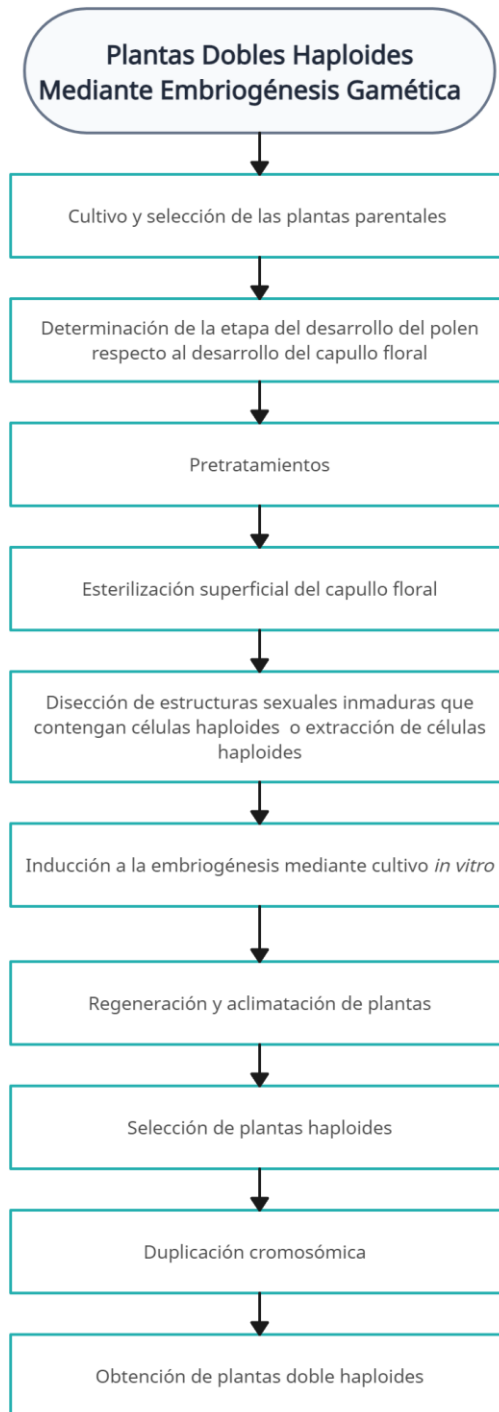
100% homocigotas para todo el genoma en una sola generación. Las principales ventajas de la TDH comparada con los programas de mejoramiento tradicionales son el ahorro de tiempo y la producción de una amplia variabilidad en un solo evento, además, las plantas dobles haploides (PDH) son utilizadas como parentales para cruzamientos con líneas específicas permitiendo la aceleración de programas de mejoramiento (27), las PDH carecen de heterocigosis que permite encontrar con gran facilidad genotipos recesivos, además, estas plantas permiten el mapeo de genes mediante cruzamientos específicos (28). Esta tecnología también se ha empleado en plantas con flores como girasol (*Helianthus annuus L.*), anturio (*Anthurium andreaeanum*), petunia (*Petunia axillaris*), entre otras (29).

### **1.8.- Metodología para crear PDH mediante la embriogénesis gamética**

Para obtener PDH es necesario primero seleccionar las plantas parentales adecuadas, ya que serán la fuente del material de trabajo, por lo cual deben ser plantas cultivadas bajo condiciones controladas para obtener un desarrollo floral uniforme (30). El paso siguiente es coleccionar las inflorescencias para relacionar alguna característica cuantitativa del capullo floral con el desarrollo de los gametos, para encontrar células haploides y saber cuándo es el momento adecuado para la recolección de estas células. Algunas estrategias que se han utilizado en este punto son medir el tamaño del capullo floral o algunos pigmentos presentes en las estructuras florales para relacionarlas con las etapas de desarrollo de los gametos. Después de esto se esteriliza superficialmente los capullos florales para mantener un ambiente estéril para el cultivo *in vitro* (30). Un punto importante en la TDH es la forma en que se obtienen las células haploides, en este paso se pueden hacer dos variantes: la primera es el cultivo de estructuras sexuales (anteras u ovarios) que contengan estas células; el inconveniente de esta variante es que se pueden obtener callos o embriones desarrollados a partir de las células somáticas de las estructuras. La otra variante implica aislar las células haploides en medios que mantengan la viabilidad celular. El aislamiento se

hace mediante métodos mecánicos como la agitación magnética, la principal ventaja de este método es la obtención de callos y embriones a partir de células individuales (31) La etapa siguiente es la inducción de la embriogénesis mediante el uso de medios de cultivo que contengan ciertos aditivos que ayuden a tolerar el estrés de las células e influyan en la formación de embriones, estos compuestos pueden ser hormonas vegetales, poliaminas, solutos compatibles, antioxidantes celulares e inhibidores de la histona desacetilasa (31). El resultado de este paso puede ser; la formación de embriones los cuales se cultivan hasta un tamaño adecuado para el proceso de aclimatación, o la formación de callos donde el siguiente paso es la regeneración de las plantas mediante un proceso de organogénesis y los brotes obtenidos de este proceso se someten a una etapa de enraizamiento para pasar a la etapa de aclimatación, en ambos casos la aclimatación se lleva a cabo en invernaderos.

El paso posterior es la selección de haploides mediante citometría de flujo, cariotipado o mediante las características de los estomas. Una vez identificadas las PH sigue un proceso de duplicación cromosómica mediante el uso de agentes antimitóticos, uno de los más utilizados es la colchicina. Finalmente se comprueba la duplicación cromosómica mediante los métodos ya mencionados anteriormente. La embriogénesis gamética es uno de los principales métodos para obtener líneas de PH, y es el proceso por el cual se forma un embrión a partir de gametos.



**Figura 4 . Diagrama de flujo de la TDH por embriogénesis gamética.** En la imagen se muestran los pasos a seguir para la obtención de PDH. Creado en <https://app.creately.com/> y modificado de Germana Maria Antonietta (30).

## **1.9.- Embriogénesis vegetal y tipos de embriogénesis**

La embriogénesis se define como el proceso por el cual una sola célula da lugar a la formación de un embrión mediante varios ciclos de división. A diferencia de lo que ocurre en animales, en las plantas no se presenta la migración celular durante el desarrollo del embrión, por lo que el patrón embrionario y la especificación celular están interrelacionadas con la división, la expansión y la diferenciación celular (32,33). Durante la embriogénesis se establece el meristemo, que es un conjunto de células que están en constante división, durante este proceso se sitúan los dos principales meristemas que dan origen al cuerpo de la planta; el meristemo apical del brote (SAM por sus siglas en inglés Shoot Apical Meristem) y el meristemo apical de la raíz (RAM por sus siglas en inglés Root Apical Meristem), además, durante esta etapa del desarrollo se establece el diseño radial de los tejidos de la planta (1).

Dependiendo de la célula que dará origen al embrión, la embriogénesis puede clasificarse en tres tipos: 1) si la célula inicial es un cigoto (célula huevo fecundada por un espermatozoide) se denomina embriogénesis cigótica. Esta es la más común en la naturaleza. 2) En la embriogénesis somática los embriones se forman a partir de una célula somática, suele suceder en algunas especies de forma natural y de forma *in vitro*. 3) En la embriogénesis gamética se induce la formación de embriones *in vitro* a partir de células gaméticas (31,32).

### **1.10.- Tipos de embriogénesis gamética**

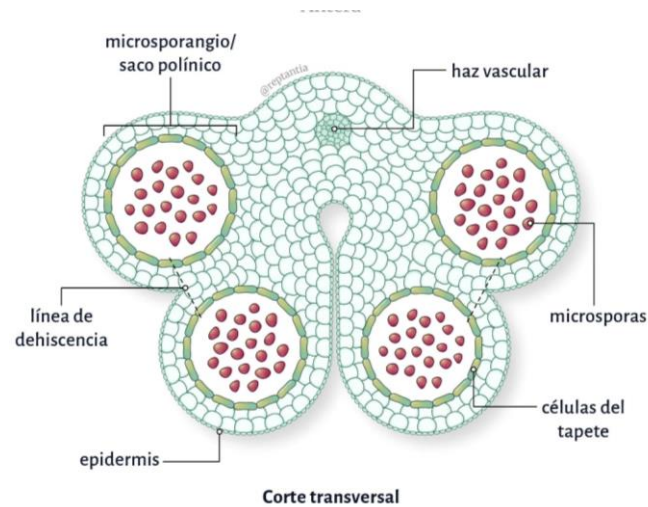
Existen dos tipos de embriogénesis gamética, que dependen de las células que se utilicen para la inducción de la embriogénesis. El primer tipo es la ginogénesis, que hace referencia a los gametos y estructuras femeninas de la planta. En este caso, la inducción a la embriogénesis parte de los óvulos y ovarios de flores inmaduras para la obtención de embriones (33). El segundo tipo es la androgénesis, que se refiere al cultivo de estructuras y gametos masculinos. La embriogénesis en este caso parte de la inducción de anteras y granos de polen

inmaduros (34). La embriogénesis gamética más eficiente es la androgénesis, un punto importante para llevar a buen término este método, es conocer los distintos estados del desarrollo del polen.

### **1.11.- Estados de desarrollo del polen**

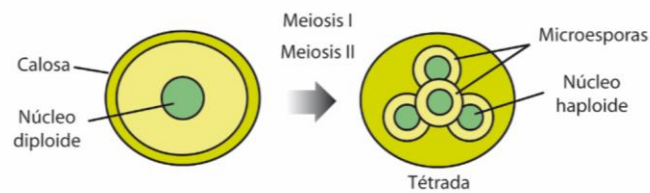
En una etapa inicial, la antera es una masa uniforme de células que está delimitada por la epidermis. Eventualmente, se distinguen cuatro columnas de células fértiles (Figura 5-A), cada columna está rodeada por varias capas de células estériles que formarán el saco polínico donde la capa más interna del saco polínico formará el tapetum (Figura 5-A). Dentro del saco polínico ocurre un proceso llamado micro esporogénesis, en donde las células esporogéneas se convierten en microesporocitos diploides ( $2n$ ), que mediante un proceso de meiosis darán lugar a cuatro microesporas haploides formando una estructura conocida como tétrada (Figura 5-B) (1). Posteriormente, mediante un proceso de micro gametogénesis, las microesporas se convertirán en granos de polen maduros. En este proceso, cada célula crecerá individualmente, y conforme crece cada microespora, comenzará dentro de ella la formación de una gran vacuola que ocupará la mayor parte de la célula, obligando al núcleo a desplazarse hacia uno de los polos. A esta etapa se le conoce como microespora vacuolada (Figura 5-B). Después, la microespora se divide mitóticamente dando lugar a dos células asimétricas dentro de la pared original de la microespora. A esta etapa se le denomina bicelular joven; la célula más grande resultante de la división es llamada núcleo vegetativo o célula del tubo polínico y la célula de menor tamaño es denominada célula generativa, y se localiza próxima a la pared del polen (Figura 5-B). En la siguiente etapa, la célula generativa adquiere una morfología fusiforme y migra hacia el centro, a esta etapa se le conoce como bicelular maduro (Figura 5-B) (28). Finalmente, en la mayoría de las angiospermas la célula vegetativa se divide en dos, dando lugar a un micro gametofito tri-celular (Figura 5-B) (1).

A)

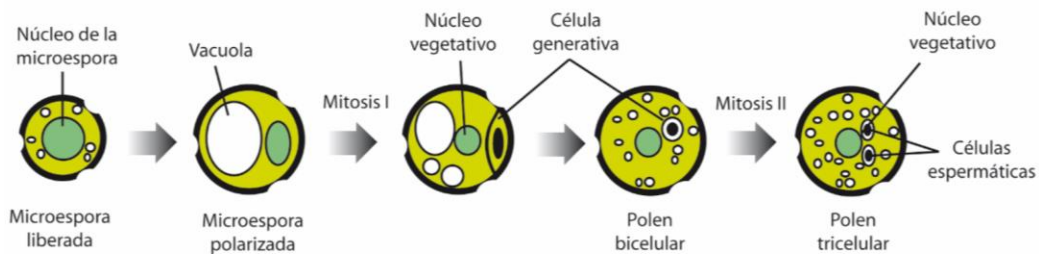


B)

#### Microsporogénesis



#### Microgametogénesis



**Figura 5. Etapas del desarrollo del polen.** En la imagen se muestra el desarrollo de la formación de la antera y el grano de polen. **A)** Desarrollo de la Antera, tomado de Reptantia (<https://portfolio.reptantia.com/>) basado en (1). **B)** Desarrollo del grano de polen. Este proceso se encuentra descrito detalladamente en el texto. Figura tomada de Ana Rocío Sede (34).

Una vez maduros los granos de polen se liberan al medio donde el viento o los polinizadores los transportaran a un estigma receptivo de una flor, donde se liberarán los núcleos de su interior y mediante la formación del tubo polínico llegaran a fecundar la célula huevo para dar proceso a la embriogénesis que culminara con la formación de un embrión.

### **1.12.- Desarrollo de un embrión vegetal**

La embriogénesis es el primer proceso en la formación de la semilla, el segundo proceso consiste en el desarrollo de las estructuras de la semilla (1). Una vez formado el cigoto por la fertilización de una célula huevo mediante la fusión de su núcleo con el núcleo de un grano de polen, el primer paso que inicia la embriogénesis es la primera división del cigoto esta división es asimétrica y transversal con respecto al eje longitudinal del cigoto, esta división es un paso esencial en la formación del embrión ya que permite el establecimiento de la polaridad de este, el resultado de esta división es una célula pequeña en la parte superior que dará origen al embrión y una célula basal larga en el polo inferior que dará lugar al suspensor. Después la célula apical se divide transversalmente y produce una estructura conocida como preembrión de tres células, en una siguiente división se produce un preembrión de cuatro células, a partir de este punto el conjunto de células tendrá varios ciclos de divisiones ordenadas creando una masa de células indiferenciadas con forma esférica que es denominada como un embrión verdadero (1,33). En el estadio globular, denominado así por la forma de esfera se establece la polaridad radial del embrión que permitirá la localización de los diferentes tejidos en un arreglo concéntrico. En esta etapa, también se origina el protodermo que dará lugar a la epidermis, donde se establece mediante divisiones periclinales (paralelas a la superficie) en las células externas del embrión. Otros tejidos que se fundan durante esta etapa son el meristemo fundamental y procambium, esto se logra mediante divisiones verticales dentro del embrión. La siguiente etapa en la embriogénesis es el estadio de corazón, este estado se caracteriza por el inicio de la formación de los cotiledones durante o

después de la aparición de procambium, en plantas dicotiledóneas la forma que adquiere el embrión es de dos lóbulos que asemejan a un corazón, en el caso de las plantas monocotiledóneas la forma que adquiere el embrión es cilíndrica(1,33).

Después de la formación de los cotiledones se puede apreciar el patrón apical-basal que se compone por el SAM en la parte superior, por debajo de este se encuentran los cotiledones, luego sigue el hipocótilo, la raíz embrionaria y finalmente en el extremo opuesto el RAM, El siguiente estadio es el de torpedo, este se caracteriza por el alargamiento de los cotiledones y el eje, durante esta etapa de alargamiento algunos embriones pueden curvarse. Cabe destacar que paralelamente al proceso de embriogénesis ocurre la formación del endospermo que se origina debido a la fusión del otro núcleo del grano de polen con los núcleos polares a este proceso se le conoce como doble fecundación, el resultado de esta segunda fertilización da origen al endospermo que es un tejido triploide, el cual sirve como fuente de alimento para el embrión durante su desarrollo(1,33).

Cabe mencionar que a diferencia de la embriogénesis cigótica en la embriogénesis somática y gamética no hay una doble fecundación y la formación de las estructuras de la semilla. Para la inducción de la embriogénesis de forma artificial, es necesario someter a las células a estrés por altas o bajas temperaturas, y colocarlas en un medio con hormonas vegetales para inducir al proceso de embriogénesis.

### **1.13.- El uso de hormonas vegetales en la inducción de la embriogénesis**

El uso de hormonas vegetales sintéticas que tienen la capacidad de modular la embriogénesis gamética mediante cambios en la señalización de la expresión genética, influyen en el desarrollo y el metabolismo celular, y tienen un importante papel en los procesos de aclimatación y respuesta al estrés (35). Se ha demostrado que la aplicación de auxinas exógenas promueve la división celular en cultivos de tejidos y células vegetales, los tipos de hormonas vegetales sintéticas más usadas para inducir la embriogénesis son el ácido 1-naftaleno acético (ANA),



y el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) (35). Otra hormona que se usa frecuentemente en combinación con las auxinas para la inducción de la embriogénesis son las citocininas, como la 6-bencilaminopurina (6-BAP), que es una citocinina sintética. Se ha demostrado que las citocininas promueven la proliferación celular en brotes y en callos (35).

## 2.- Antecedentes

El proceso de androgénesis como ya se mencionó es uno de los tipos de embriogénesis gamética más utilizado para la obtención de PH, una de las características principales de este método es la gran variabilidad que se obtiene en las PH y ha sido ampliamente usada en diferentes especies que se describen a continuación.

La técnica de androgénesis se ha aplicado principalmente en cultivo de cereales y granos, uno de estos cultivos es el arroz (*Oryza sativa L.*), uno de los más importantes en el mundo, en el trabajo de Rukmini y colaboradores describen que la androgénesis en este cultivo se puede llevar a cabo cultivando anteras de arroz en medio N6 suplementado con 30 mg/L de maltosa, 8 gr/L de agar y 100 mg/L de mio- inositol en combinación con las hormonas 2,4-D 2 mg/L y 0.5 mg/L de kinetina (KIN). Las anteras se cultivaron en la oscuridad y se observó la formación de callos entre la tercera y cuarta semana después de la inoculación en el medio (36).

La cebada (*Hordeum vulgare L.*) ha sido otro cultivo en donde la androgénesis ha sido utilizada, en la investigación de Echavarrri y Cistue el uso de esta técnica añadiendo dimetilsulfóxido (DMSO) como pretratamiento dio resultados positivos, el cual consistió en plaquear anteras de cebada en medio sólido suplementado con DMSO 1%, manitol 0.7 M y 40 mM de cloruro de calcio durante 4 días a 24 °C en oscuridad, luego del pretratamiento las anteras se colocaron en medio FHG líquido suplementado con 200 g/L de ficoll tipo 400 (37).

Seldimirova y coautores buscaron saber el papel de la concentración de auxina exógena en la embriogénesis gamética en el trigo (*Triticum aestivum*). El cultivo partió de anteras las cuales se plaquearon sobre medio nutricional de papa II sólido suplementado con 0.2 mg/L KIN y diferentes concentraciones de 2,4-D de 0 – 2.5 mg/L aumentado en rangos de 0.5 mg. Los resultados de este trabajo mostraron que la combinación óptima de hormonas para la androgénesis en trigo

es 0.2 mg/L KIN y 0.5 mg/L de 2,4-D, además, conforme se aumenta la concentración de auxinas el proceso se ve afectado negativamente (38).

El método de androgénesis también se ha utilizado para el desarrollo de PH en diferentes especies de cultivos de hortalizas, por ejemplo, el pepino (*Cucumis sativus L.*) que pertenece a la familia de las cucurbitáceas, en el trabajo de Reza y colaboradores llevaron a cabo la técnica de androgénesis sembrando anteras sobre medio MS suplementado con 2,4-D 2.26  $\mu$ M, 6-BAP 4.44  $\mu$ M, KIN 4.64  $\mu$ M y solidificado con 7 gr/L de agar, las anteras fueron cultivadas en una cámara con fotoperiodo 16/8 a 25°C y la aparición de callos se observó luego de un mes (39).

En Chile (*Capsicum annuum L.*) la androgénesis puede llevarse a término mediante el cultivo de anteras, en el trabajo de Vivek y coautores se llevó a cabo en medio MS 1X sólido suplementado con nitrato de plata 15 gr/L, 100 mg/L de sacarosa y 0.5 o 1 mg de zeatina (ZTN) en combinación con 0.2 mg/L de 2,4-D, además, las anteras fueron sometidas a un tratamiento de estrés por temperaturas, cultivándolas durante 7 días en oscuridad a 35°C, lo cual aumentó la tasa de formación de callos hasta en un 80 % (40).

La androgénesis también ha sido aplicada a especies de frutales, principalmente a los cítricos, un caso es el de la especie *Citrus clementina Hort. ex Tan.* un híbrido cítrico resultante de la cruce entre la mandarina y la naranja agria en donde la investigación de Germanà y Chiancone encontraron que el proceso de androgénesis se puede llevar a término mediante el cultivo de anteras en medio N6 sólido suplementado con vitaminas "Nitsch and Nitsch", lactosa 18 gr/L, galactosa 9 gr/L, agua de coco al 5%, caseína 500 mg/L, L- glutamina 200 mg/L, biotina 0.5 mg/L y ácido ascórbico 500mg/L en combinación con 0.1 mg/L de thidiazurón (TDZ), la formación de callos se observó durante el segundo y tercer mes de cultivo (41).

La papaya (*Vasconcellea pubescens*) es otra especie de cultivo en donde se ha aplicado la TDH, en el trabajo realizado por Chong-Pérez y colaboradores se encontraron que el cultivo de anteras en medio MS 1X suplementado con 20 gr/L de sacarosa, 7.5 gr/L de agar en combinación de 0.54  $\mu$ M de ANA y 22.66  $\mu$ M de

2,4-D inducen una alta tasa de formación de callos (14% aproximadamente), mientras que la regeneración vía organogénesis se llevó a cabo en medio MS 1X suplementado con maltosa y en combinación con 8.88  $\mu$ M 6-BAP, 5.71  $\mu$ M ácido indol acético (AIA) y 2.28  $\mu$ M ZTN (42).

En los últimos años el uso de la técnica de androgénesis para la obtención de PDH se ha empleado en plantas de interés ornamental una de ellas es el girasol (*Helianthus annuus L.*), en el trabajo de Saji y Sujatha se encontró que el cultivo de anteras en medio MS 1X sólido suplementado con sacarosa al 3% (p/V) y en combinación de 2.0 mg/L de ANA y 1.0 mg/L de 6-BAP produce la embriogénesis gamética. En este trabajo se realizó un pretratamiento antes de la inducción que consistió en almacenar las anteras a 4°C durante algunos días, la formación de callos se observó entre el tercer y quinto día posterior a la inoculación de las anteras (43).

Otra especie en donde se ha utilizado la androgénesis para la obtención de PH es la primula bebé (*Primula forbesii Franch.*) en la investigación de Jia y coautores demostraron que el cultivo de anteras sobre medio MS 1X suplementado con sacarosa 30 gr/L y en combinación con 1mg/L de 6-BAP y 0.5 mg/L de 2,4-D fueron las concentraciones óptimas para la inducción a la formación de callos (44).

Estudios sobre embriogénesis gamética en *E. pulcherrima* no se han realizado hasta ahora, pero si en otras especies de *Euphorbiaceae* como *Jatropha curcas L.*, en donde se descubrió que, para inducir micro esporas de esta planta a la embriogénesis, se necesita un medio suplementado con 2,4-D a 2.0 mg/L y KIN a 0.1 mg/L (45). Mientras que para *Echeveria* o especies cercanas a ellas no se ha descrito ningún protocolo de androgénesis.

### **3.- Justificación**

La androgénesis es un tipo de embriogénesis gamética que ha sido exitosamente utilizada en distintas especies vegetales para la generación de nuevas variedades, reduciendo significativamente el costo económico y el tiempo invertido comparado con métodos tradicionales. Sin embargo, la androgénesis requiere de un protocolo específico para cada especie vegetal. Siendo *Echeveria* y *E. pulcherrima* especies vegetales ampliamente comercializadas en México y en el mundo, la elaboración de protocolos específicos de androgénesis para estas especies permitirá la selección acelerada de nuevas variedades a partir de las especies nativas, favoreciendo la producción y comercialización de estas especies ornamentales y al mismo tiempo protegiéndolas de la depredación en sus hábitats naturales.

### **4.- Hipótesis**

Es posible el establecimiento de protocolos para la inducción de embriogénesis gamética mediante androgénesis a partir de anteras y microesporas de *Echeveria* y *E. pulcherrima*.

## **5.- Objetivos**

### **5.1.- Objetivo general**

Establecer las condiciones de cultivo *in vitro* de anteras y microesporas de Echeveria y *E. pulcherrima* para la inducción de la embriogénesis gamética.

### **5.2.- Objetivos particulares**

-Determinar el estado de desarrollo de los capullos florales de Echeveria (cfE) y los ciatos de *E. pulcherrima* (cEp). para la extracción de anteras que contengan células haploides.

-Establecer las condiciones adecuadas para la inducción de la embriogénesis gamética por cultivo *in vitro* de anteras y microesporas de Echeveria y *E. pulcherrima*.

## 6.- Metodología

### 6.1.- Condiciones de cultivo de las plantas parentales de *Echeveria*

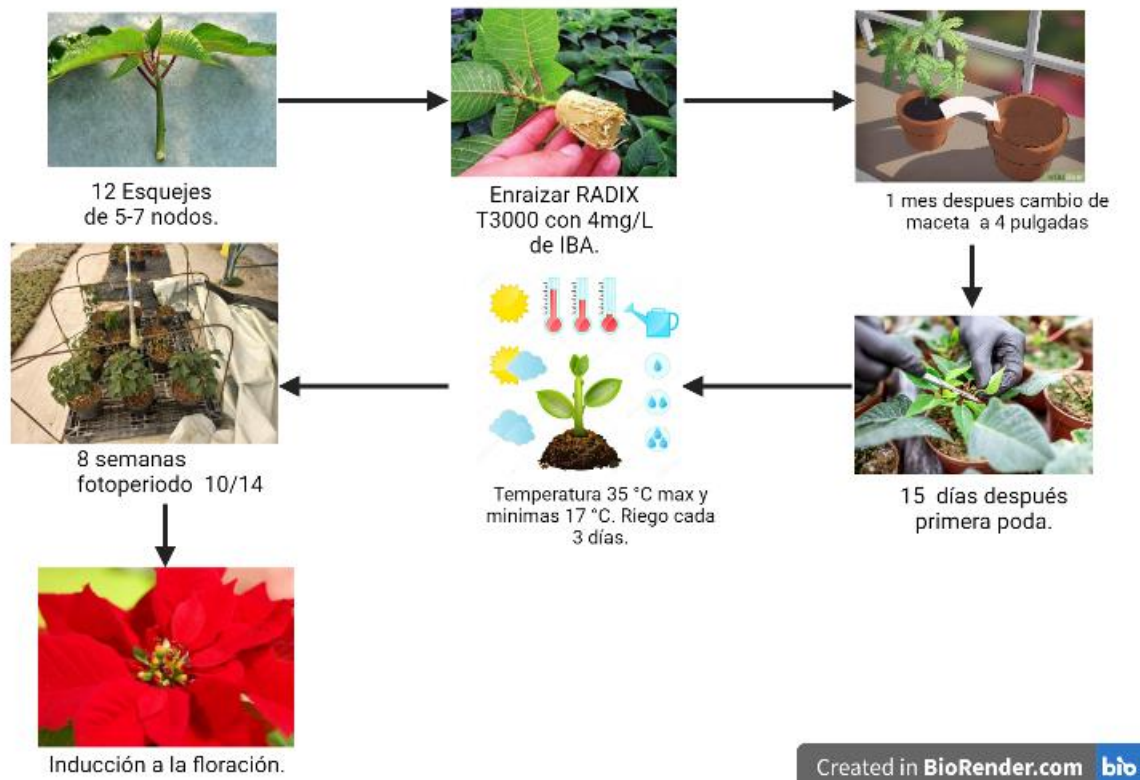
Para este trabajo se seleccionaron 4 variedades de *Echeveria* de las cuales 3 son nativas de México: *Echeveria caamani* (*E. caamani*), *Echeveria caribbean blue* (*E. caribbean blue*) y *Echeveria diffractens* (*E. diffractens*); la última variedad fue *Echeveria compressicaulis* (*E. compressicaulis*), originaria de Venezuela. Estas variedades fueron cultivadas en condiciones de invernadero en las instalaciones de la empresa Aztech Growers con un sustrato de tepojal, tierra negra y composta, en una proporción 3:2:1. Las plantas se regaron a saturación una vez por semana (13).

### 6.2.- Condiciones de cultivo de las plantas parentales de *E. pulcherrima*

En este trabajo se utilizaron 5 variedades creadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), mediante la colaboración con el Consejo Estatal de Productores de Ornamentales de Morelos A.C. (Cepomac). Las variedades están registradas en el Catálogo Nacional de Variedades Vegetales (CNVV) bajo los nombres de *Beatriz*, *Juanita*, *Leticia*, *Victoria* y *Ximena*, y 2 variedades comerciales nombradas *Festival* y *One Red*.

El cultivo de las plantas parentales se realizó en condiciones de invernadero en las instalaciones de la empresa Aztech Growers. Se obtuvieron 12 esquejes de 5 a 7 nodos de *E. pulcherrima* por variedad, que se plantaron en macetas de plástico de 2.5 pulgadas con el sustrato comercial de la marca Floraplant. Las macetas se colocaron bajo un nebulizador programado, para ser rociadas cada 10 min durante 10 s en la primera semana. En la segunda semana de cultivo, las plantas se

rociaron cada 15 min, en la tercera, cada 20 min y en la cuarta cada 30 min. Las plantas fueron regadas cada semana durante un mes con una solución de RADIX T3000 a una concentración de 4 mL/L (compuesto activo ácido indol butírico). Después de un mes, las plantas establecidas se trasladaron a macetas de 4 pulgadas, intentando no dañar el sistema radicular. Posterior al trasplante se realizó un riego abundante, y a partir de este punto los riegos se realizaron cada 3 días. Tres semanas después, con la ayuda de un cúter se podó el ápice de la planta para promover su ramificación.



**Figura 6. Diagrama de trabajo para *E. pulcherrima*.** En el esquema se ilustra el flujo de trabajo en las plantas parentales de *E. pulcherrima*. Creado en BioRender: <https://app.biorender.com>



Como se mencionó anteriormente, *E. pulcherrima* tiende a inducir su floración cuando los días son más cortos que la noche (condición a la que se le conoce como fotoperiodo corto) (21). Por ello, se procedió a crear condiciones artificiales de oscuridad armando una estructura metálica sobre las plantas y colocando encima una lona de plástico negro por un lado y blanco por el otro se utilizó este tipo de lona para evitar la exposición a la luz blanca de las lámparas de la calle (Figura 6). La lona se colocaba a las 19:00 h y se retiraba a las 9:00 h todos los días durante 8 semanas. La temperatura del invernadero donde se cultivaron las plantas fue de 25 °C. Este ciclo de cultivo se realizó varias veces con una diferencia de 7 semanas entre cada repetición, como esquejes se usaron los ápices podados de las plantas que se habían trasplantado a las macetas de 4 pulgadas.

### **6.3.- Caracterización del desarrollo del grano de polen basado en el tamaño del capullo floral de *Echeveria* (cfE) y el ciato de *E. pulcherrima* (cEp)**

Para relacionar el estadio de desarrollo del grano de polen con el tamaño del crecimiento del capullo floral en ambas especies, se colectaron las inflorescencias de las plantas parentales. Para elegir las varas florales de *Echeveria* se tomó en cuenta el primer botón floral basal a la roseta de la planta, que presentaba una coloración totalmente rosa salmón. Para *E. pulcherrima* se seleccionaron las cabezuelas que tenían el ciato central con las anteras expuestas. Luego de la colecta se separaron los cfE y los cEp, se clasificaron por su posición jerárquica en la inflorescencia (Figura 7 A y B) (Figura 8 A y B) para ambas especies. Debido al desarrollo heterogéneo que presentan las inflorescencias en ambas especies se decidió trabajar por intervalos de tamaño, para poder medir los cfE y los cEp se fotografiaron junto con una escala para hacer la medición del ancho de los cfE y los cEp en el programa imageJ

Para relacionar el tamaño del ancho del capullo con el desarrollo del grano de polen una vez clasificados los capullos por intervalos se seleccionaron 5 capullos al azar de cada intervalo y se extirparon las anteras con la ayuda de un microscopio estereoscópico y agujas de insulina. Las anteras se colocaron en un tubo eppendorf de 1.5 mL con 250  $\mu$ L de la solución de fijación, que contiene etanol al 96% y ácido acético glacial en una proporción 3:1. Las anteras se incubaron durante toda la noche a 4°C en esta solución. Posteriormente, se retiró la solución de fijación, y el tejido se dejó secar durante 5 min, tras lo cual se agregaron 250  $\mu$ L de etanol al 70%. La muestra se incubó durante 1 h a temperatura ambiente; se retiró el etanol y se reemplazó por etanol al 50% durante una hora más. Tras retirar el etanol, el tejido se secó durante 10 min y se colocó en la solución de tinción, que contenía 50 mM de PBS pH 7.0, Triton X-100 al 0.1% y 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) 1  $\mu$ g/mL. El material biológico se incubó por 1 h a temperatura ambiente en completa oscuridad (46).

Posteriormente, se colocó una muestra en un portaobjetos y se observó bajo un microscopio confocal “Nikon ECLIPSE Ti” con un objetivo 40 X a una longitud de onda de 365 nm. Este proceso se realizó por triplicado para todos los intervalos de tamaños de ambas especies, el tamaño de ancho de los cfE y cEp que se eligieron fueron aquellos que contenían anteras con células haploides (28).

#### **6.4.- Esterilización de los cfE y los cEp**

Una vez recolectados los cfE y los cEp que tenían el tamaño adecuado, se procedió a realizar una esterilización superficial, que consistió en colocar a los cfE y los cEp en un frasco con tapa cubiertos con una solución de Hy-clean al 10% durante 10 min a 150 rpm. Posteriormente se realizaron 2 lavados con H<sub>2</sub>O destilada estéril (H<sub>2</sub>Ode) cada uno de 10 min a 150 rpm, luego se sumergieron en una solución de Carbendazim con una concentración final al 2% de la marca comercial “Prozycar 50%” durante 30 min a 150 rpm. Se hicieron 2 lavados más con H<sub>2</sub>Ode cada uno de 10 min a 150 rpm para eliminar restos del fungicida. Los

cfE y los cEp se transfirieron a etanol al 70% durante 1min, y se agitaron suavemente con la mano. Los cfE y los cEp se colocaron en una solución de hipoclorito de sodio (NaClO) de la marca comercial "Cloralex" al 20%, Tween-20 al 0.1% durante 30 min a 150 rpm. Posteriormente, se realizaron 3 lavados con H<sub>2</sub>Ode, cada uno de 10 min a 150 rpm. Los cfE y los cEp se secaron sobre un papel filtro estéril (42,44,47,48). Todo esto se realizó en una campana de flujo laminar para mantener un ambiente estéril.

### **6.5.- Extracción de células haploides de los cfE y los cEp**

Para extraer las anteras de *Echeveria* se tomaron los cfE que presentaban el tamaño adecuado, que contenían células haploides. Las anteras del interior del cfE. se dividieron en dos grupos de acuerdo con su tamaño, estas se extrajeron con ayuda de unas pinzas de disección y una navaja de bisturí. Se liberó el contenido de las anteras de *Echeveria* mediante la técnica de *squash*, utilizando distintos medios de aislamiento: manitol al 0.2 y 0.4 M, medio B (KCl 1.49 g/L, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.129 g/L, CaCl<sub>2</sub> 0.11 g/L, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.14 g/L, manitol 54.7 g/L, pH 7.0), y MS 0.5 X pH 5.8. Para evitar la aglomeración de las células se utilizaron los medios mencionados anteriormente con agarosa al 0.01%, 0.1% y 0.2%. La solución que se obtuvo se filtró por una malla de 40 µm. Finalmente se realizó una tinción con yoduro de propidio (PI por sus siglas en inglés de propidium iodide) 10 µg/ mL para determinar la viabilidad celular, y se cuantificó la concentración celular en una cámara de Neubauer.

Para el aislamiento de microesporas de *E. pulcherrima* se colocaron los cEp que tenían el tamaño adecuado, que contenían en su interior tétradas en un tubo falcón de 50 mL y se agregaron 3 mL de medio B (cuya composición se describió en el párrafo anterior) (45). Los cEp se trituraron con la ayuda de una punta de micropipeta y el resultado se filtró 2 veces por una malla de 40 µm para descartar el tejido de mayor tamaño. La solución resultante se colocó sobre 10 mL de una solución de sacarosa al 65% p/p en un tubo falcón de 50 mL y la mezcla se

centrifugó a 1500 rpm durante 20 min a temperatura ambiente. Posteriormente, se descartó el sobrenadante y la pastilla se lavó 3 veces con 3 mL de medio B. Después de los lavados, la pastilla resultante se re-suspendió en 1 mL de medio B y se realizó la cuantificación de las microesporas en la cámara de Neubauer.

## **6.6.- Inducción a la embriogénesis gamética de anteras de Echeveria**

En cajas Petri que contenían 12 mL de medio MS 1 X (Sigma Aldrich) suplementado con sacarosa 30 g/L, mio-inositol 0.1 g/L, y agar 7 g/L, pH 5.8, con distintas concentraciones de 2,4-D y de 6-BAP (Tabla 1), se colocaron 8 anteras grandes de Echeveria. Las cajas se sellaron con parafilm™ para evitar la pérdida de humedad. Las anteras se incubaron en oscuridad a 27°C durante cinco días, se transfirieron a 25 °C y se monitorearon cada semana hasta la formación de callos o embriones. Este experimento se realizó tres veces de manera independiente. Cada experimento incluyó 2 réplicas técnicas (19,43,44,48).

## **6.7.- Inducción a la embriogénesis gamética de tétradas de Echeveria**

Se aislaron tétradas de Echeveria siguiendo el protocolo antes descrito. Las tétradas se re-suspendieron en medio líquido MS 1 X (Sigma Aldrich) suplementado con sacarosa 30 g/L, mio-inositol 0.1 g/L, y agarosa 0.1%, pH 5.8. El medio se suplementó con una mezcla de antibióticos que contenía ampicilina (100 µg/mL), carbenicilina (100 µg/mL), y espectinomicina (100 µg/mL). Se inocularon 1000, 2000 y 3000 células sobre medio sólido suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D y de 6-BAP (Tabla 1). Las cajas se sellaron con parafilm™ para evitar la pérdida de humedad. Las tétradas se incubaron en oscuridad durante 24 horas a 37°C, posteriormente se transfirieron a 25°C, y se

monitorearon cada semana hasta la formación de callos o embriones. Este experimento se realizó tres veces de manera independiente. Cada experimento incluyó 3 réplicas técnicas (19,43,44,48).

<b>Tabla 1. Concentraciones de hormonas vegetales utilizadas en los medios de inducción para la embriogénesis</b>				
<b>MEDIO</b>	<i>Echeveria</i>		<i>E. pulcherrima</i>	
	<b>PGRs (mg/L)</b>		<b>PGRs (mg/L)</b>	
	<b>2,4-D</b>	<b>6-BAP</b>	<b>2,4-D</b>	<b>6-BAP</b>
<b>MD-0</b>	0	0	0	0
<b>MI-1</b>	0.5	1	0.5	1
<b>MI-2</b>	1	1	0.5	1.5
<b>MI-3</b>	1	2	0.5	2
<b>MI-4</b>	2	1	1	1
<b>MI-5</b>	2	2	1	1.5
<b>MI-6</b>	2	4	1	2

## **6.8.- Organogénesis de los callos obtenidos de anteras de Echeveria**

Para llevar a cabo la organogénesis de los callos obtenidos a partir del cultivo de anteras, se transfirieron dos fragmentos de uno de los callos a un frasco de cultivo que contenía 30 mL de medio MS 1 X con 30 g/L de sacarosa y 7 g/L de agar, a pH 5.8, suplementado con diferentes concentraciones de la auxina ANA y de la citoquinina 6-BAP (Tabla 2). Los frascos se colocaron dentro de una cámara de crecimiento de la marca "PERCIVAL" a 25°C con un fotoperiodo de 16 / 8 h luz/oscuridad. Este experimento se realizó una vez y por cada medio se incluyeron tres réplicas técnicas (44,47,48). Los callos se monitorearon cada 3 semanas hasta que se observó la formación de brotes.

<b>Tabla 2. Concentraciones de hormonas vegetales utilizadas en los Medios de diferenciación de callos de Echeveria</b>		
<b>MEDIO</b>	<b>PGRs (mg/L)</b>	
	<b>ANA</b>	<b>6-BAP</b>
<b>MD-0</b>	0	0
<b>MD-1</b>	0.01	0
<b>MD-2</b>	0.03	0
<b>MD-3</b>	0.1	1
<b>MD-4</b>	1	0.1

### **6.9.- Uso de citometría de flujo para la identificación de callos haploides desarrollados a partir de anteras de Echeveria**

Para evaluar los niveles de ploidía de los callos obtenidos, se procedió a medir la cantidad de ADN mediante citometría de flujo, para lo cual se extrajeron los núcleos de las células de las hojas de las plantas parentales de los callos obtenidos de anteras y de las rosetas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo col-0 (*A. thaliana*) que se utilizó como un estándar para calcular la cantidad de ADN.

Para la extracción se procesaron 300 mg de hojas de *E. caribbean blue*, 50 mg de tejido de los callos y 150 mg de tejido de *A. thaliana*. El tejido vegetal se fijó durante 4 horas en etanol al 70% (49), y se transfirió a una de las soluciones de extracción de núcleos que se probaron (Tabla 3). El tejido se trituró con una navaja de afeitar y se incubó a 4°C durante 5 min para las soluciones de Gaudin (50) y Mishra (51), y 20 min para las soluciones de Otto (49), y Palomino (52). Posteriormente, la mezcla se filtró por una membrana con un poro de 40 µm, y se centrifugó durante 5 min a 1700 rpm. Se descartó el sobrenadante y se colocaron 200 µL de la solución de tinción que contenía PBS 100 mM, EDTA 10 mM y Triton

X-100 0.1%, pH 7.0 (53), suplementada con una concentración final de DAPI de 2 µg/mL (54). Los núcleos se tiñeron durante 15 min en oscuridad a 4°C. Posteriormente, se concentraron por centrifugación, se descartó la solución de tinción, se lavó el precipitado con 200 µL de PBS 300 mM pH 7.0 y se dejó durante 5 min a 4°C. Después se concentraron los núcleos por centrifugación y se descartó el PBS, finalmente se re-suspendieron en 300 µL de PBS 300 mM pH 7.0. Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo de la marca BD FACSAria.

**Tabla 3. Soluciones de extracción de núcleos**

<b>Solución:</b>	<b>Componentes:</b>
<b>Gaudin 2009</b>	Tris-HCl 10 mM pH 7.0, espermidina 4 mM, espermina 1 mM, MgCl <sub>2</sub> 5 mM, Triton X-100 0.1% (50).
<b>Mishra 2017</b>	Tris-HCl 200 mM, EDTA Na <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O 2.5 mM, MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O 4 mM, metabisulfito de sodio 10 mM, NaCl 86 mM Triton X-100 1.5% (v/v), polivinilpirrolidona 2% (p/v) pH 7.5, el pH se ajustó usando HCl 1 N (51).
<b>Otto 1990</b>	Ácido cítrico 0.2 M, Tween-20 0.5% (49).
<b>Palomino 2021</b>	Ácido cítrico 0.1 M, Tween-20 0.5% (52).

## 6.10.- Estadística de los datos obtenidos

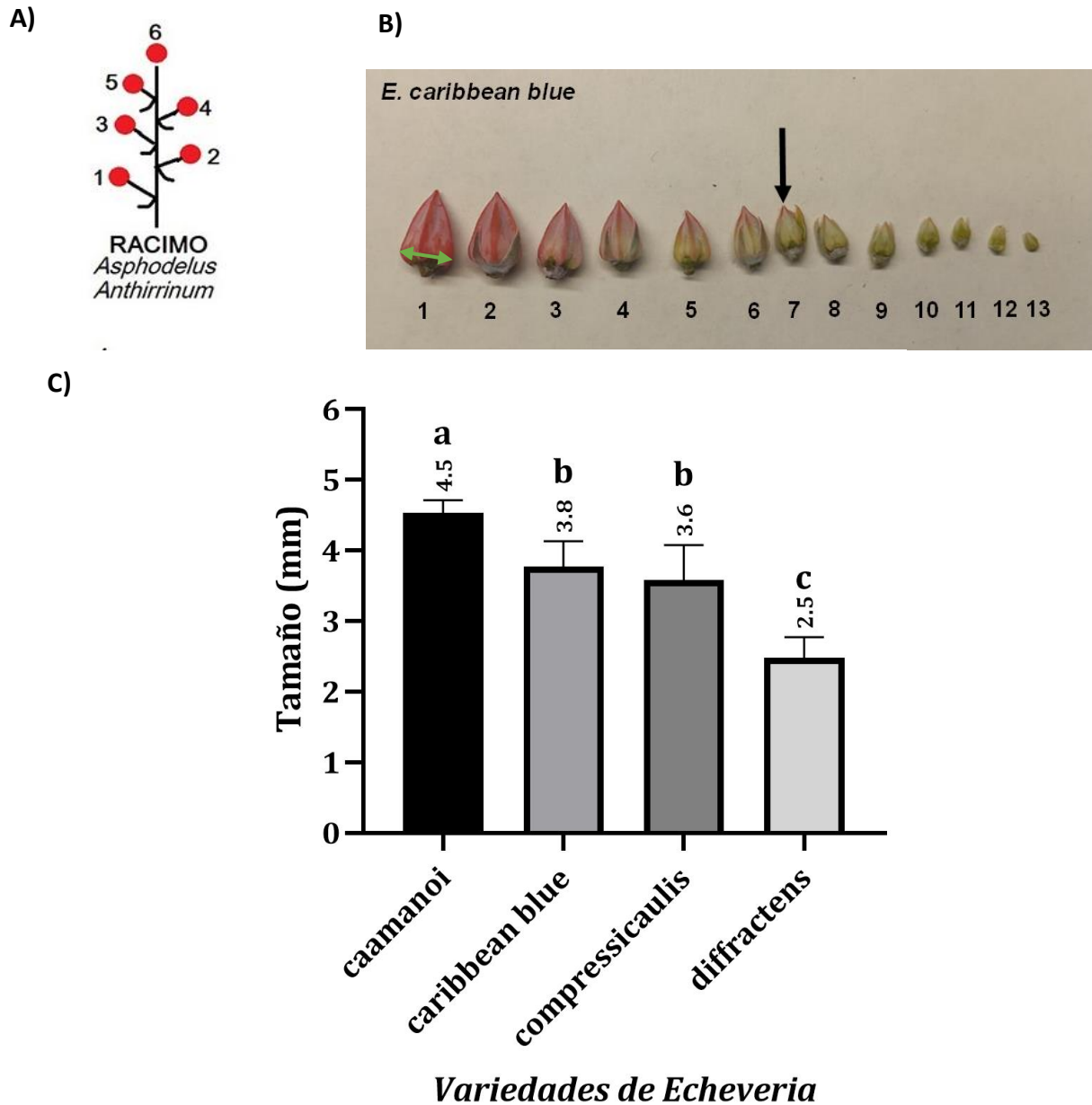
Para el análisis estadístico de los resultados obtenidos de los diferentes experimentos se realizó un análisis de ANOVA de una sola vía y una prueba de Tukey para encontrar diferencias significativas entre los diferentes tratamientos utilizados en cada experimento (55).

## **7.- Resultados**

### **7.1.- Análisis de la relación entre el estado de desarrollo del polen y el tamaño de los cfE y los cEp**

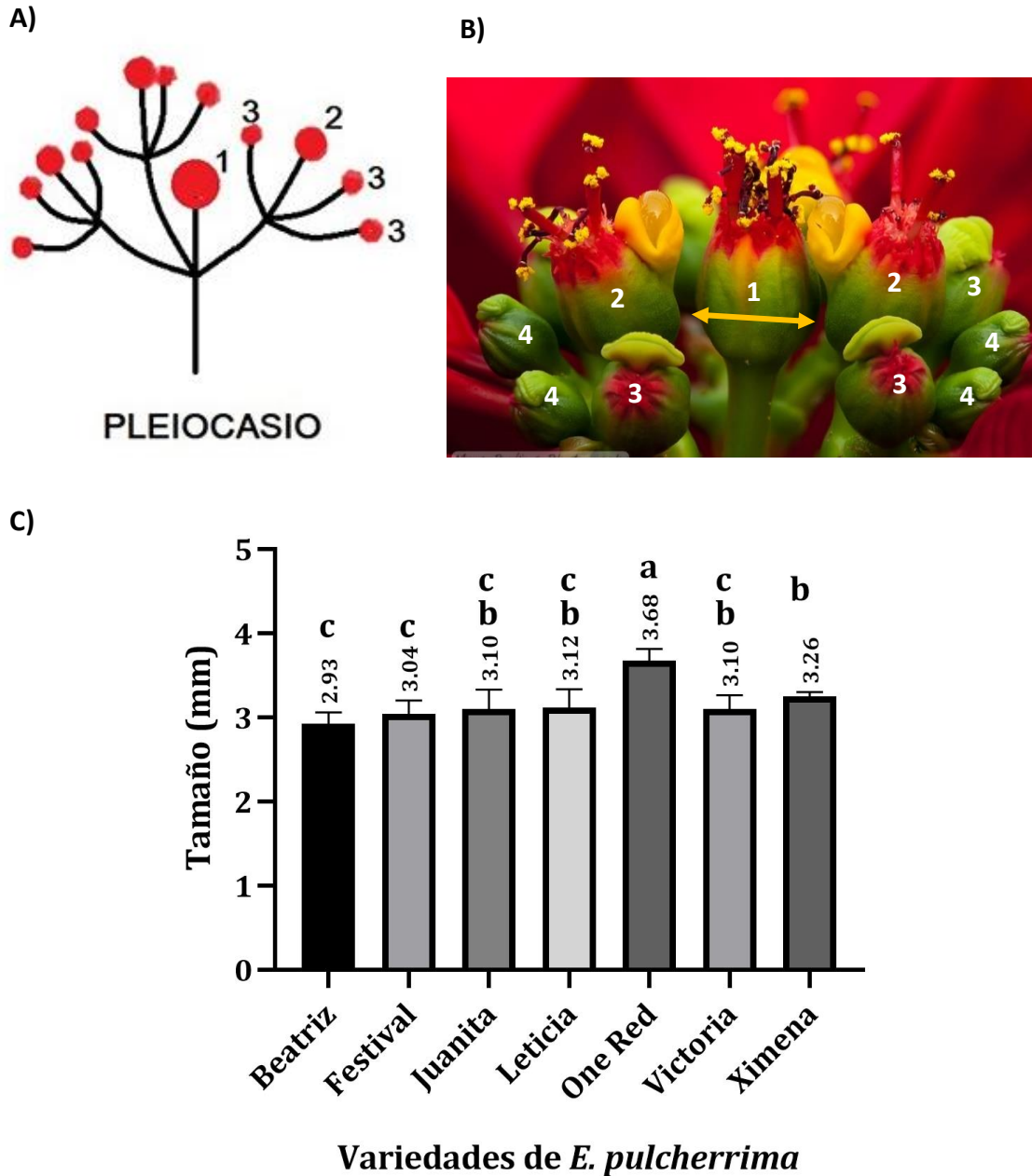
Para producir PDH es necesario iniciar un cultivo a partir de células haploides, para esto se requiere identificar las etapas del desarrollo del grano de polen y relacionarlo con alguna característica cualitativa del capullo floral, en nuestro trabajo se decidió relacionar el tamaño de los cfE y los cEp. Debido al desarrollo heterogéneo que presentan las inflorescencias (Figura 7-B y 8-B) en ambas especies se decidió trabajar por intervalos de tamaño, para poder medir los cfE y los cEp se clasificaron de acuerdo con su estado de desarrollo y se fotografiaron junto con una escala para hacer la medición del ancho de los cfE y los cEp en el programa imageJ (Figura 7-B y 8-B). La creación de los intervalos de tamaños fue con base a el valor más alto y bajo de los tamaños muestreados de los cfE y los cEp.





**Figura 7. Análisis del tamaño de los cfE.** **A)** Tipo de inflorescencia en Echeveria y jerarquía de los capullos florales. **B)** Clasificación del cfE. de acuerdo con su estado de desarrollo, la flecha señala el tamaño adecuado de cfE, la flecha de doble cabeza muestra cómo se midió el ancho del capullo floral. **C)** Se muestran el promedio del tamaño de los cfE para encontrar tétradas en las anteras de las variedades de Echeveria. *E. caribbean blue* n= 25, *E. caamanoi* n=10, *E. compressicaulis* n=20 y *E. diffractens* n=10. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía y una prueba de Tukey con un  $\alpha$  de 0.5 para el análisis estadístico.

El tamaño de los capullos florales de las distintas variedades de Echeveria en donde se localizaron tétradas se muestra en la (Figura 7-C). El análisis estadístico del tamaño de los cfE agrupa a las 4 especies de este trabajo en 3 grupos diferentes: *E. caamanoi*, que tiene el bulbo floral de mayor tamaño con 4.5 mm, *E. caribbean blue* y *E. compressicaulis*, cuyo bulbo floral fluctúa entre 3.6-3.8 mm y *E. diffractens*, que tiene el bulbo floral más pequeño con 2.5 mm. Considerando este estudio, decidimos que los intervalos de tamaño de bulbo floral aceptables para trabajar con cada variedad de Echeveria fueron: de 4.3 - 4.7 mm en *E. caamanoi*, de 3.2 - 4.5 mm en *E. caribbean blue*, de 3.1 - 4 mm en *E. compressicaulis* y, finalmente, de 2.1 – 2.8 mm en *E. diffractens*.



**Figura 8. Análisis del Tamaño de los CEp.** A) Tipo de inflorescencia de *E. pulcherrima* y jerarquía de los ciatos. B) Inflorescencia de *E. pulcherrima*, los números indican el estado de desarrollo de los ciatos y la flecha de doble cabeza muestra cómo se midió el ancho del ciato. C) Se muestra la media de los tamaños de los cEp. medidos en los cuales se puede encontrar anteras con tétradas en las variedades de *E. pulcherrima*. n=15. Se hizo un análisis de ANOVA de una vía y la prueba Tukey con un  $\alpha$  de 0.5.

Para las variedades de *E. pulcherrima*, el análisis estadístico del tamaño de los cEp agrupa a las siete variedades en cuatro grupos: el grupo de mayor tamaño se encuentra formado por *E. pulcherrima One Red* con 3.68 mm, el segundo grupo por *E. pulcherrima Ximena* con 3.26 mm, el tercer grupo se conforma por *E. pulcherrima Juanita* y *Victoria*, con 3.1 mm y *Leticia* con 3.12 mm; y el cuarto grupo conformado por *E. pulcherrima Beatriz* con 2.93 mm y *Festival* con 3.04 mm los cuales presentan el menor tamaño de ciato. Los tamaños de los cEp en donde se encontraron tétradas se muestran en la (Figura 8 - C). Al igual que en las variedades de *Echeveria* se trabajó con intervalos de tamaño para las diferentes variedades: el rango de *E. pulcherrima Beatriz* fue de 2.7 - 3.1 mm, *E. pulcherrima Festival* fue de 2.8 - 2.2mm, *E. pulcherrima Juanita* el rango se definió de 2.8 - 3.4 mm, *E. pulcherrima Leticia* y *Victoria* el rango fue de 3.00 - 3.3mm, *E. pulcherrima One Red* fue de 3.5 – 4 mm y el tamaño de *E. pulcherrima Ximena* fue 3.2 - 3.4 mm.

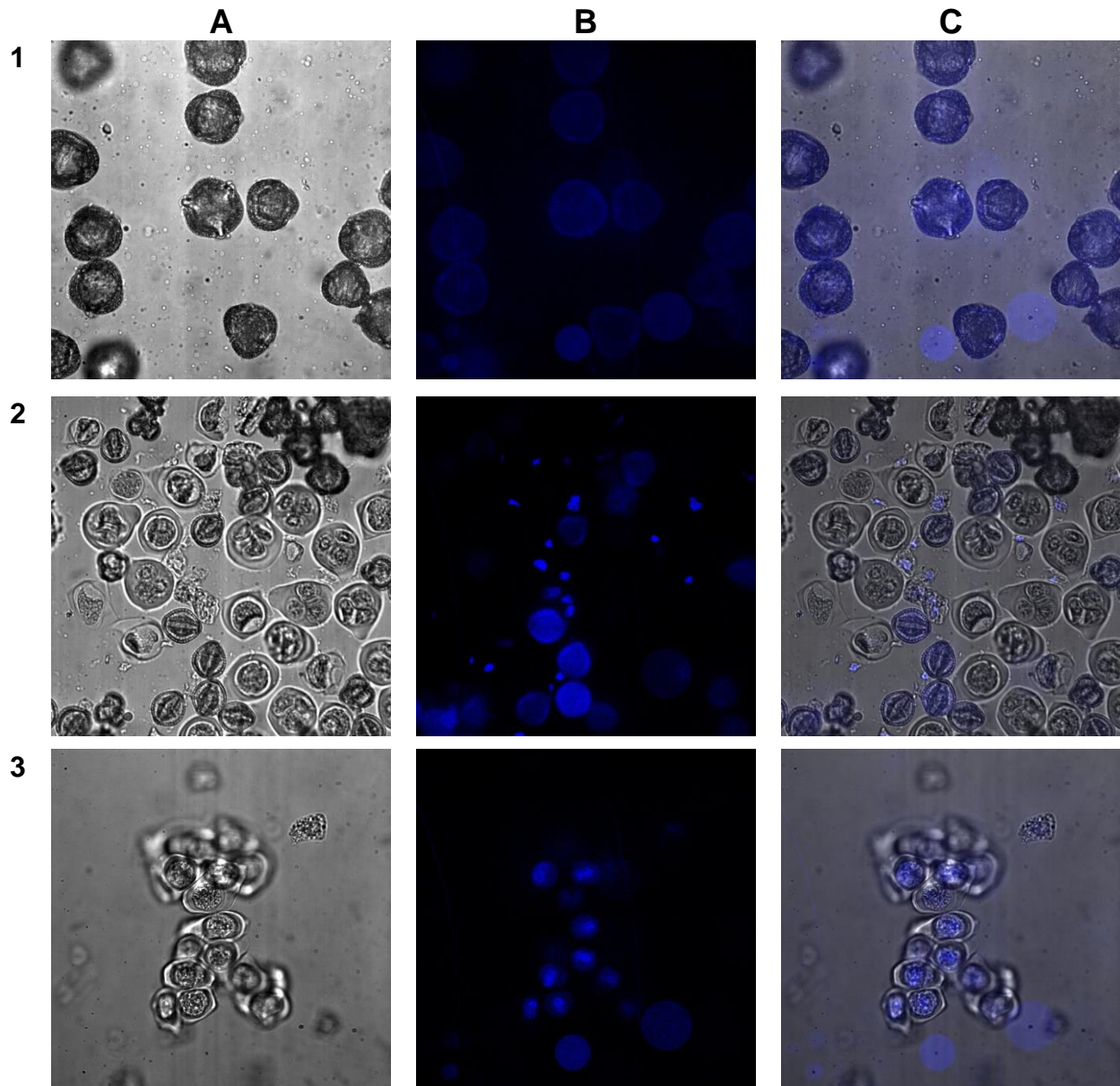
De estos análisis se puede deducir que el desarrollo floral de las inflorescencias de *Echeveria* y de *E. pulcherrima* no son homogéneos entre la especie ni entre las variedades, esto se debe principalmente a la forma de cultivo de las plantas parentales en *Echeveria* y a la variabilidad genética en *E. pulcherrima*.

## **7.2.- Tinción del material genético en el desarrollo del grano de polen en los cfE y los cEp**

Después del proceso de meiosis en el desarrollo del polen las tétradas resultantes continúan su desarrollo cada una de forma independiente para llegar a ser un grano de polen maduro, el cual se caracteriza por ser tri celular, esto se lleva a cabo luego de varios procesos de mitosis. Para el caso de la creación de plantas haploides es necesario trabajar con las células resultantes de la meiosis y aislarlas antes de que tengan el primer proceso de mitosis, por lo cual una vez identificados los tamaños de los cfE y los cEp, se extirparon las anteras de estos y se tiñeron

con DAPI, un fluoróforo que se une al DNA, en donde se intercala con la timina, esto se hizo para tratar de identificar el tamaño del ancho del capullo floral donde había células haploides. en cuál de los tamaños teníamos células haploides.

En la Figura 9 se muestran los resultados de la tinción con DAPI de los gametos masculinos de *E. pulcherrima*, como se puede observar en el panel (9-1A-C), no se logró teñir el ADN en los granos de polen maduro y el colorante se quedó impregnado en la pared del grano, esto se debe a la anatomía del grano de polen que no permitió la internalización del DAPI. En el panel (9-2A-C) podemos observar varios estados del desarrollo del polen de *E. pulcherrima*, además, se pueden observar tétradas de *E. pulcherrima* en las que tampoco se tiñó el ADN. Finalmente, en el panel (9-3A-C) se observa a las células madre del polen, las cuales están en un proceso de meiosis I y en la imagen (9-3B) se aprecia la distribución del material genético en dos nuevos núcleos.



**Figura 9. Tinción con DAPI de los gametos masculinos de *E. pulcherrima*.** En la imagen se pueden ver distintas etapas de desarrollo del polen. **A)** Imágenes de los diferentes estados de desarrollo del polen de *E. pulcherrima* poner qué estados son 1, 2 (señalar con una flecha a las tétradas) y 3 . **B)** Tinción con DAPI, imágenes tomadas cuando se excita a una longitud de onda de 365 nm en células teñidas con DAPI. **C)** Superposición de las imágenes de la columna A y B. Imágenes tomadas con un microscopio confocal “Nikon ECLIPSE Ti” con un objetivo 40 X.

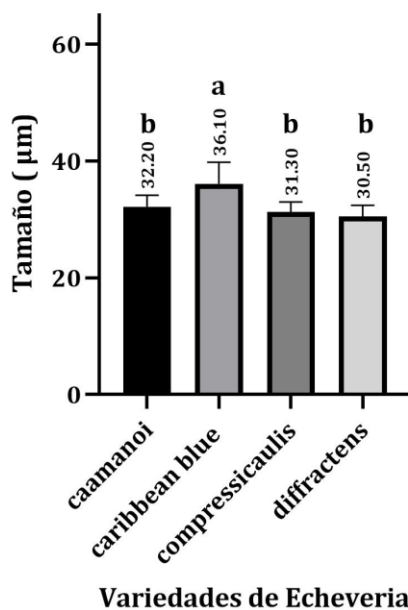
No se pudo teñir el núcleo de las células haploides resultantes del proceso de meiosis debido a que el DAPI no permeabilizó dentro de las tétradas y del grano de polen ya que se mantuvo en la periferia de la pared. Por esta razón, decidimos trabajar con las tétradas aisladas, que son células haploides que cumplen con las características para reproducir PH.

### **7.3.- Estimación del tamaño de las tétradas de *Echeveria* y *E. pulcherrima***

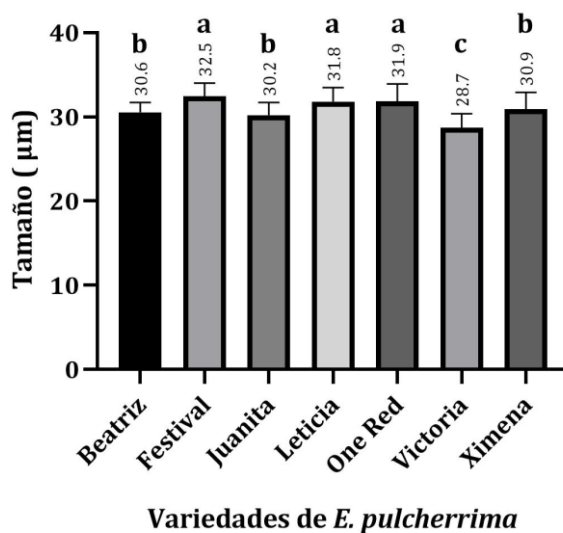
Se tomaron anteras al azar y se liberó su contenido sobre un portaobjetos, se colocó un cubreobjetos y la muestra se observó en un microscopio invertido, se midieron 10 tétradas al azar, este proceso se repitió 5 veces. La finalidad de estimar el tamaño de las tétradas de ambas especies fue para utilizar un tamiz con el tamaño de poro adecuado que permitiera enriquecer a la población celular de interés y a la vez, eliminar los restos de tejido. En la (Figura 10) se observa que tanto *Echeveria* como *E. pulcherrima* desarrollan tétradas de tamaño similar; las tétradas de las variedades *E. caamanoi*, *E. compressicaulis* y *E. diffractens* se encuentran entre los 30.5 y 32.2  $\mu\text{m}$ . Dentro de este grupo destacan las tétradas de la variedad de *E. caribbean blue* que son más grandes, con un tamaño promedio que alcanza las 36  $\mu\text{m}$  (Figura 10-A). En el caso de las tétradas de las variedades de *E. pulcherrima*, 6 de las 7 variedades desarrollan tétradas en un rango de 30 a 32.5  $\mu\text{m}$ , mientras que la variedad de *E. pulcherrima Victoria* sobresale por desarrollar tétradas más pequeñas, de alrededor de 28.7  $\mu\text{m}$  (Figura 10-B).

Por lo anterior, para el enriquecimiento de la preparación de tétradas de ambas especies se decidió utilizar un filtro con un poro de 40  $\mu\text{m}$ .

A)



B)



**Figura 10. Tamaño de las tétradas de *Echeveria* y *E. pulcherrima*.** **A)** La gráfica muestra el tamaño promedio de las tétradas de las variedades de *Echeveria* que se incluyeron en este trabajo. **B)** La gráfica muestra el tamaño promedio de las tétradas de las variedades de *Euphorbia*. Se hizo un análisis de ANOVA de una vía y la prueba Tukey con un  $\alpha$  de 0.5,  $n=50$ .

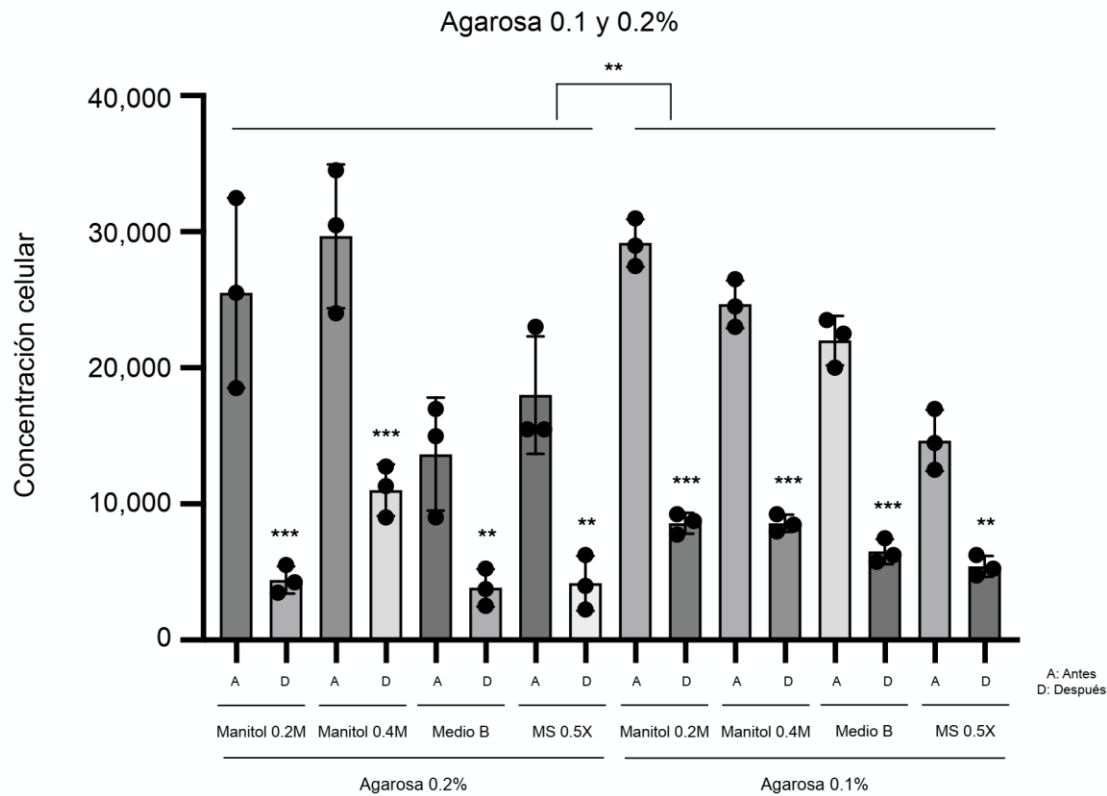


Debido a la desincronización de la floración de *E. compressicaulis* esta variedad se descartó para los siguientes análisis, al igual que *E. caamanoi*, *E. diffractens* las variedades de *E. pulcherrima* se descartaron dado a la baja cantidad de plantas parentales con las que se contaba, por lo que en los siguientes experimentos se utilizó únicamente la especie de *E. caribbean blue*.

#### **7.4.- Cuantificación de la eficiencia de los medios para la extracción de tétradas de *E. caribbean blue***

Para poder realizar el cultivo de células gaméticas es necesario primero aislar las células en un medio que permita la viabilidad celular. Se probaron cuatro medios de aislamiento para tétradas de *E. caribbean blue*, para liberar el contenido de la anteras se utilizó la técnica de *squash* que consiste en colocar las anteras sobre dos portaobjetos con un poco del medio de aislamiento y presionarlos ligeramente para liberar el contenido de las anteras; la mezcla resultante se pasó por un tamiz con un poro de 40  $\mu\text{m}$  para dejar pasar solo las células de interés. Para evitar la aglomeración celular al momento de filtrar y mejorar la eficiencia de este proceso se utilizaron dos diferentes concentraciones de agarosa 0.1% y 0.2%. Para el análisis de este experimento se cuantificó la concentración celular antes y después del proceso de filtrado.

En la Figura 11 se muestran los resultados del experimento, mediante el análisis de ANOVA de una vía entre las dos concentraciones de agarosa se encontró que existen diferencias significativas entre ambas concentraciones; un análisis de ANOVA de dos vías mostro que hay diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre antes y después de filtrar para todos los medios utilizados. Finalmente, se realizó un análisis de correlación que mostró que la combinación de agarosa al 0.1% con los medios de manitol 0.2 M y manitol 0.4 M son los mejores medios para el aislamiento de tétradas de *E. caribbean blue*.

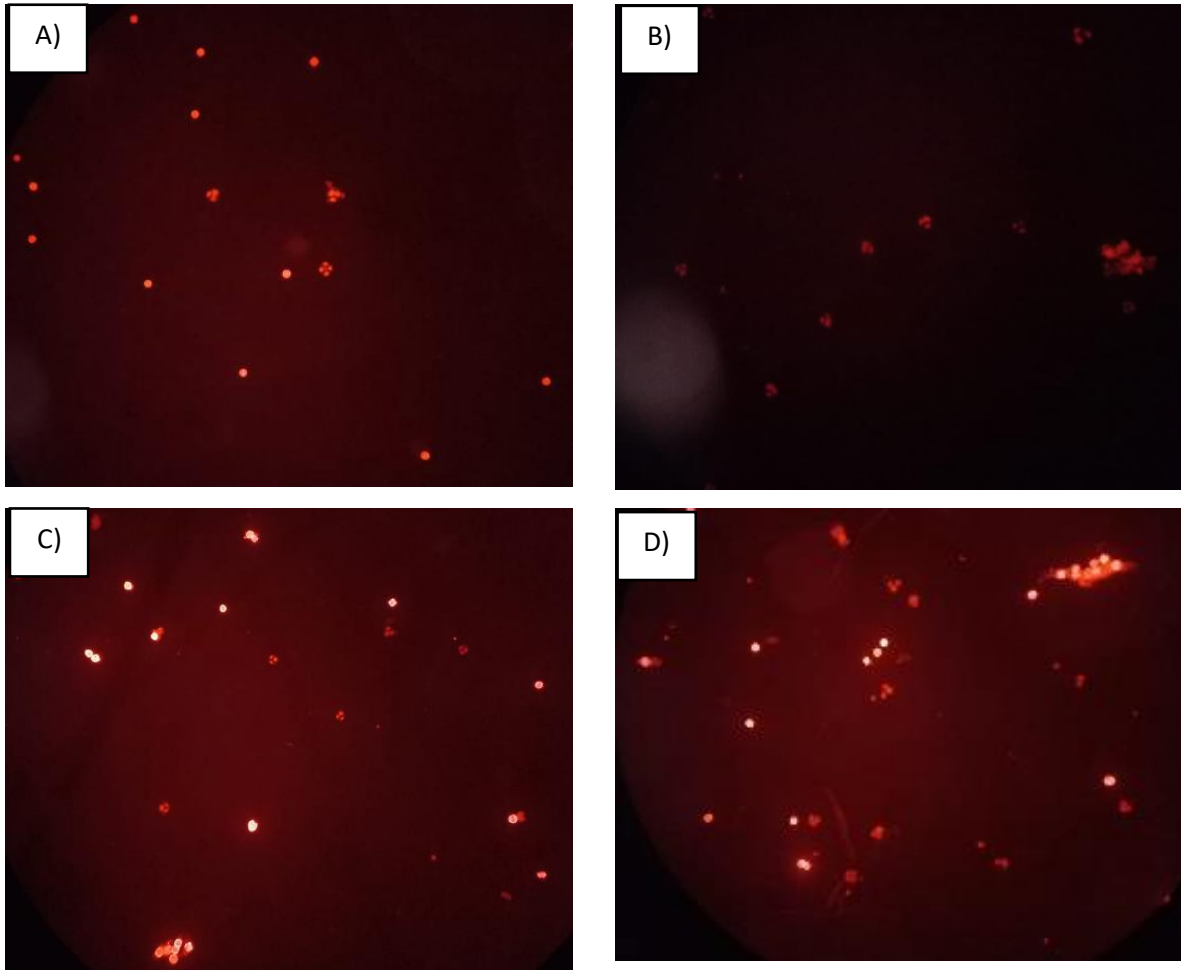


**Figura 11. Eficiencia de los medios de aislamientos de tétradas y con concentraciones de agarosa.** Medios de aislamiento probados en combinación con dos concentraciones de agarosa al 0.2%. y al 0.1 % . A= antes del filtrado y D= después del filtrado. El análisis estadístico incluyó una prueba de ANOVA de una vía para cada una de las concentraciones , una prueba de ANOVA de dos vías para todas las combinaciones utilizadas y una prueba de Tukey con un  $\alpha$  de 0.5.

Después de analizar los resultados anteriores se decidió trabajar con la concentración de agarosa al 0.1% en combinación con los medios de manitol 0.2 M y manitol 0.4 M, y realizar una prueba de viabilidad para ver la integridad de las tétradas en ambos medios. Para esta prueba se utilizó PI dado que se une al material genético y no es permeable en células vivas. Los resultados se muestran

en la (Figura 12). En la (Figura 12 - C y D) que pertenecen al medio B y el medio MS 0.5 X, respectivamente, se pueden observar células de color rojo intenso, lo que significa que ya no son viables, debido a que la membrana celular perdió su integridad y el PI logró internalizarse y unirse al ADN, mientras que en los medios de manitol 0.2 M y 0.4 M Figura (12- A y B), las tétradas se observan de un color rojo opaco, lo que se significa que son células viables ya que el PI no se internalizo en la célula, aunque en el medio de manitol 0.2 M la coloración es un poco más intensa que en el manitol 0.4 M.

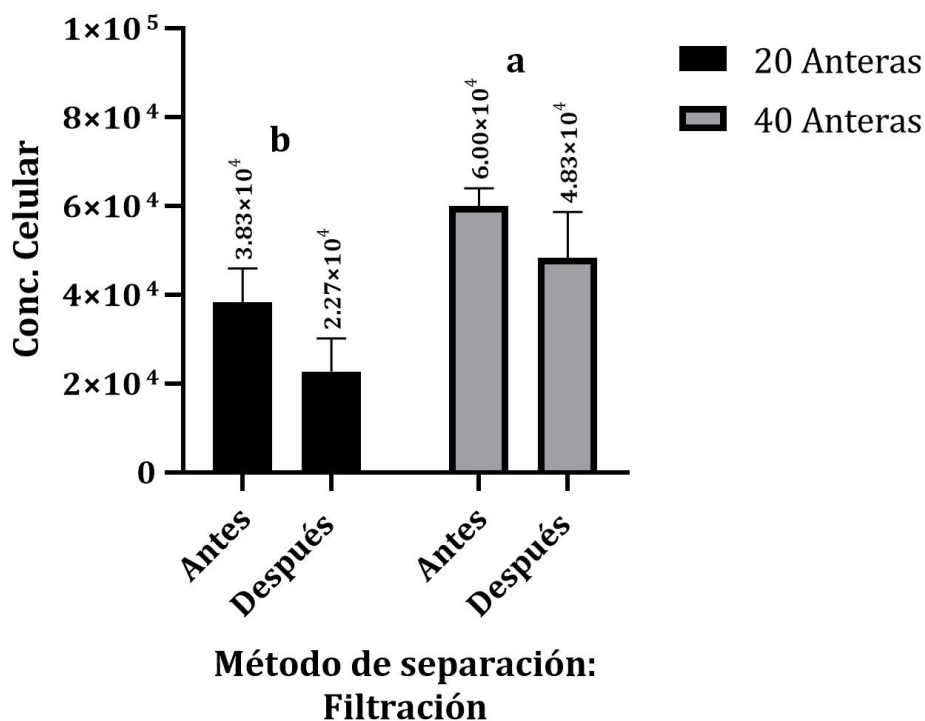
Después de analizar el resultado anterior se decidió trabajar con el medio manitol 0.4 M y la concentración de agarosa de 0.1% para el aislamiento de tétradas de *E. caribbean blue*.



**Figura 12. Prueba de viabilidad con IP en tétradas de *E. caribbean blue*.** Se muestran los resultados de la prueba de viabilidad realizada con los 4 diferentes medios de aislamiento y agarosa al 0.1 % suplementados con IP 10 µg/ mL. **A)** 0.2 M de manitol. **B)** 0.4 M de manitol. **C)** medio B y **D)** 0.5 X MS. Fotografías tomadas en un microscopio de fluorescencia a 112 X, a una longitud de onda 636 nm.

Después de analizar el resultado anterior se eligió trabajar con el medio manitol 0.4 M para aislar las tétradas. Se decidió bajar la concentración de agarosa de 0.1% a 0.01% para evaluar si la eficiencia de aislamiento aumentaba aún más. Los resultados se muestran en la Figura 13, en donde se observa el número de tétradas que se obtuvieron usando el medio de aislamiento manitol 0.4 M y agarosa al 0.01% al procesar 40 y 20 anteras, respectivamente. Observamos que

la eficiencia de aislamiento de tétradas íntegras aumenta considerablemente, por lo que se decidió utilizar estas condiciones para la extracción de las tétradas de *E. caribbean blue*.



**Figura 13.** Aislamiento de tétradas íntegras de *E. caribbean blue* utilizando como medio 0.4 M de manitol y 0.01% de agarosa. En este ensayo, se utilizaron 20 y 40 anteras, respectivamente, de *Echeveria caribbean blue* para obtener tétradas. Se realizó una prueba de ANOVA de una vía y una prueba de Tukey con un  $\alpha$  de 0.5.

Finalmente, para poder aislar las tétradas se decidió utilizar el medio manitol 0.4 M en combinación con agarosa al 0.01% y una vez liberadas las células de las anteras se realizó un proceso de filtración por un tamiz de 40 (micras).

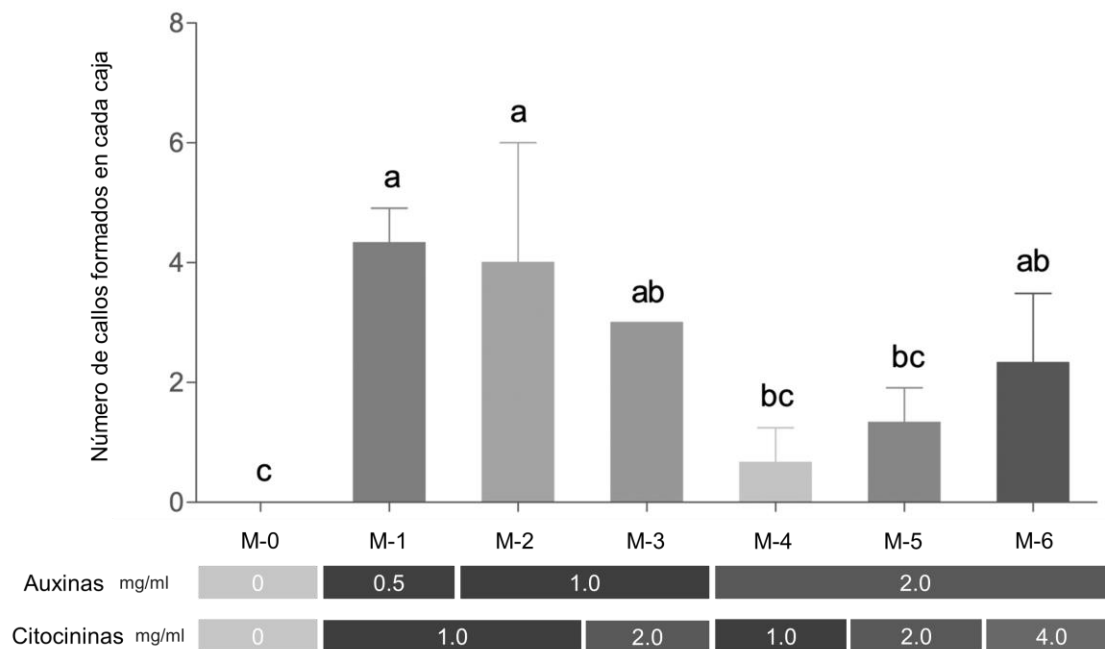
## **7.5.- Inducción de callos a partir del cultivo de anteras de *E. caribbean blue***

Para poder obtener callos o embriones haploides, las células uninucleadas aisladas y las anteras que contienen estas células se sembraron en medios de inducción que contienen diferentes combinaciones de auxinas y citocininas (Tabla 1), para la versión en donde se utilizaron las células uninucleadas aisladas, se plaquearon 3 concentraciones 1000, 2000 y 3000 células, las células se dejaron en oscuridad total en una cámara de crecimiento a 25 °C. La otra versión de este experimento se hizo plaqueando 8 anteras por caja sobre los distintos medios de inducción (Tabla 1); las anteras se incubaron en oscuridad a 27°C durante cinco días y se transfirieron a una cámara de crecimiento a 25 °C en oscuridad total.

Lamentablemente en los experimentos en donde se utilizaron las células haploides aisladas no se obtuvieron callos y hubo contaminación en varias cajas después de un mes de la siembra de las células.

En las cajas en las que se sembraron las anteras se obtuvieron callos a partir de la primera semana después de la siembra. Para analizar la eficiencia de los medios se comparó el número de callos formados en los diferentes medios de inducción, los resultados de la Figura 14, muestran que la mayor cantidad de callos se forma en los medios 1 y 2, que contienen 0.5 y 1 mg/ml de auxina (2,4-D), respectivamente, y 1 mg/ml de citocinina (6-BAP). Con base en este análisis podemos concluir que estos son los mejores medios para inducir callos a partir de las anteras de *Echeveria Caribbean blue*.

En donde el análisis estadístico mostró diferencias significativas entre el número de callos formados de los medios M-1 y M-2 comparados con los otros medios, por lo cual las concentraciones adecuadas de la hormona auxina 2,4-D es de 0.5 mg/mL y 1 mg/mL, y la concentración óptima de la hormona citocinina 6-BAP es de 1 mg/mL para la inducción a la embriogénesis gamética a partir de anteras de *E. caribbean blue*.

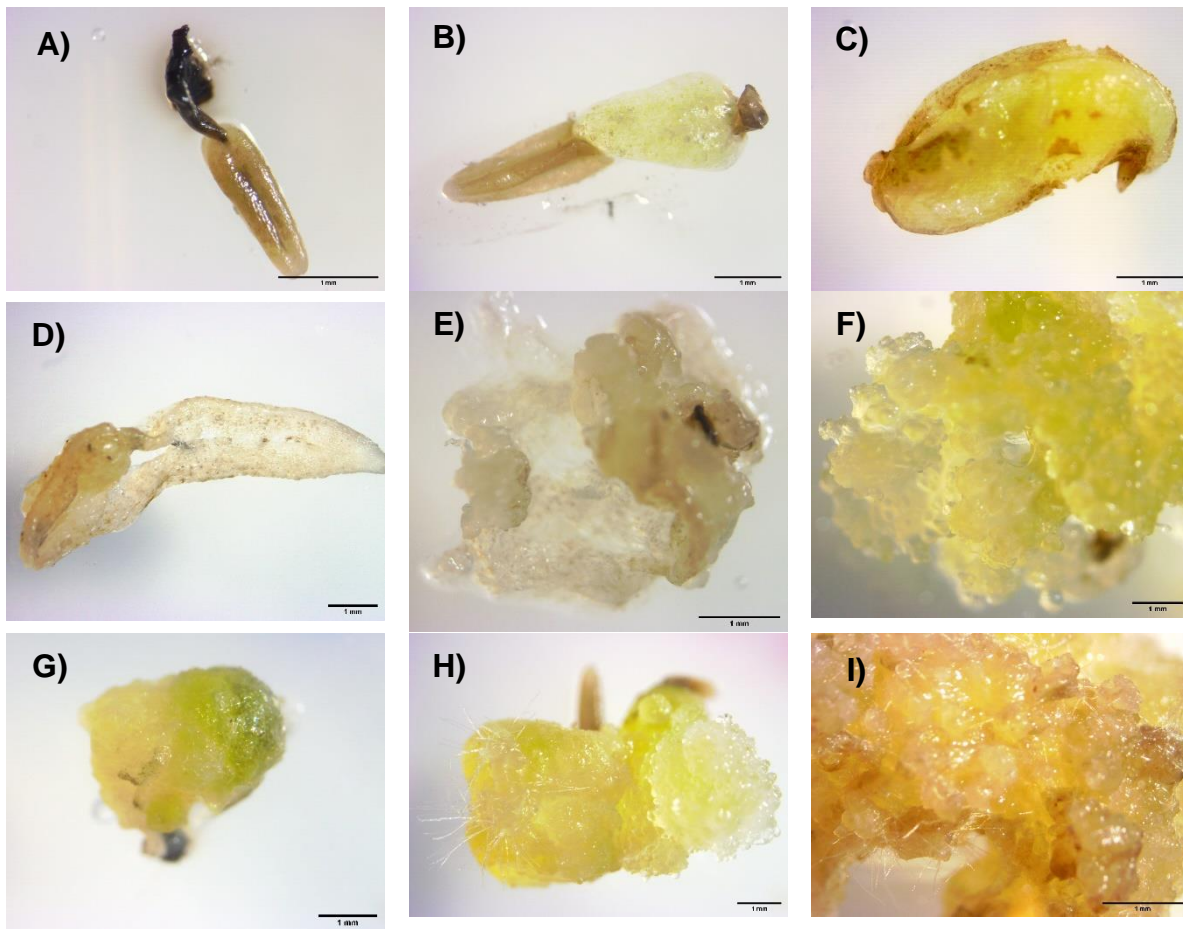


**Figura 14. Formación de callos a partir de anteras de *E. caribbean blue*.** Se muestra el número de callos obtenidos por caja en los medios de inducción utilizados. Los datos se analizaron una prueba de ANOVA de una vía y la prueba Tukey con un  $\alpha$  de 0.5, n=48 anteras

El periodo de incubación a 27°C durante 5 días facilitó la deshidratación de la pared externa de la antera y del filamento (Figura 15-A). Tras 3 a 4 días a 25 °C, algunas de las anteras empezaron a expulsar su contenido (Figura 15-B), mientras que otras se empezaron a hinchar hasta que expusieron su material interno (Figura 15-C). Las anteras se monitorearon durante un mes, cada semana se observaban como crecían los callos y si había algún cambio de coloración o textura.

A lo largo del primer mes de cultivo se observó la formación y el crecimiento de los callos. En cuanto a su fenotipo, algunos eran traslúcidos (Figura 15-D y E), mientras que otros presentaban tonalidades entre verde y amarillo (Figura 15-F). Al término del mes, algunos callos empezaron a desarrollar estructuras diferenciadas, pelos principalmente, en los medios en donde la concentración de auxinas era mayor (Figura 15-H), mientras que otros empezaron a formar

estructuras circulares de color verde intenso (Figura 15-G) y otros adquirieron un color café (Figura 15-I). Cabe mencionar que algunos de los callos detuvieron su crecimiento de manera temprana (Figura 14 D y G), por lo cual no son viables para seguir multiplicándolos y poder tener el suficiente tejido para los experimentos de diferenciación.



**Figura 15. Desarrollo de callos a partir de anteras de *E. caribbean blue*.** **A)** Antera luego de incubarse 5 días a 27°C. **B)** Antera liberando su contenido. **C)** callo rompiendo la pared de la antera. **D)** Callo con apariencia opaca. **E)** callo translúcido. **F)** callo verde-amarillento. **G)** Formación de estructura circular de color verde. **H)** Formación de estructuras diferenciadas, pelos. **I)** Callo pardo después de un mes de cultivo. A-C imágenes tomadas 10 días después de la siembra, D-I callos con 2 meses de edad. Barra de escala es igual a 1mm.



## 7.6.- Diferenciación de los callos de *E. caribbean blue*

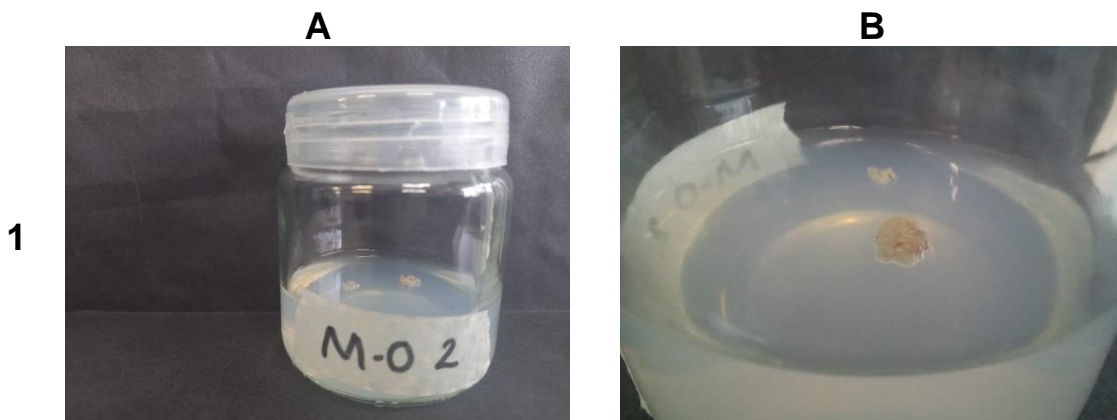
En la obtención de PH por el método de androgénesis pueden suceder dos eventos durante el proceso de inducción a la embriogénesis, las células pueden inducirse directamente a proceso de embriogénesis o a la formación de callos. En este trabajo nosotros obtuvimos callos, para obtener plantas es necesario llevar a cabo un proceso de diferenciación de estos. Para esto se colocaron 2 fragmentos de callos sobre medios con varias combinaciones de concentraciones de hormonas vegetales sintéticas que se muestran en la (Tabla 2), los fragmentos se cultivaron a 25 °C en una cámara de crecimiento con fotoperiodo 16/8, y se monitorearon por 12 semanas.

<b>MEDIO</b>	<b>PGRs (mg/L)</b>	
	<b>ANA</b>	<b>6-BAP</b>
<b>MD-0</b>	0	0
<b>MD-1</b>	0.01	0
<b>MD-2</b>	0.03	0
<b>MD-3</b>	0.1	1
<b>MD-4</b>	1	0.1

Después de las tres primeras semanas de cultivo de los callos en los medios de diferenciación, se observó un aumento de tamaño del callo en el medio MD-4 (Tabla 2) (Figura 16-A y B), mientras que en los otros medios no se observó ningún cambio. A las seis semanas de cultivo se notaron los primeros signos de diferenciación en el medio MD-3 (Tabla 3) (Figura 16-4A y 4B), donde hubo un cambio de coloración de blanco a verde en una porción del callo (Figura 16-4B), además de un pequeño aumento de tamaño antes de empezar el cambio de coloración.

En el medio MD-4 (Tabla 3) (Figura 16-A y B) también se observaron señales de diferenciación, en la cual los callos desarrollaron estructuras de pelos en toda la superficie (Figura 16-B) y un evidente aumento de tamaño, en la zona que se encuentra en contacto con el medio se empezó a observar un cambio de color de blanco a verde, cabe destacar que hasta ese momento no se observaron brotes en ninguno de los dos medios MD-3 y MD-4. En los medios restantes MD-0, MD-1 y MD-2 no se observó ningún cambio.

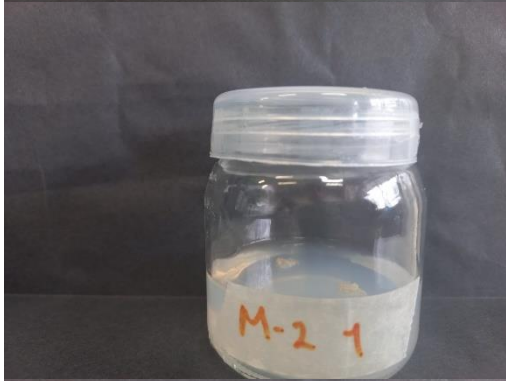
Luego de 12 semanas en el medio MD-3 se lograron observar las primeras plántulas en 2 de las 3 réplicas técnicas, mientras que en el medio MD-4 los callos siguieron aumentando de tamaño y produciendo pelos, en las zonas que se comenzaron a diferenciar no se logra distinguir la formación de embriones o plántulas debido a que están embebidas en el medio y en los medios restantes no se notó ningún cambio hasta el momento. Las plántulas se dejaron crecer dos semanas más, desafortunadamente a causa de un fallo en el equipo en donde se cultivaban se perdieron.



2



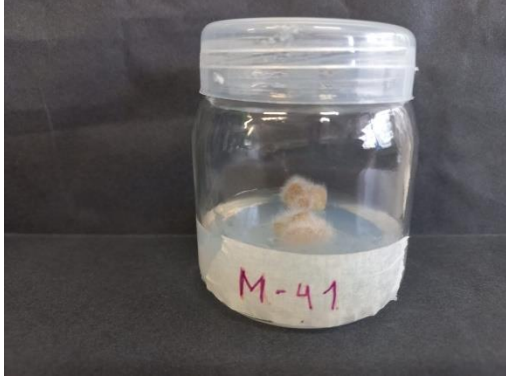
3



4



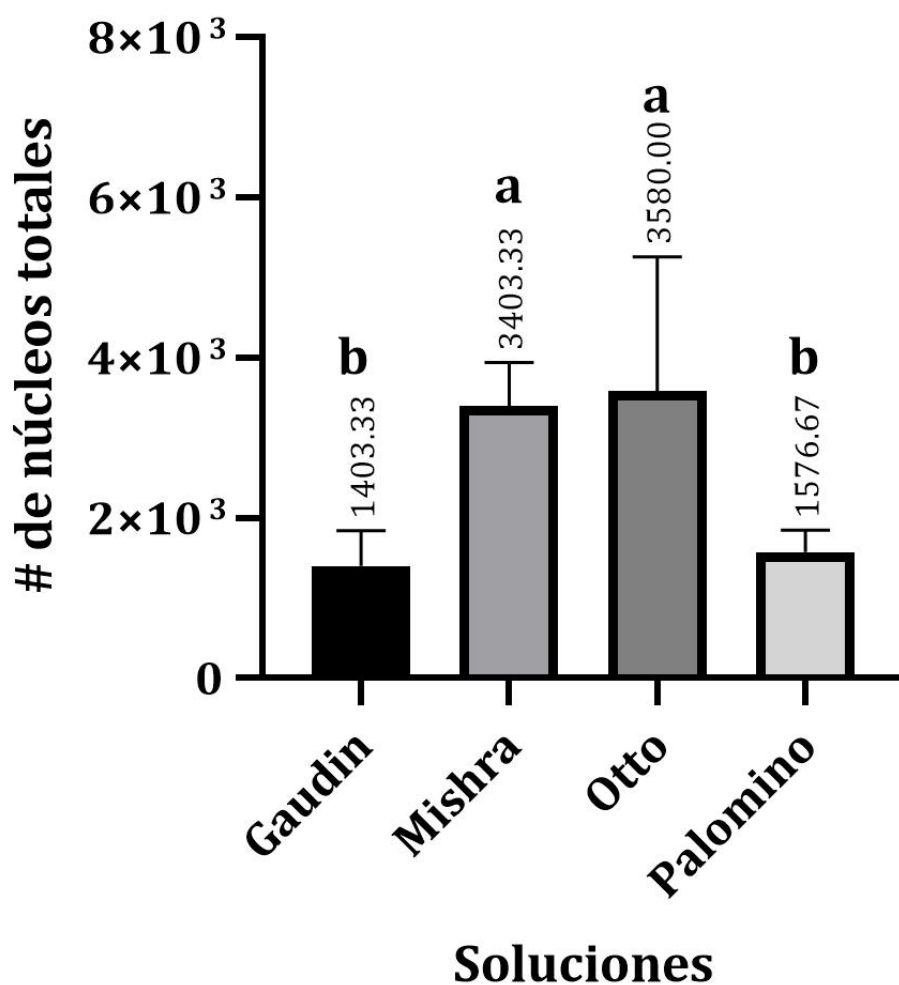
5



**Figura 16. Diferenciación de los callos de *E. caribbean blue*.** Se muestran la diferenciación de los callos de *Echeveria* en los diferentes medios propuestos (Tabla 3). **A)** Se muestra el cultivo in vitro de los callos. en la columna. **B)** Se muestra con más detalle las diferentes morfologías durante la diferenciación. Las Fotos se tomaron 8 semanas después de la transferencia a los medios.

### **7.7.- Estandarización de la extracción de núcleos de *E. caribbean blue***

Una vez obtenidos los callos o embriones es necesario comprobar los niveles de ploidia de estos, para este proceso se utilizan varias técnicas como el cariotipado o la citometría de flujo, esta última es la que se utilizó en este trabajo para identificar a los organismos haploides. Luego de obtener callos desarrollados a partir de las anteras de *E. caribbean blue* que contenían tétradas en su interior, se cuantificaron los niveles de ploidia para asegurar que éstos se desarrollaron a partir de células haploides. Primero se obtuvo el tamaño promedio de las células que formaban los callos, dichas células miden 123.2  $\mu\text{m}$ .



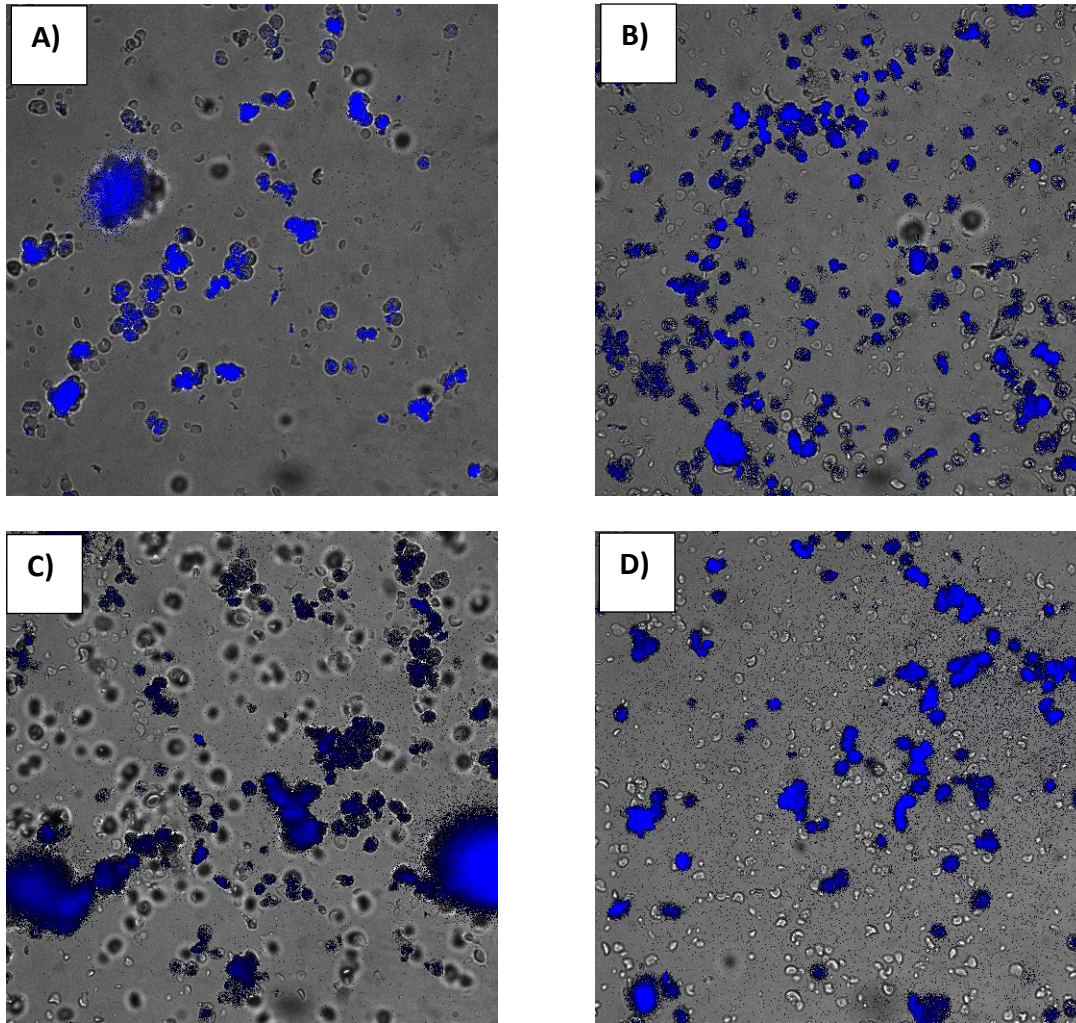
**Figura 17. Obtención de núcleos en *E. caribbean blue* para la cuantificación de ADN.** Se muestra la cuantificación de los núcleos extraídos por las diferentes soluciones de extracción. En cada preparación se digirieron 150 mg de tejido de hoja de *E. caribbean blue* . Los datos se analizaron una prueba de ANOVA de una vía y la prueba Tukey con un  $\alpha$  de 0.5.

Una vez determinado el tamaño de las células de los callos, se probaron cuatro soluciones de extracción de núcleos; la solución de Gaudin fue utilizada para la extracción de núcleo de *A. thaliana*, además esta especie se utilizó como estándar para saber la cantidad de ADN de Echeveria, la solución de Mishra que fue utilizada en el aislamiento de núcleos de la especie *Camellia assamica ssp.*

*lasiocalyx*, la solución de Otto que se utilizó para la extracción de núcleos en tejido animal y la solución de Palomino que se utilizó para la extracción de núcleos de 23 especies de *Echeveria*. Para aislar los núcleos de *Echeveria* se pesaron 150 mg de tejido y se colocaron en las soluciones de extracción de núcleos ya mencionadas, luego se trituró el tejido con ayuda de una navaja de afeitar y se dejó incubando a 4°C, el macerado se pasó por un tamiz de 40 µm, los núcleos se cuantificaron en una cámara de Neubauer, después se tiñeron con DAPI y se observaron al microscopio para determinar su integridad.

Los resultados de las pruebas se muestran en la Figura 17. En todas ellas se digirieron 150 mg de tejido tomado de las hojas de *Echeveria* tras analizar los datos, determinamos que el uso de las soluciones Mishra y Otto permitió obtener un mayor número de núcleos. Este análisis se complementó con la visualización de la integridad de los núcleos extraídos mediante microscopía, en donde los núcleos se tiñeron con DAPI. Imágenes representativas se muestran en la Figura 18. En esta figura se observa que, independientemente de la solución utilizada en el proceso de purificación, los núcleos se encuentran íntegros. Sin embargo, con esta prueba nos percatamos que se formaban agregados. En las soluciones de Gaudin y Otto (Figura 18-A y C) los agregados que se forman son de un tamaño mayor que los de Mishra y Palomino (Figura 18-B y C), además la solución de Palomino también presenta agregados, pero de menor tamaño. Por lo anterior, se eligió la solución de Mishra para el protocolo de enriquecimiento de núcleos, debido a que es la solución en donde detectamos un número menos de agregados, y la segunda solución en donde se obtiene una mayor cantidad de núcleos.



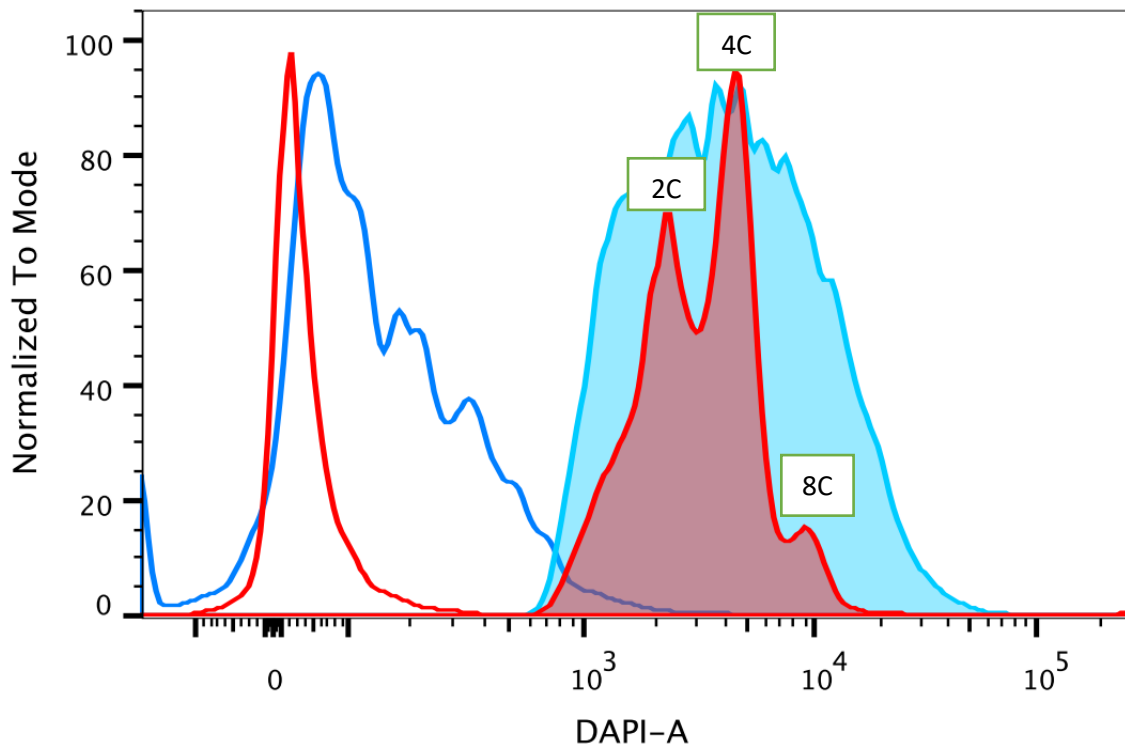


**Figura 18. Integridad de los núcleos de *E. caribbean blue*.** Se muestra la tinción de los núcleos extraídos con las diferentes soluciones de extracción, los núcleos se tiñeron con DAPI. **A)** Gaudin, **B)** Mishra, **C)** Otto, **D)** Palomino.

### **7.8.- Estimación del contenido nuclear de *E. caribbean blue***

Una vez estandarizado el método de extracción de núcleos de *E. caribbean blue* el siguiente paso para seleccionar los haploides es hacer el análisis de citometría de flujo de los núcleos extraídos para estimar el contenido de ADN de la variedad *E. caribbean blue*. Para esto es necesario compararlo con un estándar, por lo cual

como estándar para cuantificar el contenido nuclear se utilizó a la especie modelo *A. thaliana*. Se tomó tejido de las hojas de ambas especies por separado y duplicado, el tejido se colocó en la solución de extracción de núcleos de Mishra luego se trituró con una navaja de afeitar y los núcleos aislados de una muestra de cada especie se tiñeron con DAPI para estimar su contenido nuclear, los núcleos de las muestras sin teñir de cada especie se utilizaron como control, todas las muestras fueron analizadas por citometría de flujo.



	Sample Name
■	Specimen_001_E marcadas_001_008.fcs
□	Specimen_001_E control_006.fcs
■	Specimen_001_A marcadas_002_009.fcs
□	Specimen_001_A no marcadas_004.fcs

**Figura 19. Cuantificación de los niveles de ploidia en *E. caribbean blue*.** Se muestra la estimación de los niveles de ploidia de *Echeveria* (en la simbología E), como estándar para saber el contenido de ADN se utilizaron núcleos de la especie de *A. thaliana* (en la simbología A), marcadas = teñidas.



En la (Figura 19) se muestran los resultados de la citometría de flujo de las muestras de ambas especies, en el histograma en el eje de las ordenadas se muestra el número de eventos, mientras que en el eje de las abscisas se muestra la fluorescencia relativa que es proporcional a la cantidad de DNA. El color azul pertenece a las muestras de *A. thaliana* y el color rojo corresponde a las muestras *E. caribbean blue*, donde el área bajo la curva sin rellenar indica la autofluorescencia de los núcleos de las muestras sin teñir, mientras que el área bajo la curva con relleno pertenece a los núcleos teñidos con DAPI. En el histograma se observan picos, cada uno de ellos pertenece a una población de núcleos.

Los resultados de este experimento indican que la muestra de núcleos sin marcar de *E. caribbean blue* es homogénea y presenta poca autofluorescencia, por lo que solo se ve una población, mientras que la muestra del estándar (*A. thaliana*) es heterogénea por lo que presenta varias poblaciones y niveles de autofluorescencia. Para la muestra de los núcleos teñidos de *E. caribbean blue* se observan claramente tres poblaciones bien definidas que pueden pertenecer a tres niveles de ploidía, la primera población pertenecería a núcleos de células diploides (2C), la segunda población a núcleos de las células que han duplicado su genoma y por lo tanto son tetraploides (4C) y la tercera población más pequeña, pertenece a células que han tenido ciclos de endoreplicación y por lo tanto son células octaploides (8C). En cambio, en la muestra de los núcleos teñidos de *A. thaliana* se pueden observar varias poblaciones de núcleos que tienen distintos niveles de ploidía, por lo cual no puede ser utilizado como estándar para saber los niveles de ploidía de *E. caribbean blue*.

## 7.9.- Protocolo de androgénesis para *E. caribbean blue* obtenido en este trabajo.

### Materiales

#### Soluciones:

- Solución de esterilización 1: Hy-clean al 10%.
- Solución de esterilización 2: Carbendazim al 2% de la marca comercial Prozycar 50%.
- Solución de esterilización 3: hipoclorito de sodio (NaClO) de la marca comercial "Cloralex" al 20%, Tween-20 al 0.1%
- Etanol al 70 %.
- Etanol al 70 %. (Ver nota 1)
- Solución de extracción de núcleos: Tris-HCl 200 mM, EDTA Na<sub>2</sub>.2H<sub>2</sub>O 2.5 mM, MgCl<sub>2</sub>.6H<sub>2</sub>O 4 mM, metabisulfito de sodio 10 mM, NaCl 86 mM Triton X-100 1.5% (v/v), polivinilpirrolidona 2% (p/v) pH 7.5, el pH se ajustó usando HCl 1 N. (Ver nota 1)
- Solución control de tinción de núcleos : PBS 100 mM, EDTA 10 mM y Triton X-100 0.1% pH 7.0. (Ver nota 1)
- Solución de tinción de núcleos : PBS 100 mM, EDTA 10 mM y Triton X-100 0.1%, DAPI de 2 µg/mL pH 7.0. (Ver nota 1)
- PBS 300 mM pH 7.0 (Ver nota 1)

**Nota 1:** Las soluciones que se usaran para citometría de flujo se filtran por una membrana de 25 µm.

#### Medios:

- Medio de inducción a la embriogénesis: MS 1 X (Sigma Aldrich) suplementado con sacarosa 30 g/L, mio-inositol 0.1 g/L, y agar 7 g/L, pH 5.8 en combinación con cualquiera de las distintas concentraciones de

hormonas vegetales que se muestran en la tabla 4. Esterilizar el medio por autoclave durante 30 min. (Ver nota 2)

Echeveria caribbean blue		
Medio	2,4-D (mg/L)	6-BAP (mg/L)
MI-1	0.5	1
MI-2	1	1

**Tabla 4.** La tabla indica las distintas concentraciones de hormonas vegetales de los medios de cultivo para la inducción de callos a partir de anteras de *E. caribbean blue*

**Nota 2:** Las hormonas vegetales y el mio-inositol se agregan cuando el medio este tibio, estas soluciones se esterilizan por medio de filtración.

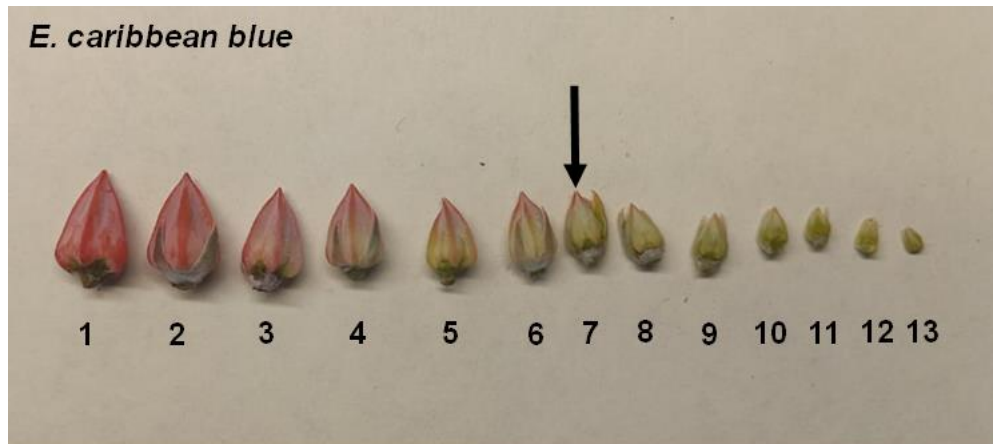
#### **Equipo:**

- Campana de flujo laminar
- Agitador orbital
- Lupa
- Microscopios óptico y de fluorescencia
- Incubadora
- Cámaras de crecimiento
- Citómetro de flujo

#### **Metodología**

##### **Elección de los capullos florales de *E. caribbean blue***

1. Colectar las inflorescencias de las plantas parentales de *E. caribbean blue*, para seleccionar las inflorescencias adecuadas el primer cfE debe tener una tonalidad completamente rosa como se muestra en la (Figura 7-B).



**Figura 7-B. Clasificación de los cfE.** Clasificación del cfE de acuerdo con su estado de desarrollo, la flecha señala el tamaño adecuado de cfE.

2. Seleccionar los capullos que midan aproximadamente entre 3.2 y 4.5 mm.  
(Nota 3)
3. Colocar los capullos seleccionados en agua de para evitar deshidratación.

**Nota 3:** Si la inflorescencia se selecciona de una buena manera el capullo floral deberá medir aproximadamente 3.8 mm que pertenece al lugar número 7 de la inflorescencia.

#### **Esterilización superficial de los capullos florales de *E. caribbean blue***

1. Colocar los cfE en un frasco con tapa, cubrir con la solución de esterilización 1 y colocar en un agitador orbital durante 10 min a 150 rpm. Posteriormente realizar 2 lavados con H<sub>2</sub>O de cada uno de 10 min a 150 rpm.
2. Sumergir los cfE en la solución de esterilización 2 durante 30 min a 150 rpm. Realizar 2 lavados más con H<sub>2</sub>O de cada uno de 10 min a 150 rpm para eliminar restos del fungicida.
3. Transferir los cfE a etanol al 70 % durante 1min, y agitar el frasco suavemente con la mano.
4. Colocar los cfE en una solución de esterilización 3 durante 30 min a 150 rpm. Posteriormente, se realizan 3 lavados con H<sub>2</sub>O de, cada uno de 10 min a 150 rpm.

5. Los cfE se colocan sobre un papel filtro estéril para secar el exceso de líquido.

**Nota 4:** Todo esto se realizó en una campana de flujo laminar para mantener un ambiente estéril.

### **Inducción a la embriogénesis**

1. Extirpar las anteras con ayuda de unas pinzas de disección y una lupa para intentar dañar lo menos posible la estructura. (ver nota 5)
2. Colocar las anteras sobre medio de inducción en cajas Petri, y sellar con parafilm para evitar la pérdida de humedad.
3. Incubar las anteras en oscuridad a 27°C durante cinco días y luego transferir a 25 °C y seguir incubando en oscuridad.
4. Monitorear el desarrollo de callos cada semana. (ver nota6)

**Nota 5:** Al momento de extirpar las anteras solo seleccionar las anteras grandes de cfE, que son estas las que contienen tétradas en su interior.

**Nota 6:** La formación de callo se observa luego de la primera semana de iniciar el cultivo de las anteras, 3 o 4 días después de colocar a 25 °C.

### **Determinación de los niveles de ploidia de *E. caribbean blue* mediante citometría de flujo**

1. Colectar hojas de *E. caribbean blue*.
2. Lavar las hojas y pesar dos muestras de 150 mg de tejido cada una.
3. Fijar el tejido durante 4 horas en etanol al 70 %.
4. Transferir el tejido a la solución de extracción de núcleos y triturar con una navaja de afeitar, incubar a 4°C durante 5 min.
5. Filtrar la mezcla por una membrana con un poro de 40 µm, y centrifugar durante 5 min a 1700 rpm.
6. Descartar el sobrenadante, colocar 200 µL de la solución control de tinción de núcleos a una de las muestras y a la otra agregar 200 µL de la solución de tinción de núcleos.
7. Ambas muestras se incuban durante 15 min en oscuridad a 4°C.

8. Concentrar los núcleos por centrifugación de las muestras, descartar el sobrenadante y lavar el precipitado con 200  $\mu$ L de PBS 300 mM pH 7.0 dejar durante 5 min a 4 °C.
9. Concentrar los núcleos por centrifugación nuevamente y descartar el PBS, finalmente re-suspender en 300  $\mu$ L de PBS 300 mM pH 7.0.
10. Analizar las muestras en un citómetro de flujo.

# 8.- Discusión de Resultados

## 8.1.- Permeabilización del grano de polen

El grano de polen es el gameto sexual masculino de las plantas, el desarrollo de este comprende dos procesos la microsporogénesis y la micro gametogénesis, esta última descrita anteriormente (1). Para desarrollar plantas haploides es necesario identificar el desarrollo del grano de polen durante la micro gametogénesis, por lo cual se tiñen los núcleos de los granos durante su desarrollo y así relacionar el tamaño con el estadio de desarrollo del polen. Aunque, se utilizaron distintos protocolos, soluciones de fijación y tinción citadas en la bibliografía, no fue posible internalizar el DAPI en ambas especies en los estadios de desarrollo posteriores a la formación de tétradas (Figura 9) panel 1 y 2.

La anatomía del grano de polen maduro impide la internalización de DAPI, el grano de polen está compuesto por dos complejas paredes celulares: la pared interna está formada por intina que es una mezcla principalmente de calosa, celulosa y arabinanos, en el momento de la germinación del grano de polen esta pared se extiende por uno de los poros del grano y forma el tubo polínico. La segunda pared se compone de exina y se caracteriza por una alta resistencia que le permite conservar su estructura durante miles de años, la exina se compone de esporopolenina que es un polímero fenólico, a diferencia de la pared interna esta presenta poros por los cuales germinará el tubo polínico del grano, el número de poros es diferente para cada especie de planta (Figura 20) (3).



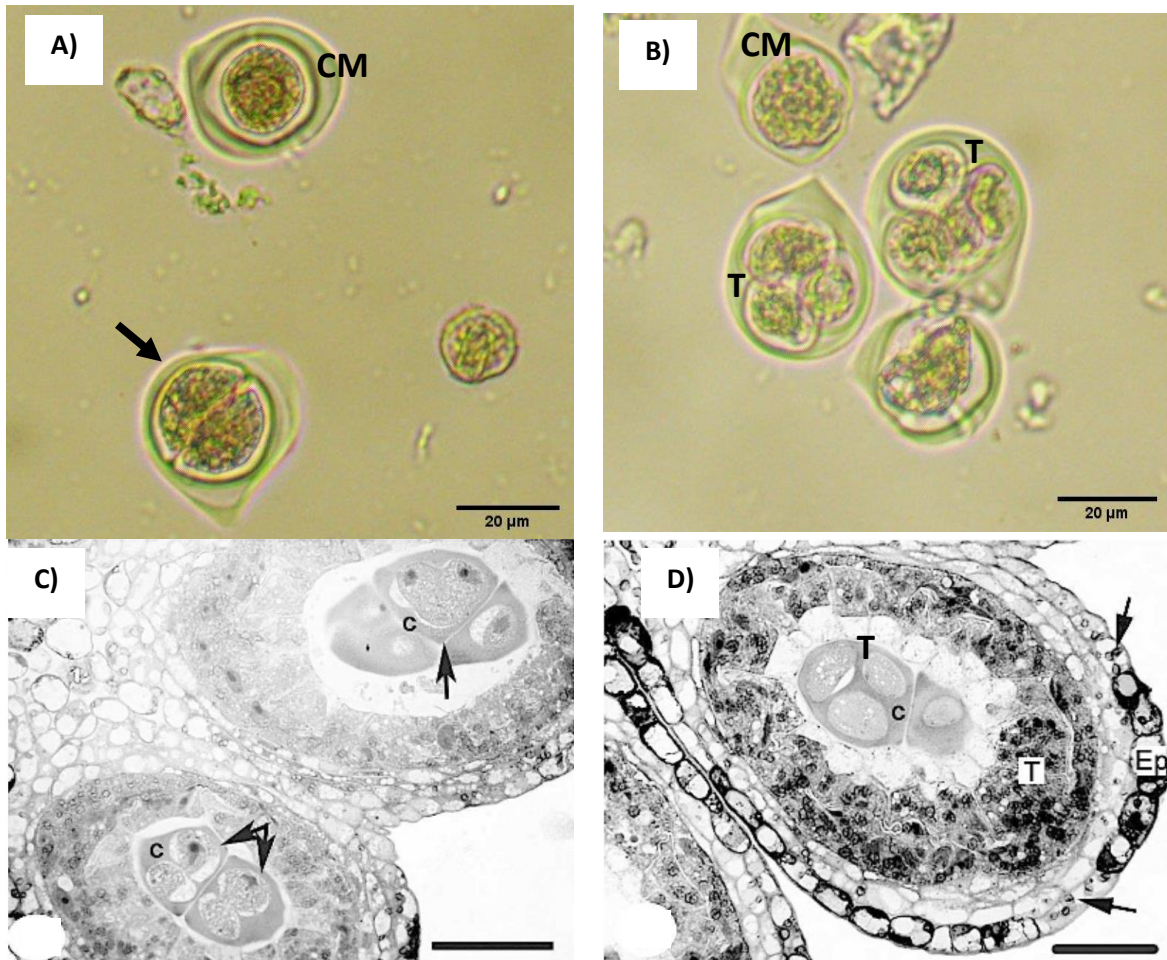
**Figura 20. Estructura del grano de polen.** Tomado de plantaeAGRO, Fuente: <https://plantae.garden/>

Mientras que en las tétradas el problema para internalizar el DAPI puede deberse a la forma en que se deposita la pared de calosa. Una vez que las células esporogéneas dan lugar a las células madre, a su alrededor se empieza a depositar una pared de calosa (56), que encapsulará a las cuatro células hijas que posteriormente darán origen a las estructuras conocidas como tétradas. La citocinesis es simultánea a la meiosis y durante este proceso también se comienza a depositar calosa sobre el plano medio y los bordes de las células haploides (57), encapsulando a la membrana evitando permear compuestos dentro de la célula, por lo cual se impide la internalización del DAPI en las tétradas.



## 8.2.- Desarrollo del gameto e identificación de tétradas de *Euphorbia* y *Echeveria*

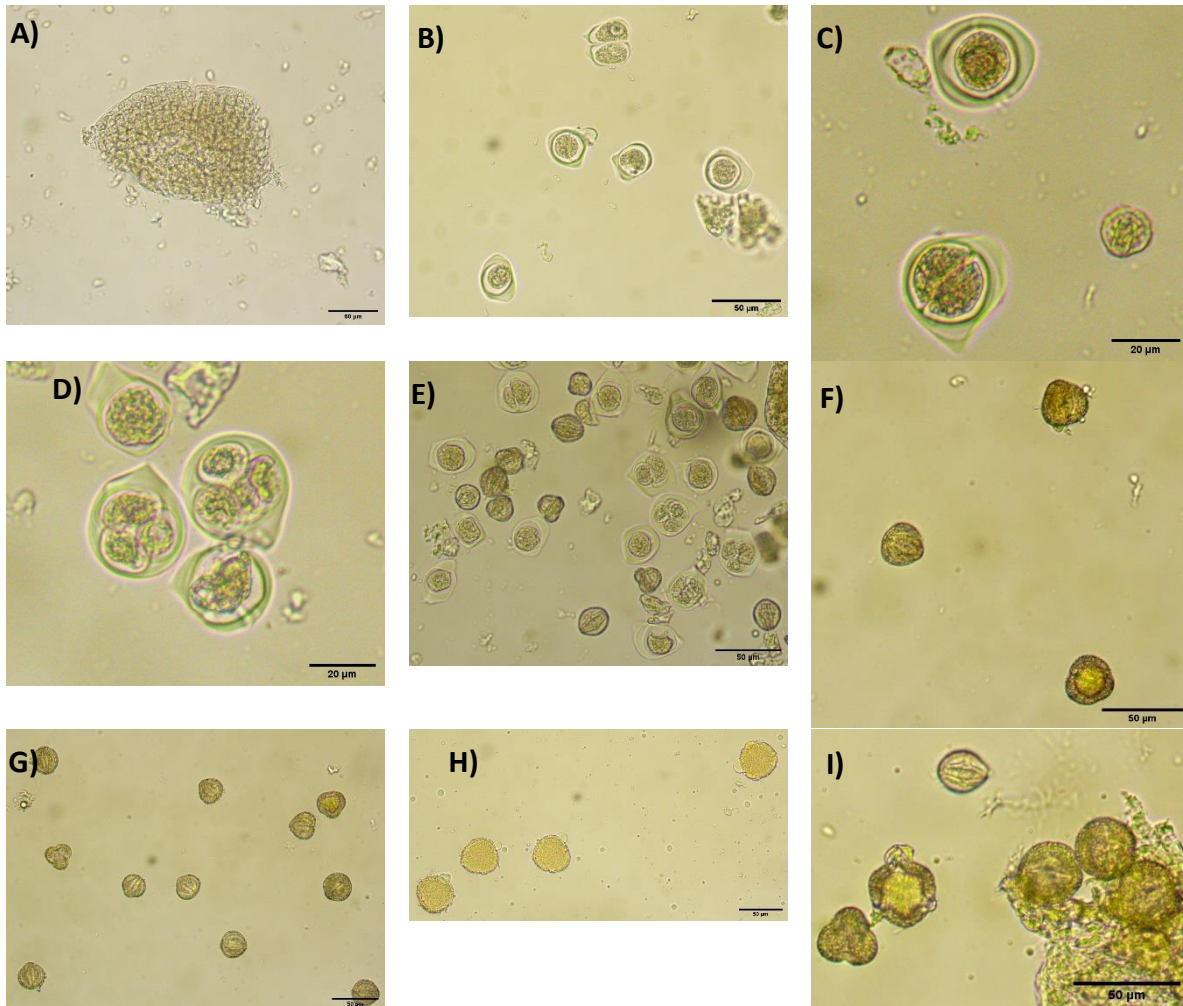
Puesto que no se lograron teñir los núcleos de los granos de polen de *E. pulcherrima* y *Echeveria*, se buscó otro método para identificar células que posiblemente fueran haploides. Huanfang y colaboradores monitorearon el desarrollo del grano de polen en una especie mexicana también perteneciente al género *Euphorbia*, esta especie fue *Jatropha curcas* L. en el cual se encontraron imágenes de micrografías del desarrollo de polen en esta especie (Figura 21-C y D) (56), al comparar las imágenes de Huanfang con las que obtuvimos nosotros (Figura 21-A y B) nos permitió de manera física y sin ayuda de tinciones identificar las tétradas de *E. pulcherrima*. Además, en el trabajo de Matamoro y coautores, describen los diferentes arreglos que pueden tener las de tétradas en las especies de *Euphorbia* (57), concluyendo que en este género la anatomía de estas estructuras se encuentra muy conservada.



**Figura 21. Identificación de las tétradas de *E. pulcherrima*.** **A)** Células madre del polen de *E. pulcherrima*. **B)** identificación de tétradas de *E. pulcherrima*. **C)** células madre del polen de *Jatropha curcas* en proceso de meiosis (56). **D)** Tétradas de *Jatropha curcas* rodeadas por calosa (56). C y D barra de escala igual a 30µm. CM= células madre del polen, T= tétradas, C= calosa, las flechas señalan células en proceso de meiosis.

Durante este proyecto se observó el desarrollo del grano de polen en *E. pulcherrima* (Figura 22). Primero se observó a la antera como una masa de células en un estadio temprano de esta estructura (Figura 22-A), posteriormente se visualizó la primera meiosis de las células madre del polen (microesporogenesis)

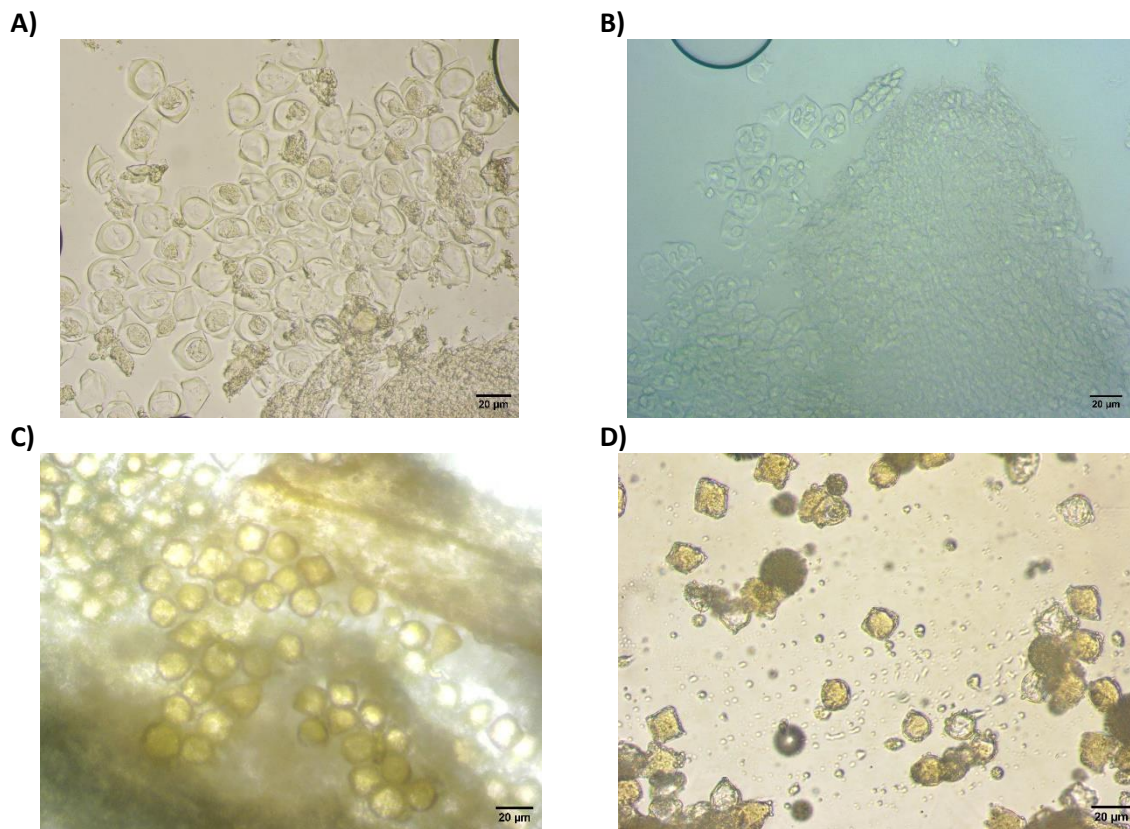
(Figura 22-B y C), también se identificó la estructura de tétradas de esta especie, las cuales se describen por primera vez (Figura 22-D), en esta imagen se puede observar el arreglo de las cuatro células rodeadas por una sola pared de calosa. Finalmente, se muestran las distintas morfologías por las que pasa el grano de polen hasta llegar a la madurez (Figura 22- F-I).



**Figura 22. Desarrollo del grano de polen de *E. pulcherrima*. A)** Antera inmadura de *E. pulcherrima*. **B)** células madre del polen de *E. pulcherrima*. **C)** Células madre del polen en proceso de meiosis. **D)** Tétradas. **E)** granos de polen de un mismo ciato en diferentes estadios del desarrollo. **F)** y **G)** Fenotipos del desarrollo del grano del polen. **H)** Granos de polen maduro. **I)** Germinación de un grano de polen.



Para *Echeveria* no se han realizado estudios sobre el desarrollo del grano de polen, por lo cual este trabajo es el primero en su tipo. Para la especie *E. caribbean blue* se observaron las células madre del polen (Figuras 23-A), en *E. caribbean blue* se observó la estructura de tétradas rodeadas por una sola pared de calosa (Figura 23- B). Finalmente, se observó la morfología de los granos inmaduros y maduros de polen (Figura 23-C y D), cabe mencionar que la morfología de los granos de polen maduros de algunas especies de *Echeveria* ya han sido descritos.



**Figura 23. Desarrollo del grano de polen de *E. caribbean blue*. A) Células madre del polen. B) Tétradas. C) Granos de polen inmaduros. D) Granos de polen maduros.**

### **8.3.- Variabilidad en la formación de callos en medios de inducción a la embriogénesis**

La obtención de plantas haploides suele tener una baja tasa de eficiencia debido a múltiples factores que influyen en el proceso de androgénesis, como el genotipo de las plantas parentales, el estadio de desarrollo del polen, la salud y las condiciones de crecimiento del parental, los tratamientos de estrés a los que se someten los cfE, de los factores anteriores el genotipo de los parentales es uno de los factores más importantes que influyen la inducción de embriones y callos (58).

La gran variabilidad que se obtuvo en la formación de callos de *E. caribbean blue* a partir de anteras es posible a la forma del cultivo de los parentales, ya que las varas florales se tomaron de plantas con edades, tamaños y estados de desarrollo de la vara floral diferentes, además de que por la posición en la que se encuentran las plantas podrían estar expuestas a variaciones de luz.

Concluyendo que para obtener resultados más homogéneos sería necesario el cultivo de los parentales a partir de una sola planta (clones) mediante la reproducción asexual de *Echeveria*, además, las plantas deben ser cultivadas en una cámara de crecimiento que permita tener controlado el ambiente la mayor parte del tiempo del cultivo.

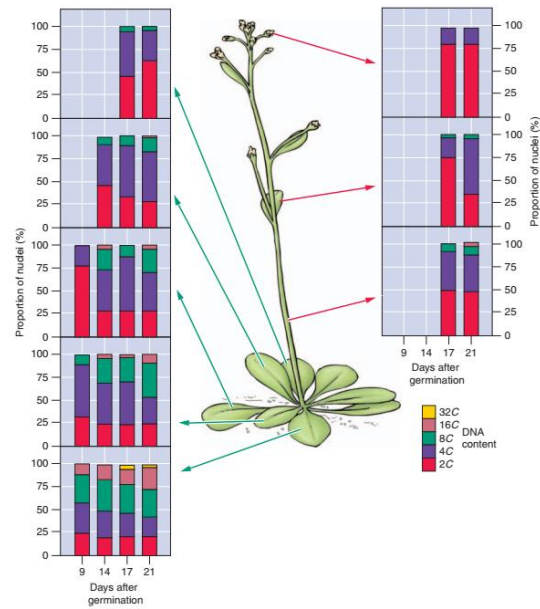
### **8.4.- Endo ploidía en el género *Echeveria***

La Endoreplicación es un proceso en el cual el ADN se puede duplicar varias veces en una célula sin que haya división celular, este proceso se ha reportado en varios organismos como artrópodos, animales y plantas. En *A. thaliana* se ha reportado que se lleva a cabo en cualquier tipo de tejido (Figura 24-A), mientras que en el maíz es tejido específico llevándose a cabo en el endospermo (3). Como ya se mencionó anteriormente, para el estándar se utilizó tejido de hojas de

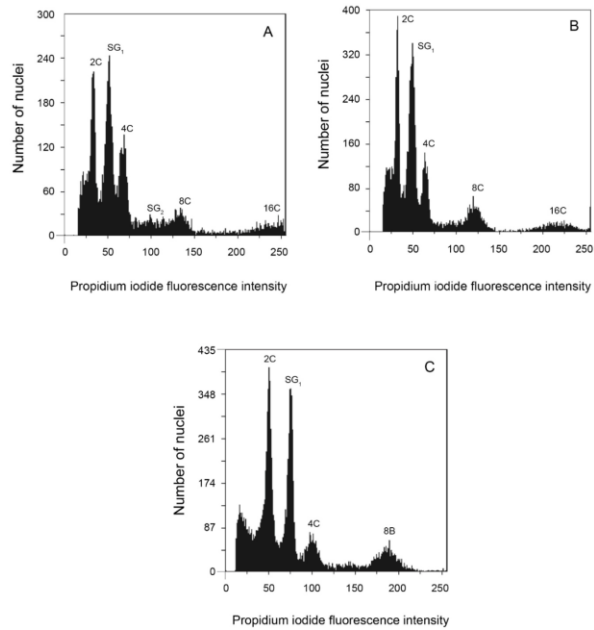
*Arabidopsis thaliana* y en la (Figura18) se observa que la muestra da diferentes picos que pertenecen a distintos niveles de ploidia, por lo que se recomienda seguir utilizando el mismo estándar, pero extrayendo núcleos de las puntas de las raíces ya que es una zona donde las células están en constante división celular.

En los resultados de la citometría en la (Figura 19) se puede observar cómo *E. caribbean blue* presenta células con endo replicación, lo cual es muy común en plantas superiores, este proceso ya ha sido reportado por Palomino *et al.* 2021 en donde se cuantificaron los niveles de ploidia de 25 especies de *Echeveria*, obteniendo que 23 de las 25 especies presentaban algún tipo de Endo ploidía (Figura 24-B), por lo que se infiere que la endo replicación es un proceso muy común en este género y se reporta en este trabajo que la especie *E. caribbean blue* también presenta procesos de endo replicación.

A)



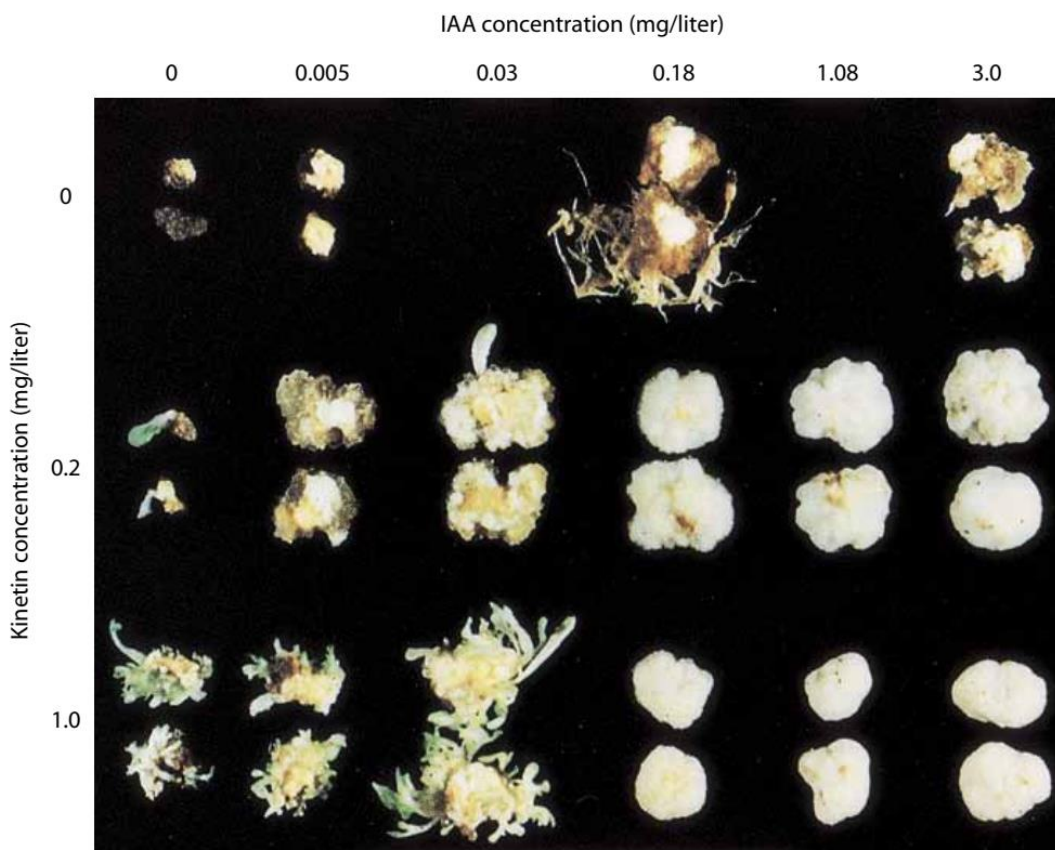
B)



**Figura 24. Endo poliploidía en Plantas. A)** Diferentes niveles de ploidia en los tejidos de *Arabidopsis thaliana*. Tomado de (3). **B)** Endo replicación en tres especies de *Echeveria*, **B-A)** *Echeveria juarezensis*, **B-B)** *Echeveria altamirae* y **B-C)** *Echeveria novogaliciana*, tomado de (52).

### 8.5.- El papel de la concentración de auxinas y citocininas en la diferenciación de los callos de *E. caribbean blue*

Las hormonas vegetales tienen un papel muy importante en la inducción de la embriogénesis y la diferenciación de los callos, las dos hormonas más utilizadas son las auxinas y las citocininas. Las características observadas en los callos cultivados en los medios de diferenciación, se debe a la concentración más alta de las hormonas utilizadas (Figura 25). En el medio MD-3 la mayor concentración corresponde a 6-BAP que es una citocinina, por lo cual los callos empezaron a diferenciarse en estructuras de brotes, mientras que para los callos que se cultivaron en el medio MD-4 la concentración más alta es la de la auxina por lo que los callos empezaron a desarrollar estructuras de pelos como en las raíces, concluyendo que el aumento de tamaño se debe a que las auxinas promueven la división celular.





**Figura 25. Efecto de las diferentes concentraciones de auxinas y citocininas en la diferenciación de callos de tabaco (*Nicotiana tabacum*).** En la imagen podemos observar que sin la adición de PGRs el crecimiento de los callos es muy poco, mientras que concentraciones mayores de auxinas promueve la formación de estructuras de la raíz, y el uso de concentraciones altas de citocininas promueven la formación de estructuras de brotes, el uso de concentraciones equimolares provocan la formación de callos. Tomado de Evert RF (1)

## 9.- Conclusiones

Es necesario desarrollar nuevas técnicas que permitan la internalización del DAPI a la célula, para poder seguir el proceso de micro gametogénesis en las especies del género *Echeveria* y la especie *E. pulcherrima*.

El tamaño promedio de los cfE para encontrar anteras con tétradas es de 4.5 mm para *E. caamani*, 3.8 mm para *E. caribbean blue*, 3.6 mm para *E. compressicaulis* y de 2.5 mm para *E. diffractens*. Para las variedades de *E. pulcherrima* utilizadas el tamaño promedio de los cEp. que contienen anteras con tétradas en su interior son los sig: 2.93 mm para *E. pulcherrima Beatriz*, 3.04 mm para *E. pulcherrima Festival*, 3.10 mm para *E. pulcherrima Juanita y Victoria*, 3.12 mm para *E. pulcherrima Leticia*, 3.68 mm para *E. pulcherrima One Red* y 3.26 mm para *E. pulcherrima Ximena*.

El tamaño de las tétradas en las especies de *Echeveria* que se utilizaron se encuentran entre los 30 y 36.1  $\mu\text{m}$ , mientras que para *E. pulcherrima* se encuentran entre los 28.7 y 32.5  $\mu\text{m}$ , ambos reportados por primera vez.

La solución de manitol 0.4 M y agarosa al 0.01 % es la mejor para la extracción de tétradas de *E. caribbean blue*, debido a que mantiene la viabilidad de las tétradas y tiene un mayor rendimiento comparada con otras concentraciones de agarosa.

Las anteras de *E. caribbean blue* desarrollan callos en todos los medios de inducción a la embriogénesis que se propusieron en este trabajo, sobresaliendo los medios M-1 y M-2 con un mayor número de callos inducidos.

Las concentraciones óptimas de la hormona auxina 2,4-D es de 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$  y 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; para la concentración óptima de la hormona citocinina 6-BAP es de 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$  para la inducción a la formación de callos a partir de anteras de *E. caribbean blue*.

La solución de extracción de núcleos de Mishra et al. 2017, es la óptima para extraer núcleos de las hojas de *E. caribbean blue* para citometría de flujo ya que evita la aglomeración de los núcleos de *E. caribbean blue*.

La especie *E. caribbean blue* presenta ciclos de endoreduplicación, al igual que las otras 23 especies del género *Echeveria* reportadas anteriormente.

La auxina NAA a una concentración de 0.1 mg/L combinada con la citocinina 6-BAP 1 mg/L muestran hasta el momento ser la mejor combinación para la organogénesis de los callos de *E. caribbean blue*.

## 10.- Bibliografía.

1. Evert RF, Eichhorn SE. Raven Biology of plants [Internet]. 8th ed. W.H Freeman and Company; 2013 [cited 2019 Mar 27]. 864 p. Available from: <https://latam.casadellibro.com/libro-raven-biology-of-plants-8th-ed/9781429219617/2194782>
2. Wessinger CA, Hileman LC. Parallelism in Flower Evolution and Development. *Annu Rev Ecol Evol Syst* [Internet]. 2020 [cited 2023 Nov 1];51:387–408. Available from: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-ecolsys-011720-124511>
3. Russell Jones, Helen Ougham, Waaland Howard, Thomas and Susan. The molecular life of plants [Internet]. first. Wiley-Blackwell of John Wiley & Sons Ltd, editor. Vol. 1. United Kingdom: 2013; 2013 [cited 2023 Nov 1]. 1–768 p. Available from: <https://bcs.wiley.com/he-bcs/Books?action=index&bcsId=7583&itemId=0470870117>
4. Campbell NA, Urry Lisa, Reece JB. Biología [Internet]. Médica Panamericana; 2007 [cited 2019 Mar 5]. Available from: <https://books.google.com.mx/books/about/Biolog%C3%ADa.html?id=QcU0yde9PtkC>
5. Francisco Alda. 1. 2011 [cited 2022 Jun 14]. B.log.ia 2.0: La flor. Available from: <http://b-log-ia20.blogspot.com/2011/01/la-flor.html>
6. Diamond J. Evolution, consequences and future of plant and animal domestication. *Nature* [Internet]. 2002 Aug 8 [cited 2023 Nov 2];418(August):700–7. Available from: <https://www.nature.com/articles/nature01019>
7. Culturas antiguas, religiones, creencias e ideologías han utilizado la rosa como emblema [Internet]. [cited 2021 Nov 29]. Available from: <https://www.lavanguardia.com/libros/20100423/53913545357/culturas-antiguas-religiones-creencias-e-ideologias-han-utilizado-la-rosa-como-emblema.html>
8. Ana María L. Velasco Lozano, Debra Nagao. Arqueología Mexicana: Las flores en el México prehispánico. 2006 [cited 2021 Nov 29]. p. 28–35 Mitología y simbolismo de las flores | Arqueología Mexicana. Available from: <https://arqueologiamexicana.mx/mexico-antiguo/mitologia-y-simbolismo-de-las-flores>
9. Burger P, Plainfossé H, Brochet X, Chemat F, Fernandez X. Extraction of Natural Fragrance Ingredients: History Overview and Future Trends. Vol. 16, Chemistry and Biodiversity. Wiley-VCH Verlag; 2019.
10. Ramírez Hernández JJ, Avitia Rodríguez JA. Floricultura Mexicana en el Siglo XXI: Su Desempeño en los Mercados Internacionales. *Revista de Economía, Facultad de Economía, Universidad Autónoma de Yucatán*. 2017;34(88):99–122.

11. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Floricultura, cultivando belleza y ganancias. 2018 [cited 2021 Nov 29]. Floricultura, cultivando belleza y ganancias | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/es/articulos/floricultura-cultivando-belleza-y-ganancias>
12. Sartorius O, Barreto Ríos Y, Téllez, Trejo L, Huerta Vaquera H. Caracterización de la producción y comercialización de flor de corte en Texcoco, México. *Rev Mex De Cienc Agric.* 2015;(ISSN 2007-0934):5–14.
13. Trejo-Hernández L, Olson-Zúñica ME, Bye-Boettler RA. Datos históricos y diversidad genética de las nochebuenas (*Euphorbia pulcherrima*) del Distrito Federal, México. *Rev Mex Biodivers.* 2015 Jun 1;86(2):478–85.
14. Islas Luna María de los Ángeles, Reyes Santiago Jerónimo, González Zorzano Omar. Guía práctica de propagación y cultivo de las especies del género *Echeveria* [Internet]. 1st ed. Vol. 1. México: Palabra en Vuelo S.A. de C.V.; 2011. Available from: [www.sagarpa.gob.mx/snics](http://www.sagarpa.gob.mx/snics)
15. Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas. Generalidades del género *Echeveria*. 2017 [cited 2022 Jun 14]. *Echeveria (Echeveria spp)\** | Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas | Gobierno | gob.mx. Available from: <https://www.gob.mx/snics/acciones-y-programas/echeveria-crassulacea>
16. Jimeno Sevilla Héctor David, Pérez Calix Emmanuel, Narave Flores Héctor V. *Echeveria (Crassulaceae): Potencial para la mejora genética como ornamental.* *Av Investig Agropecu.* 2022 Feb 26;25(3):57–81.
17. Jimeno Sevilla Héctor David, Pérez Calix Emmanuel. Universidad Veracruzana Facultad de Biología "El género *Echeveria (CRASSULACEAE)* en. [Xalapa,Veracruz ]: Universidad Veracruzana; 2008.
18. *Echeveria Imbricata - Suculentas -* [Internet]. [cited 2022 Jun 15]. Available from: <https://todoparatuhuerta.com/suculentas/echeveria-imbricata/>
19. Perera Dinum, W. Trader Brian. *Poinsettia ‘Prestige™ Red’ (Euphorbia pulcherrima) In Vitro Propagation.* *HortScience* [Internet]. 2010 Jul [cited 2023 Nov 2];45(7):1126–8. Available from: <https://journals.ashs.org/hortsci/view/journals/hortsci/45/7/article-p1126.xml>
20. Rangel-estrada SE, Canul-ku J, Osuna-canizalez FDJ, García-perez F, Rosario- P. nochebuena vía organogénesis \* In vitro regeneration of poinsettia hybrids via organogenesis Resumen Introducción. 2015;6:1571–85.
21. Cortes Vivar Rodrigo Ariel, Bañuelos Herrera Leobardo. El Cultivo De Nochebuena (*Euphorbia Pulcherrima Willd.*) Una Alternativa De Produccion En El Valle Del Ocotito, Estado De Guerrero, Mexico [Internet]. [Guerrero]: Universidad Autonoma Agraria “Antonio Narro”; 2007 [cited 2023 Nov 2]. Available from: <https://biblioteca.uaaan.mx/cgi-bin/koha/opac-detail.pl?biblionumber=59995>

22. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. ¿Conoces la diferencia entre especie y variedad vegetal? 2022 [cited 2023 Oct 22]. ¿Conoces la diferencia entre especie y variedad vegetal? | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/conoces-la-diferencia-entre-especie-y-variedad-vegetal>
23. Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural. Variedades vegetales, camino a una mejor y mayor producción. 2020 [cited 2023 Oct 22]. Variedades vegetales, camino a una mejor y mayor producción | Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural | Gobierno | gob.mx. Available from: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/variedades-vegetales-camino-a-una-mejor-y-mayor-produccion?idiom=es>
24. Rodríguez-Rojas Teresa J., Andrade-Rodríguez María, Canul-Ku Jaime, Castillo-Gutiérrez Antonio, Martínez-Fernández Edgar, Guillén-Sánchez Dagoberto. Viabilidad de polen, receptividad del estigma y tipo de polinización en cinco especies Echeveria en condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* . 2015 Jan 1;6:111–23.
25. Alberts Bruce, Bray Dennis, Hopkin Karen, Johnson Alexander, Lewis Julian, Raff Martin, et al. *ESSENTIAL CELL BIOLOGY*. 3rd ed. Morales Michael, editor. Vol. 1. New York and London: Garland Science; 2010. 1–868 p.
26. Canul Ku Jaime, García Pérez Faustino, Osuna Canizalez Felipe de Jesús, Ramírez Rojas Sergio. *Metodologías de mejoramiento genético aplicables en nochebuena*. 1st ed. Vol. 1. México: INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES FORESTALES, AGRÍCOLAS Y PECUARIAS; 2012. 1–52 p.
27. Hale B, Ferrie AMR, Chellamma S, Samuel JP, Phillips GC. Androgenesis-Based Doubled Haploidy: Past, Present, and Future Perspectives. Vol. 12, *Frontiers in Plant Science*. Frontiers Media S.A.; 2022.
28. Bárány Ivett. Reprogramación de polen y obtención de plantas doble-haploides en capsicum AnnunL [Internet]. [Madrid España]: Universidad Complutense de Madrid; 2008 [cited 2023 Nov 2]. Available from: <https://digital.csic.es/handle/10261/33769>
29. Karjee S, Mahapatra S, Singh D, Saha K. Production of double haploids in ornamental crops. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2020 May 14;9(4):555–65.
30. Germanà MA. Anther culture for haploid and doubled haploid production. Vol. 104, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. Kluwer Academic Publishers; 2011. p. 283–300.
31. Niazian M, Shariatpanahi ME. In vitro-based doubled haploid production: recent improvements. *Euphytica*. 2020 Apr 11;216(5).
32. Germanà Maria Antonietta, Lambardi Maurizio. *In Vitro Embryogenesis in Higher Plants*. Germanà Maria Antonietta, Lambardi Maurizio, editors. Vol. 1. New York: Humana Press; 2016. 1–559 p.

33. Taiz Lincoln, Zeiger Eduardo. Plant Physiology. 3rd ed. Vols. 1 and 2, Annals of Botany. Sinauer Associates; 2002. 1–675 p.
34. Sede Ana Rocío. Estudio de las extensinas específicas de polen (LRXs) involucradas en el crecimiento polarizado de tubos polínicos en *Arabidopsis thaliana*. [Buenos Aires, Argentina]: Universidad de Buenos Aires; 2019.
35. Takatsuka H, Umeda M. Hormonal control of cell division and elongation along differentiation trajectories in roots. *J Exp Bot.* 2014 Jan 28;65(March):2633–43.
36. Mishra R, Rao GJN, Rao RN, Kaushal P. Development and Characterization of Elite Doubled Haploid Lines from Two Indica Rice Hybrids. *Rice Sci.* 2015 Nov 1;22(6):290–9.
37. Echávarri B, Cistué L. Enhancement in androgenesis efficiency in barley (*Hordeum vulgare* L.) and bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by the addition of dimethyl sulfoxide to the mannitol pretreatment medium. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 2016 Apr 1;125(1):11–22.
38. Seldimirova O.A., Zaytsev D.Yu., Galin I.R., Kruglova N.N.4. PHYTOHORMONAL REGULATION OF IN VITRO FORMATION OF WHEAT ANDROGENIC STRUCTURES. *PHYSIOLOGY Series.* 2016;1(7):1–6.
39. Abdollahi MR, Najafi S, Sarikhani H, Moosavi SS. Induction and development of anther-derived gametic embryos in cucumber (*Cucumis sativus* L.) by optimizing the macronutrient and agar concentrations in culture medium. *Turkish Journal of Biology.* 2016;40(3):571–9.
40. Hegde V, Partap PS, Yadav RC, Baswana KS. In vitro Androgenesis in Capsicum (*Capsicum annum* L.). *Int J Curr Microbiol Appl Sci.* 2017 May 20;6(5):925–33.
41. Germanà MA, Chiancone B. Improvement of Citrus clementina Hort. ex Tan. microspore-derived embryoid induction and regeneration. *Plant Cell Rep.* 2003 Oct;22(3):181–7.
42. Chong-Pérez B, Carrasco B, Silva H, Herrera F, Quiroz K, Garcia-Gonzales R. Regeneration of highland papaya (*Vasconcellea pubescens*) from anther culture. *Appl Plant Sci.* 2018 Sep 1;6(9).
43. Saji K V, Sujatha & M. Embryogenesis and plant regeneration in anther culture of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Euphytica.* 1998 Feb 11;103:1–7.
44. Jia Y, Zhang QX, Pan HT, Wang SQ, Liu QL, Sun LX. Callus induction and haploid plant regeneration from baby primrose (*Primula forbesii* Franch.) anther culture. *Sci Hortic.* 2014 Sep 11;176:273–81.
45. Shrivastava V, Savarimuthu A, Patil M, Sarkar P, Hadole S. Gametic embryogenesis and callogenesis in Isolated microspore culture of *Jatropha curcas* L. a recalcitrant bioenergy crop. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* [Internet]. 2020;(0123456789). Available from: <https://doi.org/10.1007/s11240-020-01959-3>

46. Vergne P., Delvalleeand ., Duma C. Rapid Assessment Of Microspore And Pollen Development Stage In Wheat And Maize Using Dapi And Membrane Permeabilization. *Stain Technol.* 1987;62(5).
47. Zhang X, Wu Q, Li X, Zheng S, Wang S. *Scientia Horticulturae* Haploid plant production in *Zantedeschia aethiopica* ' Hong Gan ' using anther culture. *Sci Hortic* [Internet]. 2011;129(2):335–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2011.03.045>
48. Khandakar RK, Yu J, Min S kyung, Won M kyoung, Choi HG, Park H seung, et al. Regeneration of Haploid Plantlet through Anther Culture of *Chrysanthemum* ( *Dendranthema grandiflorum* ). 2014;42(2):482–7.
49. Otto F. DAPI Staining of Fixed Cells for High-Resolution Flow Cytometry of Nuclear DNA. *Methods Cell Biol.* 1990;33:105–10.
50. Tirichine L, Andrey P, Biot E, Maurin Y, Gaudin V. 3D fluorescent in situ hybridization using arabidopsis leaf cryosections and isolated nuclei. *Plant Methods.* 2009;5(1).
51. Mishra VK, Bajpai R, Chaturvedi R. An efficient and reproducible method for development of androgenic haploid plants from in vitro anther cultures of *Camellia assamica* ssp. *assamica* (Masters). *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant.* 2017 Jun 1;53(3):239–48.
52. Palomino G, Martínez-Ramón J, Cepeda-Cornejo V, Ladd-Otero M, Romero P, Reyes-Santiago J. Chromosome number, ploidy level, and nuclear dna content in 23 species of *echeveria* (*Crassulaceae*). *Genes (Basel).* 2021 Dec 1;12(12).
53. Dupl'Áková N, Dobrev PI, Renák D, Honys D. Rapid separation of *Arabidopsis* male gametophyte developmental stages using a Percoll gradient. *Nat Protoc.* 2016 Oct 1;11(10):1817–32.
54. Temsch EM, Koutecký P, Urfus T, Šmarda P, Doležel J. Reference standards for flow cytometric estimation of absolute nuclear DNA content in plants. Vol. 101, *Cytometry Part A.* John Wiley and Sons Inc; 2022. p. 710–24.
55. Pan I chun, Lu Y fen, Wen P jung, Chen Y ming. Using Colchicine to Create *Poinsettia* ( *Euphorbia pulcherrima* 3 *Euphorbia coranstra* ) Mutants with Various Morphological Traits. 2019;54(10):1667–72.
56. Liu HF, Kirchoff BK, Wu GJ, Liao JP. Microsporogenesis and male gametogenesis in *Jatropha curcas* L. (*Euphorbiaceae*). *Journal of the Torrey Botanical Society.* 2007 Jul;134(3):335–43.
57. Matamoro-Vidal A, Furness CA, Gouyon PH, Wurdack KJ, Albert B. Evolutionary stasis in *Euphorbiaceae* pollen: Selection and constraints. *J Evol Biol.* 2012 Jun;25(6):1077–96.



58. Dong YQ, Zhao WX, Li XH, Liu XC, Gao NN, Huang JH, et al. Androgenesis, gynogenesis, and parthenogenesis haploids in cucurbit species. Vol. 35, *Plant Cell Reports*. Springer Verlag; 2016. p. 1991–2019.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS



## INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS BÁSICAS Y APLICADAS

Posgrado en Ciencias



Cuernavaca, Mor., a 22 de noviembre de 2023.

**DRA. LINA ANDREA RIVILLAS ACEVEDO**  
**COORDINADORA DEL POSGRADO EN CIENCIAS**  
Presente

Atendiendo a la solicitud para emitir DICTAMEN sobre la revisión de la TESIS titulada: **“Establecimiento de la embriogénesis gamética de Euphorbia pulcherrima y Echeveria para la obtención de variedades vegetales por el método de dobles haploides”**, que presenta el alumno **Diego Armando Flores Bautista (10046078)** para obtener el título de **Maestro en Ciencias**.

Director de tesis: Dr. Nelson Avonce Vergara  
Unidad Académica: Instituto de Investigación en Ciencias Básicas y Aplicadas (IICBA)

Nos permitimos informarle que nuestro voto es:

NOMBRE	DICTAMEN	FIRMA
Dra. Verónica Lira Ruan CIDC – UAEM	NO APROBADO	
Dr. Iván Martínez Duncker Ramírez CIDC – UAEM	APROBADO	
Dr. Luis Cárdenas Torres IBT-UNAM	APROBADO	
Dra. Claudia Díaz Camino IBT-UNAM	APROBADO	
Dr. Nelson Avonce Vergara CIDC – UAEM	APROBADO	





UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL  
ESTADO DE MORELOS

Se expide el presente documento firmado electrónicamente de conformidad con el ACUERDO GENERAL PARA LA CONTINUIDAD DEL FUNCIONAMIENTO DE LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS DURANTE LA EMERGENCIA SANITARIA PROVOCADA POR EL VIRUS SARS-COV2 (COVID-19) emitido el 27 de abril del 2020.

El presente documento cuenta con la firma electrónica UAEM del funcionario universitario competente, amparada por un certificado vigente a la fecha de su elaboración y es válido de conformidad con los LINEAMIENTOS EN MATERIA DE FIRMA ELECTRÓNICA PARA LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ESTADO DE MORELOS emitidos el 13 de noviembre del 2019 mediante circular No. 32.

### Sello electrónico

**NELSON AVONCE VERGARA | Fecha:2023-11-22 11:31:20 | Firmante**

X0Hh+yhGfP8v/wNz6G3/713kiPhk+eaqzWWYjii/w15YDPrOCOj4OvNztXpkrJm/GZDigF6gJrBeHS7XdQlpe+cwP9mXv//AAoSj4w47zvjkNCJtuFO54fYGU4xYmxB4jtP6N0ZR15HYAtqPEjynX4fGd0qYnpYtpEFDU2MkVyy+/Gx2S+ivLHI1Tcnqp+OmzjPPoR4jll2wwnBW6aTlbeKicv/McWJtyusAGR7NU6QVt8NqEej67gJvx7YF7GdOVVKazVfVaZW0hvLLmrm6p3Sp5jcpBRc5amqdmJgG0t4muCGuG/lD8ZvlG5S2RKRgsIYwHq212+NG16GSo5nSyA==

**IVAN MARTINEZ DUNCKER RAMIREZ | Fecha:2023-11-22 11:44:29 | Firmante**

e5QEkm1C4N8wGA7oRaB78iDoH8/NmdRZuMoWvXn3PxlGCM5I7BIIAX/LWuYjsDzzZ/iUBtpGi9Zak3BEw7gXYBNMzJAKHknJfjMjEiusQLNfbbXPkbuc1Gn1hJaj21qKIFMv5hfbjdWKRXTXeK6yW5aKf7nswzVD2ffYGAMgMRuKPSH0LeQz5wRLKN/aAqeACiZdqAi5kCNBGun9XD8czy9UEu+xsKjvNNFRFpTCOJMHJcZlSpnV3zGsWQQTs9InwruY+KM4QWUZC+MNccvlgfKlL1vktulE5MrRDI+Ird2OcD8tV3j+Ojpd96Q2a/PBXIb5WJM/vWjwJNTUQk7g==

**VERONICA LIRA RUAN | Fecha:2023-11-22 12:26:57 | Firmante**

Yqu/xqUYo3WuA8LuDy1KlchqhfqtGVRj1o/UEovppzFaEfdYyJ7XwZV5JaebErshff3OMUX/kt1Nd3N10fN06D8wM5BPBUD1kv4sIYAxHyob3HKisszS16JaB9Z5p0VZQ2GsGiBW WXbcXaOpkqRvPcYMRheISsGzuqP102y4Wk0649kcaTXRIYob9mf8eHviUbuQWpfND2VhlnhewE/3vzFWXi2JKKE5A8aOLU5TDSV3jcurXgbYbnla9tocW6F4ZxJ+878iPLTcORs4MddKdxWr6x6zfnNakIEODOZgUpSWjLx17vFNb4+NCyWDCTfzSZB1wGCY2aBFk+F8Hjo2cQ==

**LUIS CÁRDENAS TORRES | Fecha:2023-11-22 12:41:10 | Firmante**

C6ozH0SBQyKwMxh6Bj/az0cSIum07leiSLapWtHwqLMS2qNNj5dUA+hy3goUBLbRvtPCU7x2uT2EiVg+qpy0SCR1TBgnk/ZQ+8zbPAZBQqQ8nxyPnHoRGH2UAdyn/QNLzecz7h39rJeD7q8mQW7CmAcCDywd5awutHLPR2yzjqLbM3/nWUPoDzkkco1lvOjVGI0JhrgvmQb3FIK+TEUC5Z0bbXln3vo0kXiBt333dWE8emwVSDbSDCxE6hDRpQLXsZ1cESk+BmxwyLjqtCuRoQRZRw2kBlgW0CV/5o7IMXCexRWZvdVGTl/sA761DyDSmtCwPUekHiZxX7ToCjQ==

**CLAUDIA DÍAZ CAMINO | Fecha:2023-11-22 14:31:43 | Firmante**

qKLaHwclTclXqniUWk0XoV3zWjflwXwv69t3VjWYv1lhFNdkgzwi6GvKj26/IpDk8jO/0hVnVkoB4LG1y7tC64Ch2X3O+7/kTNGkbMzk/mRd6Ufo5ltt2/Sv+0XBw/cyTVbG6Uf7WaKis+wWPSrsf9oPGWswkxNQ65R5FY8PCUyrXJnVAxosaOcYyR+QcMr0/JVBEhvMrg0zX/NV7qY3UYqs/Uw7MAxlabj0lsjFE4FuE7VguyvFgs/5F1KUFcxjD5er/MGPYkXqJWJzlpfzElrldvtPamrkKpNRiQlR/mm0ohfOFIMaiHBvPjwRoF3+why4aD6lul5ssxB4og==

Puede verificar la autenticidad del documento en la siguiente dirección electrónica o escaneando el código QR ingresando la siguiente clave:



5Tg7BnsiM

<https://efirma.uaem.mx/noRepudio/meln1pKJGDYKI6HAq2OgvjMkweakK37>

