

INSTITUTO TECNOLÓGICO Y DE ESTUDIOS SUPERIORES DE OCCIDENTE

Departamento de Procesos Tecnológicos e Industriales

Sustentabilidad y tecnología

PROYECTO DE APLICACIÓN PROFESIONAL (PAP)

Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

4G03 Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II

**“Manual de Prácticas de Laboratorio de Herramientas Biotecnológicas para el
Mejoramiento Genético en Plantas” en el Centro de Investigación y Asistencia en
Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. en Zapopan, Jalisco.**

PRESENTAN

Programas educativos y Estudiantes

Ing. en Biotecnología Vanessa Izquierdo Zepeda

Ing. en Biotecnología Andrea Castillo Ibarra

Profesor PAP: Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez

Tlaquepaque, Jalisco, mayo 2022

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP.....	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	0
1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional	0
1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto.....	1
1.2 Caracterización de la organización	4
1.3 Identificación de la(s) problemática(s)	5
1.4. Planeación de alternativa(s)	6
1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora.....	8
1.6. Valoración de productos, resultados e impactos.....	37
1.7. Bibliografía y otros recursos	38
1.8. Anexos generales	40
2. Productos.....	40
3. Reflexión crítica y ética de la experiencia	41
3.1 Sensibilización ante las realidades	41
3.2 Aprendizajes logrados	42
3.3 Inventario de competencias Inicial (ingreso del PAP) e Inventario de competencias Final (salida al PAP)	

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

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

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

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

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

El Reporte PAP consta de tres componentes:

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

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

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

Resumen

En el presente proyecto de aplicación profesional (4G03) del programa de apoyo a centros de investigación externos se colaboró con el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) para el diseño de un manual de laboratorio de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de plantas con el objetivo de ser implementado en los cursos ofertados para el público en general. Dicho manual contiene un total de nueve prácticas, en las cuales el usuario podrá seguir cada paso hasta lograr obtener los resultados esperados y adquirir conocimientos acerca de las distintas técnicas de mejoramiento genético vegetal.

Para la elaboración de este manual fue necesario realizar una investigación especializada en diferentes artículos científicos, libros y manuales ya existentes que permitieran enriquecer el contenido de cada práctica, así como también se determinaron las especies adecuadas para ser utilizadas como plantas modelos de acuerdo con las metodologías empleadas. Finalmente, la creación de dicho documento y diseño de protocolos queda abierto a la posibilidad de añadir nuevo contenido que pueda complementar o corregir en el futuro.

1. Ciclo participativo del Proyecto de Aplicación Profesional

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

En el presente PAP del Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos, se colaboró en área de Biotecnología vegetal en el Centro de Investigación y Asistencia Tecnológica y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) para la elaboración de un manual de laboratorio de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de plantas a cargo del Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez. Dicho proyecto cuenta ya con ocho prácticas documentadas, y se busca añadir más contenido durante este periodo, que permita una mayor comprensión a los lectores acerca de los métodos de mejoramiento genético en plantas.

Objetivos

Objetivo general

- Elaborar un manual de prácticas de laboratorio con herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de diversas especies de plantas.

Objetivos particulares

- Realizar una revisión bibliográfica acerca de las diversas metodologías de mejoramiento genético en plantas.
- Fortalecer el vínculo colaborativo entre CIATEJ y la universidad ITESO, que permita a los estudiantes adquirir nuevos conocimientos e impulsar la investigación en México.
- Implementar las prácticas diseñadas en cursos orientados para el público en general.
- Estudiar la problemática de los cultivos vegetales en la agricultura con el fin de conocer las posibles alternativas de mejoramiento genético.
- Proporcionar los fundamentos de la variación de la genética y su aplicación en plantas para aumentar el rendimiento y la resistencia a enfermedades y plagas.
- Llevar a cabo las prácticas realizadas en el PAP pasado para comprobar su metodología.

1.1 Entendimiento del ámbito y del contexto

La vulnerabilidad de los cultivos en México frente a sequías, enfermedades y plagas ha generado la necesidad de buscar alternativas para mejorar la resistencia y crecimiento de las plantas. Por lo tanto, se pretende proporcionar herramientas de mejoramiento genético que permitan realizar los cambios necesarios para satisfacer las distintas necesidades que presenta la agricultura. Para esto, será tema de investigación la información reportada e historia acerca de las técnicas de mejoramiento genético aplicadas en México.

Antecedentes

Desde hace más de 10,000 años, los agricultores y fitomejoradores producen alteraciones en el genoma de las plantas para obtener cultivos con mayor rendimiento y producir alimentos

de alta calidad. A lo largo de los siglos, las metodologías empleadas para el mejoramiento genético de cultivos han ido evolucionando junto con la biotecnología agrícola a partir de las necesidades ambientales, sociales y de producción [1].

Hoy en día se han desarrollado nuevas herramientas biotecnológicas para seguir contribuyendo al mejoramiento de cultivos. Existe una variedad de investigaciones relacionadas con el mejoramiento de diversas especies de plantas, donde se reportan las metodologías y el fundamento para realizar alteraciones específicas que permitan mejorar o satisfacer alguna necesidad. Un ejemplo de esto es el manual publicado por el CONACYT (Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología) en 2018, que presenta las principales tecnologías para realizar el proceso de mejoramiento genético [2].

Contexto

Actualmente, México cuenta con alrededor de 26,000 especies, posicionándose en el lugar número cuatro en la flora a nivel mundial. Muchas de estas especies son empleadas en alimentos, industria farmacéutica, perfumería, forraje y comercio ornamental. Existe una gran variedad de dichas especies que han sido mejoradas genéticamente, sin embargo, el número de especies empleadas para este propósito es limitado comparado con la diversidad con potencial que se puede encontrar en el país [3].

Gracias a la diversidad con la que se cuenta dentro del territorio nacional, México se encuentra dentro de los 10 países con mayor producción agropecuaria, siendo el principal exportador de tomates, chiles, pimientos, frutos rojos y aguacates en el mundo. Dentro del sector primario, la agricultura es la actividad que presenta un mayor porcentaje de inflación (70%); en el ámbito agropecuario se generan 5.4 pesos de cada 100 generados en la economía del país, mientras que el área agroalimentaria genera en promedio el 10.5% del valor de la economía [4].

México ha presentado un aumento productivo del 82.4% en 25 años, en 2019 el sector cerró con una producción de 282.5 millones de toneladas métricas, obteniendo un porcentaje 1.4 mayor que el del 2018. Sin embargo, está previsto que la producción agropecuaria disminuya

un 25% debido a problemas de sequía que se han presentado principalmente en los cultivos de frijol y caña de azúcar [4].

El aumento exponencial de la población ha generado como consecuencia el incremento de la demanda y escasez de alimentos, por lo tanto, ha aumentado el cultivo y la producción de diversas plantas. Sin embargo, existe una serie de problemas que dificultan el abastecimiento de dicha demanda, como los tiempos en los que tarda en crecer una planta, las posibles plagas y enfermedades a las que están expuestas, la escasez de agua y las condiciones adversas a las que es expuesta.

Una posible solución a estos problemas es el uso de herramientas biotecnológicas que permitan mejorar los cultivos y les generen resistencia a sequías, enfermedades, etc. Para esto, existen diversas técnicas de mejoramiento y micropropagación, como lo son los métodos tradicionales, los distintos tipos de mutagénesis y la transformación genética mediante diferentes métodos y tecnologías [5]

Las prácticas de mejoramiento genético en México llevan aproximadamente 80 años, sin embargo, el nivel de conocimiento actual acerca de la variación genética se ha incrementado en los tres últimos lustros. En 2008 la Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad contaba con una recopilación de investigaciones sobre la variación genética de 200 especies. Estudios posteriores de dicha institución reportan un mayor número de especies con importancia agrícola, así como una mayor generación de información genómica para muchas especies mexicanas [6].

Es de suma importancia señalar que la variabilidad genética de las especies silvestres resulta ser poco conocida sin importar el país de origen. En México, la Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales reportó un importante número de estudios que afirman el hecho de que la mayor variabilidad genética se encuentra en los centros de origen de las especies, como es el caso del maíz. Una gran parte de las plantas cultivadas en México fueron introducidas en la industria para la alimentación y bienestar de la población. Gracias a esto,

alrededor de la mitad de las calorías que consumen los mexicanos son provenientes de especies originalmente mejoradas en México [7].

La región de Jalisco es una de las principales ponencias del desarrollo de la investigación y tecnologías para la biotecnología en el país, contando con importantes instituciones de investigación, como lo son el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias en la Universidad de Guadalajara (CUCBA) y el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) [8].

1.2 Caracterización de la organización

El presente PAP del Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos se desarrolla dentro del área de Biotecnología Vegetal en el CIATEJ, ubicado dentro del estado de Jalisco. El CIATEJ pertenece a la Coordinación de Medio Ambiente, Salud y Alimentación del Sistema de Centros Públicos de Investigación (CPI) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT). Se pretende elaborar un manual de laboratorio de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de plantas bajo la supervisión del Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez. Dentro del área de Biotecnología Vegetal, a cargo de la Dra. Antonia Gutiérrez Mora, donde se busca brindar servicios tecnológicos y desarrollo de recursos humanos para contribuir al incremento de ventajas competitivas e innovadoras en los mercados globales actuales [8].

La misión de CIATEJ es “Somos un Centro Público de Investigación del CONACYT que impulsa el desarrollo tecnológico del país mediante la generación de conocimiento de vanguardia y la aplicación innovadora de la biotecnología”. Su visión es ser una organización de conocimiento e innovación que forma redes de colaboración nacionales e internacionales y alianzas con empresas de bases tecnológica para contribuir al desarrollo sustentable del país [9].

El CIATEJ cuenta con 27 centros que cubren los principales campos del conocimiento científico, tecnológico, social y humanístico. El CIATEJ cuenta con cinco grandes coordinaciones: Coordinación de Manufactura Avanzada y Procesos Industriales (7 Centros);

Coordinación de Física y Matemáticas Aplicadas y Tecnologías de la Información (6 Centros); Coordinación de Medio Ambiente, Alimentación y Biotecnología (7 Centros); Coordinación de Economía, Política Pública y Desarrollo General (4 Centros) y Coordinación de Historia y Antropología Social (4 Centros). Dichos centros se encuentran distribuidos en Monterrey, Zapopan y Mérida [9].

1.3 Identificación de la(s) problemática(s)

Una de las partes más significativas de las investigaciones genéticas en plantas son las variedades obtenidas debido a su importancia económica y social. El mejoramiento genético vegetal ha ofrecido a la humanidad conocimientos que proporcionan una mayor eficiencia en los cultivos, al permitir calcular los cambios fenotípicos generados por componentes genéticos y ambientales, así como también por la interacción de estos.

Existe una serie de fenómenos actuales en el mundo como la globalización que genera una mayor competencia en la producción y los cultivos, por lo cual, el mejoramiento genético vegetal debe responder a las diferentes exigencias de los consumidores y al mismo tiempo tener en cuenta la sostenibilidad de la agricultura y la preservación del medio ambiente. Por otro lado, es claro que una de las mayores limitantes del crecimiento potencial de la generación de variedades en plantas es la reducida base genética con la que cuenta México. Debido a esto, se busca desarrollar un manual que contenga una variedad de métodos de mejoramiento genético en distintas especies que posteriormente sea utilizado en un curso orientado para el público en general, donde se logre proporcionar conocimientos tanto teóricos como experimentales.

Actualmente, hay una variedad de investigaciones relacionadas con el mejoramiento de diversas especies de plantas, donde se reportan las metodologías para realizar alteraciones específicas que permitan mejorar o satisfacer alguna necesidad. Un ejemplo de esto es el manual publicado por el CONACYT en 2018, que presenta las principales tecnologías para realizar el proceso de mejoramiento genético.

En el presente proyecto se cuenta con la colaboración del Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez, quien ha estado presente en diferentes Proyectos de Aplicación Profesional y tiene experiencia en el Mejoramiento Genético Vegetal. Desde el año 2000 se encuentra trabajando en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco (CIATEJ) donde ha llevado a cabo diversas investigaciones, entre ellas, el mejoramiento genético de plantas como lo son la piña, el aguacate y el cempasúchil.

Durante el semestre de otoño de 2021 se inició la preparación del manual de mejoramiento genético con el diseño y elaboración de las primeras prácticas que incluían únicamente metodologías no transgénicas. La extensión del manual era de ocho prácticas configuradas de acuerdo a la información consultada en artículos científicos o libros relacionados con el mejoramiento genético de plantas.

1.4. Planeación de alternativa(s)

La Tabla 1 corresponde al cronograma de actividades para la ejecución del presente Proyecto de Aplicación Profesional. En dicha tabla, se desglosa el desarrollo del proyecto por etapas, permitiendo la organización e indicación del trabajado realizado durante las 16 semanas del semestre. Durante este periodo, se planearon por lo menos una vez a la semana sesiones de asesoría con el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez con la finalidad de presentar avances y realizar mejoras al manual.

En esta segunda fase de la elaboración del manual se realizó una revisión bibliográfica sobre los temas abordados en las prácticas para plantear preguntas específicas que permitan a los usuarios una mayor comprensión de cada tema y las técnicas empleadas en cada práctica. De igual manera se diseñaron diagramas de flujo de cada metodología sugerida en el manual como un apoyo ilustrativo. Finalmente, se buscará diseñar nuevas prácticas que puedan ser útiles y fáciles de hacer para el público en general.

Tabla 1. Cronograma de actividades previstas para la realización del proyecto.

Actividades	Recursos utilizados	Tiempo (días)	Semana															
			1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Planificación del proyecto														
Primera sesión informativa con el Dr. José Manuel acerca de la dinámica y los conocimientos a emplear	Teams, profesor	1												
Repaso de los métodos de mejoramiento genético en plantas incluidos en el manual	WORD, artículos bibliográficos	4												
Estructura y ajustes del manual de prácticas de laboratorio														
Sesión con el Dr. José Manuel para acordar el contenido nuevo a agregar	Teams, profesor	1												
Elaboración de preguntas para cada práctica diseñada	WORD, artículos bibliográficos	4												
Realización de diagramas de flujo para las primeras 4 prácticas del manual	Biorender	4												
Sesión con el Dr. José Manuel para la revisión de avances	Teams, profesor	1												
Finalización de los diagramas de flujo de todas las prácticas	Biorrender	4												
Sesión con el Dr. José Manuel para la revisión de avances	Teams, profesor	1												
Corrección del manual de prácticas	WORD	4												
Construcción de las medidas de seguridad generales en el laboratorio	WORD	4												
Diseño de la práctica 9														
Investigación de la metodología y elección de la planta modelo	Artículos bibliográficos	4												
Investigación de la metodología y elección de la planta modelo	Teams, profesor	1												
Diseño del experimento	WORD	4												
Redacción y aplicación del formato	Artículos bibliográficos	4												
Sesión con el Dr. José Manuel para revisar el manual de prácticas	Teams, profesor	1												
Elaboración de preguntas acerca de la práctica 9	WORD	4												

Realización de diagramas de flujo para la práctica 9	Biorrender	4																									
Sesión con el Dr. José Manuel para revisar el manual de prácticas	Teams, profesor	1																									
Diseño de la práctica 10																											
Investigación de la metodología y elección de la planta modelo	Artículos bibliográficos	4																									
Diseño del experimento	WORD	4																									
Redacción y aplicación del formato	WORD	4																									
Sesión con el Dr. José Manuel para revisar el manual de prácticas	Teams, profesor	1																									
Elaboración de preguntas acerca de la práctica 10	WORD	4																									
Realización de diagramas de flujo para la práctica 10	Biorrender	4																									
Sesión con el Dr. José Manuel para revisar el manual de prácticas	Teams, profesor	1																									
Sesiones y entregas del PAP apoyo a centros de investigación																											
Primera sesión grupal dirigida por la maestra Blanca Valdivia, Gabriela Porras y Fermín	Zoom, profesor	1																									
Segunda sesión grupal dirigida por la maestra Gabriela Porras	Zoon, profesor	1																									
Tercera sesión grupal dirigida por la maestra Gabriela Porras	Zoom, profesor	1																									
Primera entrega RPAP	Canvas	1																									
Segunda entrega RPAP	Canvas	1																									
Tercera entrega RPAP	Canvas	1																									
Entrega final del documento RPAP	Canvas	1																									
Presentación final del Proyecto de Aplicación Profesional	Canvas	1																									

1.5. Desarrollo de la propuesta de mejora

Se elaboró un manual de nueve prácticas enfocadas en el mejoramiento genético vegetal, el cual servirá como una herramienta para los usuarios que tengan interés en conocer los

diferentes métodos y técnicas que les permitan obtener plantas o cultivos con características específicas. En esta sección se presentarán las evidencias del proceso de elaboración de dicho manual con capturas de pantalla de ciertas secciones del documento, sin embargo, el manual completo se encuentra en los anexos de este archivo. En la Ilustración 1 se muestra el índice del manual propuesto con el contenido y el nombre de cada una de las prácticas de laboratorio.

ÍNDICE

Medidas de seguridad	3
Antecedentes	4
Práctica 1. Androgénesis	8
Práctica 2. Germinación de polen	12
Práctica 3. Viabilidad de granos de polen	16
Práctica 4. Arrestadores mitóticos	20
Práctica 5. Fusión de protoplastos	24
Práctica 6. Producción de aneuploides con cafeína	29
Práctica 7. Rescate de embriones	34
Práctica 8. Corte estilar	39
Práctica 9. Fertilización <i>in vitro</i>	43

Ilustración 1. Índice del manual de prácticas de laboratorio para el mejoramiento genético de plantas.

El manual describe los diferentes métodos utilizados en el mejoramiento genético de plantas que son clasificados como: Hibridación (Mejoramiento genético tradicional), Mutagénesis (física y química) y uso de herramientas biotecnológicas (transgénicas y no transgénicas). Sin embargo, las prácticas están enfocadas solamente en el uso de herramientas biotecnológicas no transgénicas, y además, los procedimientos son realizados de manera *in vitro* permitiendo obtener material libre de contaminantes o patógenos como lo son los hongos y bacterias.

La estructura de cada una de las prácticas diseñadas cuenta con cinco secciones: objetivos, introducción, metodología, diagramas de flujo y cuestionario. Los objetivos describen la finalidad y aprendizajes que serán adquiridos al realizar las diferentes prácticas. La introducción se encarga de informar al lector acerca de la técnica a realizar y definir

conceptos que permitan el enlace y comprensión de las prácticas. Por otro lado, la metodología es un apartado que se encarga de explicar paso a paso el proceso necesario para realizar cada técnica de mejoramiento genético.

Los diagramas de flujo diseñados a partir de las metodologías propuestas para cada práctica fueron realizados mediante las herramientas de BioRender, que nos permitió ilustrar paso a paso lo que se debe realizar. Por su parte, la sección del cuestionario incluye una serie de preguntas relacionadas con las técnicas empleadas que el usuario deberá investigar y resolver con el objetivo de generar un conocimiento y entendimiento previo, tanto de los procesos como de la importancia de cada una de las metodologías.

Durante el periodo de otoño-invierno, se contaba con la estructura de 8 prácticas, sin embargo, el manual requería secciones que permitieran al usuario generar una mayor comprensión de los temas a tratar y un manejo adecuado del espacio y materiales a emplear. Para esto, se agregó una sección de medidas de seguridad, así como también diagramas de flujo y cuestionario para cada una de las prácticas. Como última actividad, se realizó el diseño y estructura de una nueva práctica, titulada “Fertilización in vitro”.

En la ilustración 2, se presentan las medidas de seguridad requeridas durante la realización de las prácticas de dicho manual, que tendrán el objetivo de generar un ambiente seguro para los usuarios y un cuidado de los equipos e instalaciones.

Medidas de seguridad

REGLAS PERSONALES

- El usuario deberá llevar obligatoriamente botas, bata y guantes durante todas las prácticas.
- Está prohibido el consumo de alimentos y bebidas dentro del laboratorio.
- Lavarse las manos antes y después de realizar cada una de las prácticas.
- No ingerir ningún producto químico.
- Prestar atención y seguir las instrucciones del instructor.
- Cuidar los materiales y/o equipos que se utilicen.
- Lavarse las manos de manera correcta antes y después de realizar cada práctica.

REGLAS PARA LOS EQUIPOS

- Leer y seguir las instrucciones de operación de los equipos.
- Informar al instructor sobre las posibles fallas presentadas en los equipos.
- Limpiar y mantener en buen estado los equipos utilizados.

REGLAS SOBRE EL ESPACIO DE TRABAJO

- Limpiar el espacio de trabajo antes y después de utilizarlo.
- Desechar o guardar los reactivos y materiales empleados durante cada práctica.
- Tener conocimiento de las medidas de seguridad en caso de accidente (regadera, limpia ojos y extintor).
- Seguir adecuadamente las indicaciones de desalojo en caso de emergencia.

Ilustración 2. Medidas de seguridad generales para la realización de las prácticas.

A continuación, se presenta la recopilación del contenido diseñado para la elaboración del manual de prácticas de laboratorio de herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético en plantas. Se lograron obtener ocho prácticas, de las cuales se muestran y explican detalladamente sus metodologías.

PRÁCTICA 1. ANDROGÉNESIS

Se diseñó la primer práctica nombrada Androgénesis donde se busca generar plantas haploides mediante el uso de anteras de *Lilium* que logren la formación de callos. Para esto, es necesario la preparación del medio de cultivo adecuado para la regeneración de las plantas donde se utilizará medio MS ajustado a un pH de 5.8 y suplementado con citocinas y auxinas.

Después de esto se realizará el pretratamiento de anteras y se colocarán en el medio de cultivo, logrando así la expresión de embriones haploides (Ilustración 3 y 4).

METODOLOGÍA

Preparación del medio de cultivo para la realización de androgénesis en *Lilium*

1. Disolver 250mL de agua destilada con medio MS suplementado con 0.1mg/L de BA (bencil adenina) y 0.1mg/L de ANA (ácido naftalenacético).
2. Medir y ajustar el pH a 5.8
3. Agregar 7g/L de agar y calentar hasta llegar al punto de ebullición para disolver completamente el agar.
4. Dejar enfriar el medio y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
5. Verter el medio en cajas Petri.

Pretratamiento de anteras

1. Realizar cortes de brotes florales de entre 2.5 y 3.0 cm con el propósito de aislar las anteras que contengan microsporas en estadio uninucleado.
2. Desinfectar las anteras con etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos y después realizar enjuagues con agua destilada.
3. Sumergir en hipoclorito de sodio las anteras durante 10 minutos y nuevamente emplear agua destilada como forma de enjuague.
4. Colocar las anteras en el medio de cultivo e incubar a 27°C con un fotoperiodo de 16h luz y 8h de oscuridad durante 30 días.

Expresión de embriones haploides

1. Colocar las anteras pretratadas en el medio de cultivo adecuado para la formación de callo.

Ilustración 3. Metodología diseñada para la realización de androgénesis.

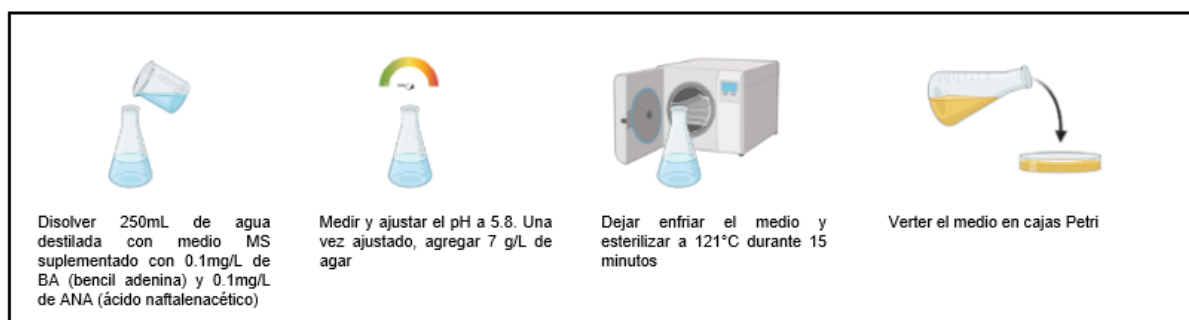


Figura 1. *Preparación del medio de cultivo*

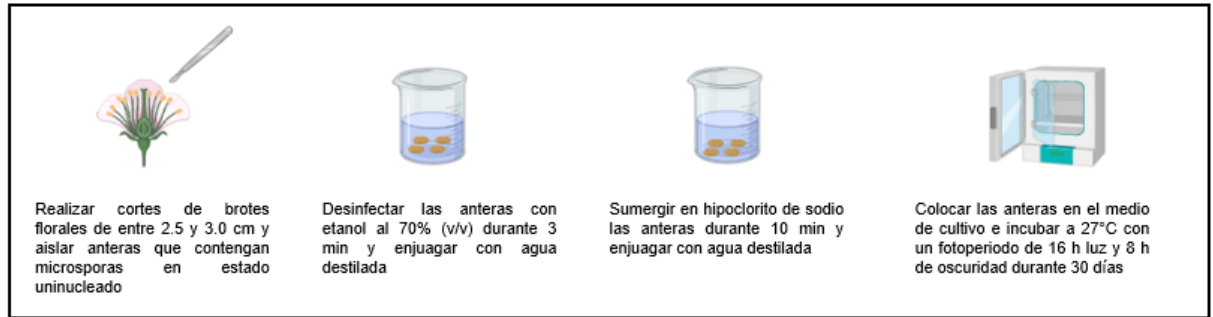


Figura 2. *Pretratamiento de anteras.*

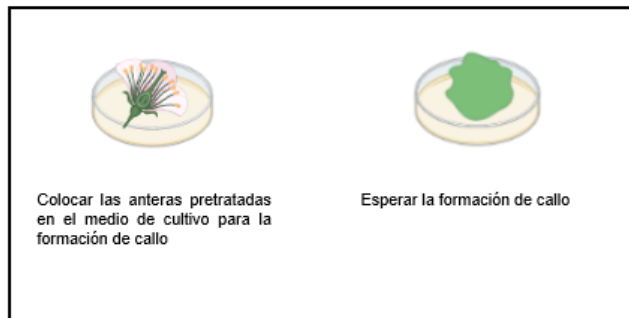


Figura 3. *Expresión de embriones haploides.*

Ilustración 4. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de androgénesis.

Posteriormente se elaboró una serie de preguntas relacionadas con la androgénesis y algunos elementos de la metodología diseñada, con el objetivo de que el usuario tenga noción de lo que va a realizar y el fundamento de la práctica, véase en la Ilustración 5. También se añadieron preguntas acerca de la importancia de este método y la comparación con la ginogénesis, ya que es de gran importancia tener conocimientos diversos y alternativas de metodologías.

CUESTIONARIO

- 1.- ¿Qué es una planta haploide?
- 2.- ¿Cuál es el pH óptimo para trabajar el medio MS? O ¿Por qué es importante mantener un pH de 5.8 en el medio?
- 3.- ¿Cuál es el objetivo de sembrar las anteras *in vitro*?
- 4.- ¿Cuál es la diferencia entre androgénesis y ginogénesis?
- 5.- ¿Por qué es importante que las anteras se encuentren en estado uninucleado?

Ilustración 5. Cuestionario elaborado para la práctica 1.

PRÁCTICA 2. GERMINACIÓN DE POLEN

El objetivo de esta práctica fue conocer el porcentaje de germinación del polen cultivado de manera in vitro. Para la elección de las plantas modelos se realizaron pruebas con distintas especies de plantas con el propósito de seleccionar aquellas con mayor porcentaje de germinación. Se realizaron pruebas con 7 especies, de las cuales 5 presentaron una germinación significativa (arriba del 85%) que permitió ampliar el número de plantas modelo.

Como se puede leer en la Ilustración 6 y observar en la Ilustración 7, la metodología diseñada consiste en la recolección y cultivo de granos de polen en un medio sólido que favorezca su germinación. Las condiciones para lograr una germinación del polen son temperatura ambiente y oscuridad en un tiempo mínimo de 24 h. Finalmente, el conteo de los granos germinados es realizado en el microscopio, donde se determina el porcentaje de germinación dependiendo de los granos que generaron el tubo polínico.

METODOLOGÍA

Pretratamiento de los granos de polen

1. Recolectar flores en plena floración y colocarlas en cajas Petri con silica gel durante un periodo de entre 24-36 horas.
2. Mantener las anteras abiertas a bajas temperaturas por dos horas para hidratar los granos de polen.

Preparación del medio de cultivo sólido

1. Mezclar 100mg/L de H_3BO_3 , 300mg/L de $Ca(NO_3)_2$, 200mg de $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 100mg/L de KNO_3 y 10% de sucrosa.
2. Agregar Phytigel (polvo incoloro espesante)
3. Verter el medio de cultivo en cajas Petri colocando 25mL en cada una.

Germinación de granos de polen

1. Colocar los granos de polen sobre el medio de cultivo espolvoreándolos de manera que queden totalmente dispersos (Extraer los granos de polen que se encuentran en las anteras con ayuda de un pincel).
2. Colocar las cajas Petri boca abajo y en la oscuridad durante 24h.

Resultados a analizar

1. Contar 100 granos de polen por caja Petri y calcular el porcentaje de granos germinados (Los granos de polen germinados presentan un tubo que corre por todo el medio de cultivo, llamado tubo polínico).

Ilustración 6. Técnica para producir la germinación de polen *in vitro*.

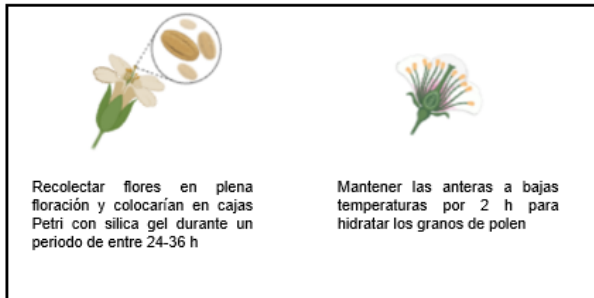


Figura 4. *Pretratamiento de los granos de polen.*

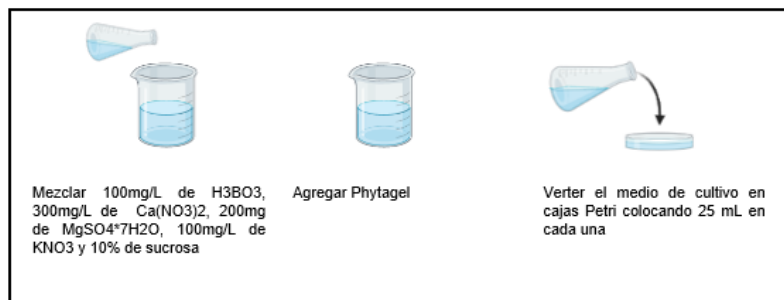


Figura 5. *Preparación de medio de cultivo sólido.*

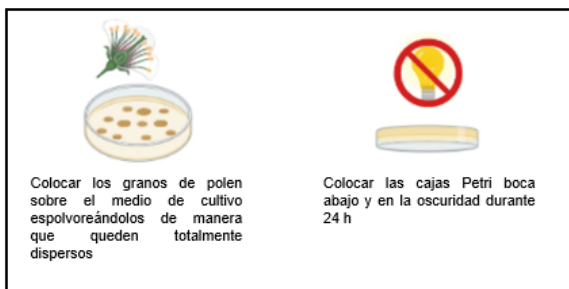


Figura 6. *Germinación de granos de polen*

Ilustración 7. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de germinación de polen *in vitro*.

Para la investigación previa a la realización de esta práctica, los usuarios deberán contestar las siguientes preguntas con el fin de generar un interés y comprensión acerca del tema a tratar en la práctica 2 (Ilustración 8). Estas preguntas incluyen el procedimiento para calcular la tasa de germinación, la importancia de la germinación *in vitro*, las partes del grano de polen, entre otras que servirán de apoyo en la replicación de la metodología y la interpretación de los resultados.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué pasaría si el tiempo de oscuridad para la germinación de polen fuera menor a 24 horas?
2. ¿Cómo se calcula la tasa de germinación?
3. ¿Qué compuestos están involucrados en el desarrollo del tubo polínico?
4. Menciona otra técnica para determinar la viabilidad de los granos de polen.
5. ¿Cuál es la aplicación/importancia de la germinación de polen en medios de cultivo in vitro?
6. Esquema de las partes de un grano de polen
7. ¿En dónde se encuentran los granos de polen?
8. ¿Qué diferencias observas en la germinación de los granos de polen de distintas especies?

Ilustración 8. Cuestionario elaborado para la práctica 2.

PRÁCTICA 3. VIABILIDAD DE LOS GRANOS DE POLEN

Como tercera práctica se diseñó una metodología de la viabilidad de los granos de polen, en la cual se eligieron las plantas modelos con respecto a los resultados del porcentaje de germinación de polen de la práctica 2. La elección de las especies se determinó a partir de los resultados obtenidos en el porcentaje de germinación (Práctica 2), donde se cuenta con 5 especies como plantas modelo.

Se diseñó un proceso para lograr determinar la viabilidad del polen de las plantas mediante la adición de una solución de azul de anilina con lactofenol al 1%. Dicha sustancia tiene la capacidad de teñir los granos de polen de manera que se observe la diferencia entre los granos viables y los no viables en el microscopio (Ilustración 9 y 8).

METODOLOGÍA

Preparación de la solución de azul de anilina con lactofenol

1. Mezclar 20mL de fenol cristalizado, 20mL de ácido láctico (85%) y 40mL de glicerina con 20mL de agua destilada

Germinación de granos de polen

1. Situar los granos de polen sobre un portaobjetos espolvoreándolos de manera que se encuentren dispersos totalmente (Extraer los granos de polen que se encuentran en las anteras).
2. Cubrir con azul de anilina en lactofenol al 1% los granos de polen.
3. Colocar un cubreobjetos sobre la muestra y observar en el microscopio.

Determinación de la viabilidad

1. Contar y determinar la viabilidad de los granos de polen al comparar el grado de coloración de los granos de polen.

Ilustración 9. Protocolo para determinar la viabilidad de los granos de polen.



Figura 7. Preparación de la solución de azul de anilina con lactofenol

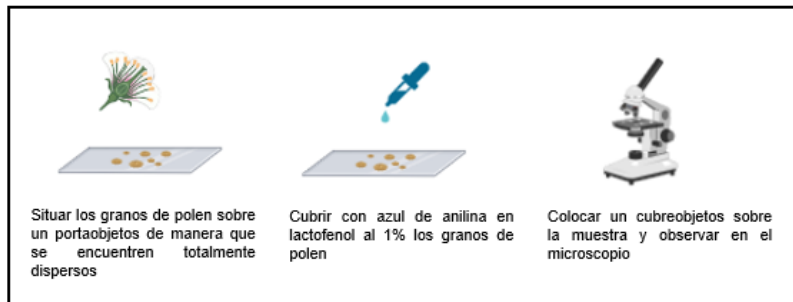


Figura 8. Germinación de granos de polen

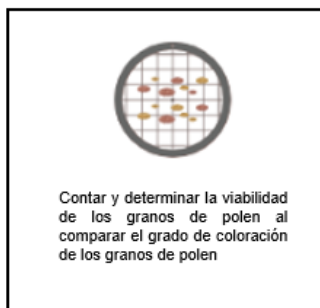


Figura 9. Determinación de la viabilidad

Ilustración 10. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de viabilidad de granos de polen.

Como se puede observar en la Ilustración 11, en el diseño de esta práctica se contemplaron solo 4 preguntas en la sección del cuestionario, ya que esta metodología es la continuación de la práctica anterior. Dicho cuestionario se enfoca en las soluciones empleadas y su fundamento, la importancia de la viabilidad de los granos de polen y los factores que afectan a este.

1. ¿Qué efecto tiene la solución de azul de anilina con lactofenol al 1%?
2. Menciona otra técnica para determinar la viabilidad de los granos de polen.
3. ¿Qué importancia tiene conocer la viabilidad de los granos de polen?
4. ¿Qué factores influyen en la longevidad del polen?

Ilustración 11. Cuestionario elaborado para la práctica 3.

PRÁCTICA 4. ARRESTADORES MITÓTICOS

Esta práctica consiste en el empleo de sustancias que impidan la llegada al anafase, causando el acortamiento y la dispersión de los cromosomas, véase en las Ilustraciones 12 y 13. El objetivo de dicho proceso es determinar el número de cromosomas de cada planta, para lo cual se elaboró un protocolo que se divide en dos partes: pretratamiento de los ápices radiculares y digestión enzimática. Se determinaron las especies *Allium cepa* (cebolla) y *Lilium* (azucena) como plantas modelo para realizar dicha técnica, debido a la información significativa encontrada acerca de ellas y la alta capacidad de formación de sus raíces.

METODOLOGÍA

Pretratamiento de los ápices radiculares

1. Realizar cortes de ápices radiculares de 1cm de longitud y colocar en solución de alfa-bromonaphtaleno a 4°C durante 48h.
2. Remover ápices de la solución de bromonaphtaleno y agregar solución fijadora de metanol-ácido acético para almacenar a 4°C por 24h.
3. Realizar lavados de los ápices en un periodo de 10 min con agua MilliQ

Digestión enzimática

1. Cortar los meristemos y centrifugar durante 10 min en tubos de microcentrifuga de 0.65mL con buffer de citrato 10mM.
2. Descartar el buffer de citrato y agregar a los meristemos 50uL de mezcla enzimática integrada por 0.2% (w/v) de pectinasa Y23, 0.2% (w/v) de celulasa RS y 0.2% (w/v) de citohelicasa en solución 10mM de buffer de citrato con un pH de 4.5.
3. Incubar los meristemos radiculares a 37°C en un tiempo de 3 a 3.5h, esto dependiendo del diámetro de la raíz empleada.

Ilustración 12. Técnica para determinar el número de cromosomas en plantas.

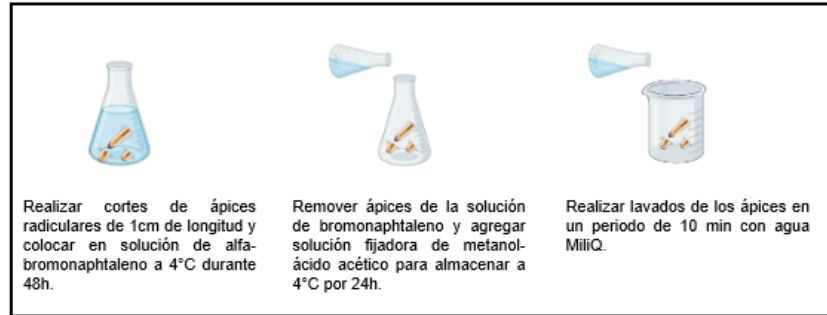


Figura 10. *Pretratamiento de ápices radiculares*

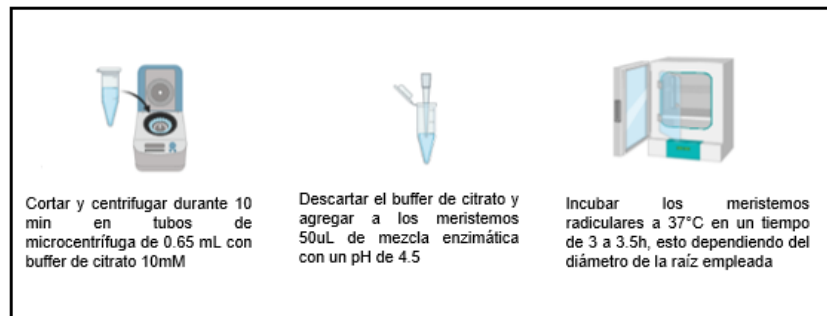


Figura 11. *Digestión enzimática*

Ilustración 13. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de arrestadores mitóticos.

Para esta práctica, se incluyeron 8 preguntas a la sección del cuestionario (Ilustración 14), donde se buscó abarcar temas acerca de la mitosis y sus etapas, qué son los arrestadores mitóticos, que función tiene la mezcla enzimática en los ápices radiculares, que fundamento hay en el empleo de soluciones específicas, etc. Todo esto con el objetivo de que el usuario resuelva cualquier duda antes de realizar la práctica y comprenda de manera más profunda el fundamento e importancia de la metodología.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuáles son las etapas de la mitosis?
2. ¿Qué ocurre en la etapa de anafase de la mitosis?
3. ¿Qué efecto tiene una exposición prolongada de los tejidos a arrestadores mitóticos?
4. ¿Qué efecto tienen las bajas temperaturas con los arrestadores mitóticos?
5. ¿Qué son los arrestadores mitóticos?
6. Menciona otra técnica para determinar el número de cromosomas
7. ¿Qué acción tiene la mezcla enzimática?
8. ¿Por qué se utiliza la solución fijadora de metanol-ácido acético? ¿Cuál es su finalidad?

Ilustración 14. Cuestionario elaborado para la práctica 4.

PRÁCTICA 5. FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Se elaboró un protocolo para la fusión de protoplastos mediante digestión enzimática con el objetivo de lograr la transferencia de genes en plantas, el cual está conformado por diferentes etapas: pretratamiento del material vegetal, digestión enzimática, filtración y purificación de protoplastos (Ilustración 15 y 16). En el proceso de la digestión enzimática se seleccionó una combinación de enzimas de pectinasa, celulosa y citohelicasa que permitiera la suspensión de los protoplastos junto con los residuos y células, para posteriormente filtrar y purificar dichos protoplastos mediante una serie de pasos que implican la utilización de filtros nylon, soluciones de lavado y centrifugaciones.

METODOLOGÍA

Pretratamiento de hojas

1. Recolectar hojas de violeta africana.
2. Desinfectar las hojas con etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos y después realizar enjuagues con agua destilada.
3. Sumergir en hipoclorito de sodio dichas hojas en un periodo de 10 minutos y nuevamente utilizar agua destilada para realizar enjuagues.

Digestión enzimática

1. Cortar y centrifugar durante 10 min en tubos de microcentrifuga de 0.65mL con buffer de citrato 10mM.
2. Descartar el buffer de citrato y agregar a los meristemos 50uL de mezcla enzimática integrada por 0.2% (w/v) de pectinasa Y23, 0.2% (w/v) de celulasa RS y 0.2% (w/v) de citohelicasa en solución 10mM de buffer de citrato con un pH de 4.5.

Filtración y purificación de protoplastos

1. Resuspender la solución de protoplastos, tejido, células y residuos celulares con una pipeta Pasteur y verter en un filtro de nylon.
2. Trasladar la solución a un tubo de ensayo y centrifugar a 800rpm durante 3 minutos.
3. Eliminar el sobrenadante y suspender los protoplastos precipitados en 5mL de la solución de lavado.
4. Resuspender cuidadosamente los protoplastos en la solución con una pipeta.
5. Centrifugar durante 10min a una velocidad de 500rpm.
6. Repetir 2 veces la operación de lavado.

Ilustración 15. Metodología empleada en la fusión de protoplastos

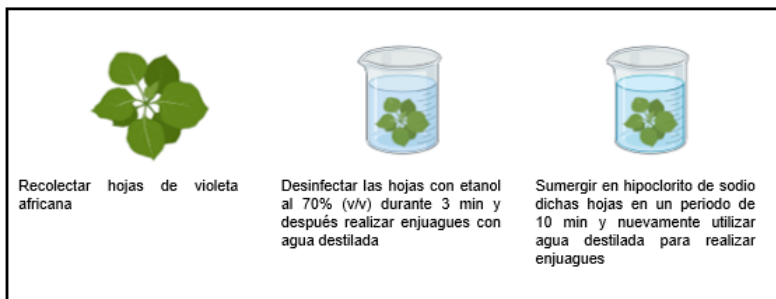


Figura 12. *Pretratamiento de hojas*

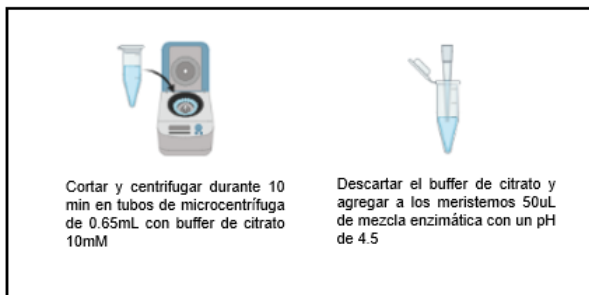


Figura 13. *Digestión enzimática*

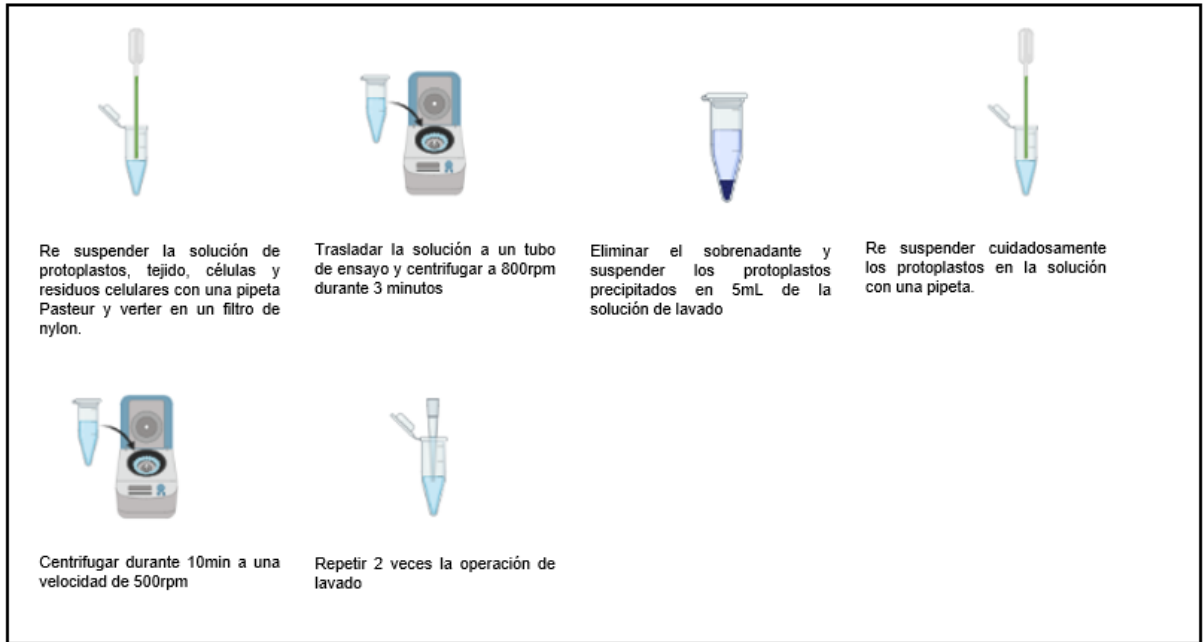


Figura 14. *Filtración y purificación de protoplastos.*

Ilustración 16. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de fusión de protoplastos.

Después de realizar los diagramas de flujo se elaboraron una serie de preguntas que generaran conocimientos acerca las aplicaciones e importancia de los protoplastos. Para esto se incluyeron preguntas acerca de la hibridación somática, la obtención de protoplastos y los distintos compuestos empleados en el proceso de fusión de protoplastos, con el objetivo de comprender los elementos que generar dicho fenómeno (Ilustración 17).

CUESTIONARIO

1. ¿Qué son los protoplastos y cuál es su importancia en el mejoramiento genético vegetal?
2. ¿Cuál es el fundamento de la hibridación somática?
3. Menciona los métodos para la obtención de protoplastos y descríbelos.
4. Investiga la función de la mezcla enzimática de pectinasa, celulasa y citohelicasa.
5. ¿Qué papel tiene el buffer en la disgregación celular?
6. Justifica la utilización del filtro de nylon en la fusión de protoplastos de acuerdo al tamaño de poros de éste.
7. ¿Cuál es el pH óptimo para la digestión enzimática de protoplastos y qué importancia tiene en este proceso?
8. ¿Qué son los protoplastos?
9. ¿Qué relevancia tienen los protoplastos en la biotecnología vegetal?
10. ¿En qué etapas consiste la fusión de protoplastos?

Ilustración 17. Cuestionario elaborado para la práctica 5.

PRÁCTICA 6. PRODUCCIÓN DE ANEUPLOIDES CON CAFEÍNA

El objetivo de esta práctica es conocer el proceso y la importancia del análisis citogenético en el mejoramiento vegetal, así como también estudiar los efectos de la cafeína en los cromosomas de las plantas ya que es considerado un agente mutagénico que inhibe la citocinesis y produce células binucleadas.

Para esto, se diseñó un proceso de exposición de ápices radiculares con cafeína 15mM durante 20 minutos que producirá alteraciones en el material genético para después ser sometidas a un análisis citogenético que permita determinar dichas alteraciones. Como se puede observar en la Ilustración 18 y 19, es necesario llevar una serie de pasos que incluyen diversas sustancias y técnicas para que dichos cambios sean observados en el microscopio. La planta modelo a utilizar en esta práctica es la cebolla (*Allium cepa*) debido a la cantidad de cromosomas diploides con los que cuenta. En la Ilustración 20 es posible observar las preguntas desarrolladas para una mejor comprensión de la práctica.

METODOLOGÍA

Tratamiento inductor con cafeína

1. Colocar los ápices radiculares en una solución de cafeína al 15mM durante 20 min.
2. Filtrar y lavar con agua destilada.

Análisis citogenético

1. Aplicar a las raíces una solución fijadora (Etanol: ácido acético (3:1)) por 15 minutos
2. Colocar las raíces en ácido clorhídrico 1N por 10 minutos.
3. Agregar 1 o 2 gotas de la solución Targa a los ápices radiculares en un periodo de 15 minutos.
4. Realizar cortes en secciones transversales al eje mayor de las raíces y colocarlas sobre una lámina.
5. Añadir 1 o 2 gotas acetorceína al 2% durante 17 minutos.
6. Colocar la muestra en un portaobjetos y cubrirla con un cubreobjetos aplastándola ligeramente (Técnica de squash).
7. Observar en el microscopio las células que se encuentran en mitosis y fases mitóticas con anomalías.

Ilustración 18. Protocolo para la producción de aneuploides con cafeína.

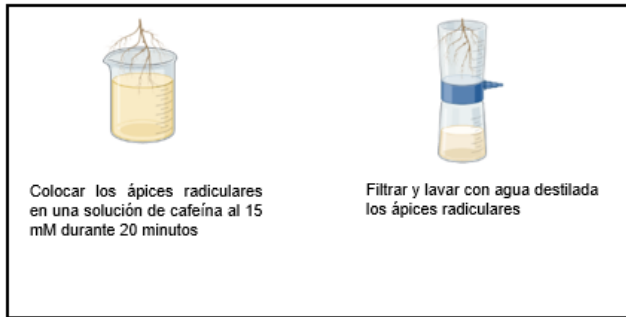


Figura 15. *Tratamiento inductor con cafeína*

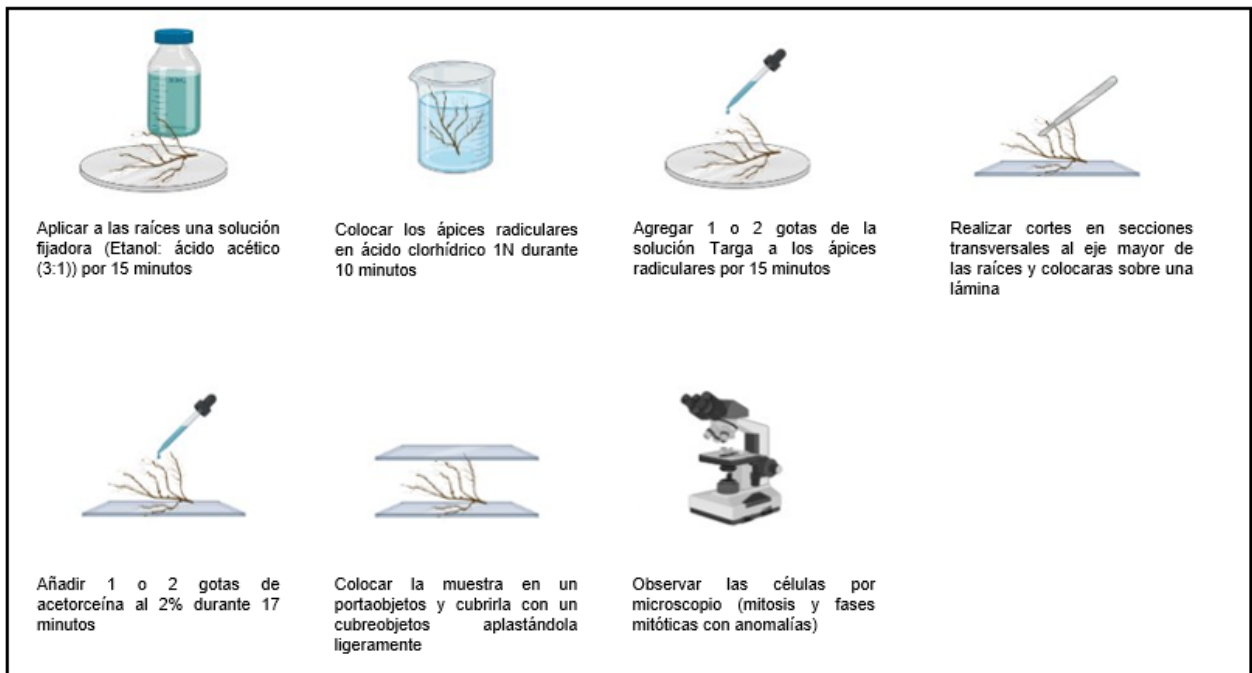


Figura 16. *Análisis citogenético*

Ilustración 19. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de producción de aneuploides con cafeína.

Para el tema de fusión de protoplastos, se elaboraron una serie de preguntas que generaran conocimientos acerca las aplicaciones y el fundamento de dicha técnica (Ilustración 20). Para esto se incluyeron preguntas acerca de la aneuploidía, las fases mitóticas, las variaciones cromosómicas y el análisis citogenético, con el objetivo de comprender los factores que ocasionan alteraciones cromosómicas y la manera de analizar esto. Por otra parte, una de las preguntas más significativas es la que relaciona la cafeína como agente mutagénico.

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es la aneuploidía?
2. ¿Cuáles son las fases mitóticas?
3. ¿Qué son las variaciones cromosómicas?
4. Investiga la clasificación de los aneuploides.
5. ¿Qué aplicación genética tienen las aneuploidías?
6. ¿Cuál es el fundamento del empleo de la cafeína como agente mutagénico?
7. ¿Qué es un análisis citogenético y en qué consiste?
8. Consulta el número de cromosomas de la cebolla.
9. ¿En qué consiste la citocinesis?
10. ¿Cómo inhibe la cafeína la citocinesis? (Diagrama o esquema)

Ilustración 20. Cuestionario elaborado para la práctica 6.

PRÁCTICA 7. RESCATE DE EMBRIONES

En esta práctica se diseñó una metodología para el rescate y cultivo *in vitro* de embriones debido a su importancia en el mejoramiento genético (Ilustración 21 y 22). Dicho método tiene la capacidad de generar plantas completas en menor tiempo sin perder la integridad genómica y produciendo líneas genómicas con mayor rapidez. En esta práctica se seleccionaron el maíz y el frijol para el rescate y cultivo *in vitro* de embriones, ya que presentan un porcentaje alto de desarrollo y manipulación de plantas.

Para la realización de la práctica es necesario preparar el medio de cultivo que permita el desarrollo de los embriones y realizar un pretratamiento de los embriones con el objetivo de evitar o disminuir una posible contaminación en el cultivo. Los embriones cultivados son incubados por una o dos semanas a una temperatura de 28°C.

METODOLOGÍA

Preparación del medio de cultivo para el rescate de embriones de maíz y frijol

1. Disolver en 150mL de agua destilada con el medio Murashige & Skoog (1962) e incorporar 4.5g de sacarosa
2. Medir y ajustar el pH a 5.8.
3. Agregar 0.9g de agar y calentar hasta llegar al punto de ebullición para disolver completamente el agar.
4. Dejar enfriar el medio y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

Pretratamiento de embriones

1. Extraer los embriones inmaduros del maíz 14 o 17 días después de la fecundación.
2. Desinfectar las mazorcas aplicando etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos y después realizar enjuagues con agua destilada.
3. Sumergir en hipoclorito de sodio las mazorcas durante 10 minutos y posteriormente realizar nuevamente enjuagues con agua destilada.

Rescate de embriones de maíz

1. Después de efectuar los pasos de desinfección, extraer embriones del maíz dentro de la campana de flujo laminar.
2. Realizar un corte longitudinal a lo largo de la mazorca y con una pinza de punta y un bisturí aislar el embrión.
3. Colocar el embrión en el medio de cultivo e incubar a 28°C por 1 o 2 semanas.

Ilustración 21. Metodología para el cultivo *in vitro* de embriones.

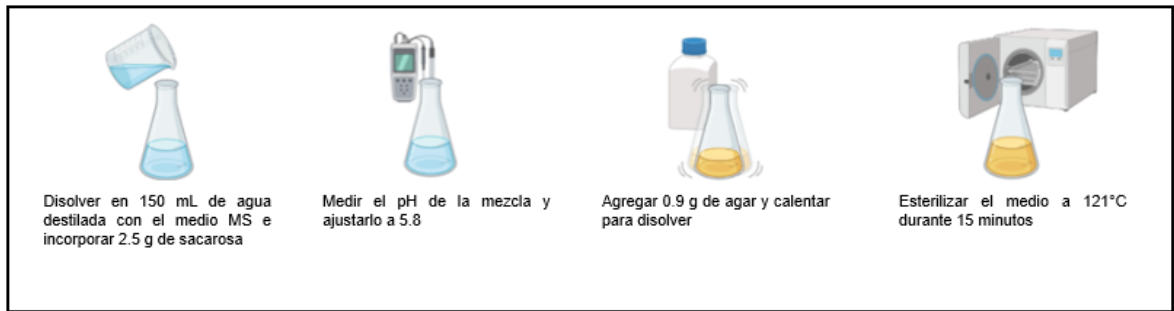


Figura 17. Preparación del medio de cultivo para el rescate de embriones de maíz y frijol

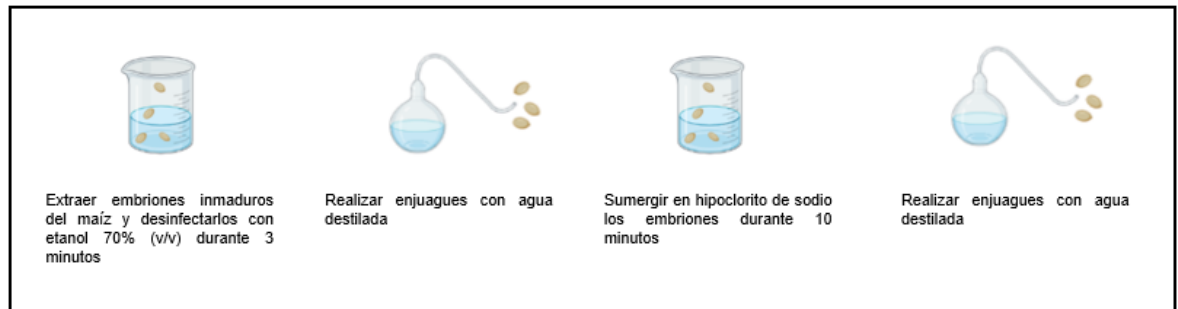


Figura 18. Pretratamiento de embriones



Figura 19. Rescate de embriones de maíz

Ilustración 22. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de rescate de embriones.

El cuestionario incita al lector a investigar sobre el rescate de embriones para una mayor comprensión del tema. Algunas de las preguntas en el cuestionario son el investigar las partes de una semilla para identificar al embrión, que es el embrión, entre otras preguntas como la importancia de la aplicación de esta metodología (Ilustración 23)

CUESTIONARIO

1. ¿Qué es el cultivo *in vitro* de embriones y cuál es su importancia en el mejoramiento genético de plantas?
2. Describe los dos estados del desarrollo embrionario.
3. Menciona algunas aplicaciones de esta metodología.
4. Investigar la localización de los embriones de maíz y frijol.
5. ¿Cuáles son las partes de una semilla y sus funciones?
6. ¿Cómo se identifica el embrión dentro de la semilla?
7. ¿Por qué es necesario incubar los embriones cultivados al menos una o dos semanas?
8. ¿Qué es un cotiledón y para qué sirve?

Ilustración 23. Cuestionario elaborado para la práctica 7.

PRÁCTICA 8. CORTE ESTILAR

Se diseñó un protocolo de germinación *in vitro* mediante la técnica de corte estilar donde se realizó la fusión entre dos especies de *Lilium*: oriental y asiático (Ilustración 24). Dicha práctica consiste en la colocación el pistilo de la especie oriental en el medio MS y la realización de un corte 2mm arriba del óvulo, para posteriormente saturar con polen de la especie asiática el lugar donde se empleó el corte. Es importante tomar en cuenta la altura de los pistilos, debido a que es la distancia que recorre el polen y de esto depende el tiempo de vida de los granos de polen de cada especie (Ilustración 25).

METODOLOGÍA

Pretratamiento del polen

1. Almacenar el polen recolectado en un desecador con silica gel a una temperatura de 17°C a 20°C.
2. Rehidratar el polen con RH al 100% por 2 horas a 22°C.

Preparación del medio de cultivo

1. Disolver 250mL de agua destilada con medio MS suplementado con 0.1mg/L de BA (bencil adenina) y 0.1mg/L de ANA (ácido naftalenacético).
2. Medir y ajustar el pH a 5.8
3. Agregar 7g/L de agar y calentar hasta llegar al punto de ebullición para disolver completamente el agar.
4. Dejar enfriar el medio y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
5. Verter el medio en cajas Petri.

Polinización por corte estilar.

1. Colocar el pistilo en las cajas Petri con medio y realizar un corte al pistilo 2mm por encima del ovario.
2. Saturar con polen el exudado que se formó en el corte del pistilo.

Ilustración 24. Técnica de corte estilar.



Figura 20. *Pretratamiento de polen*

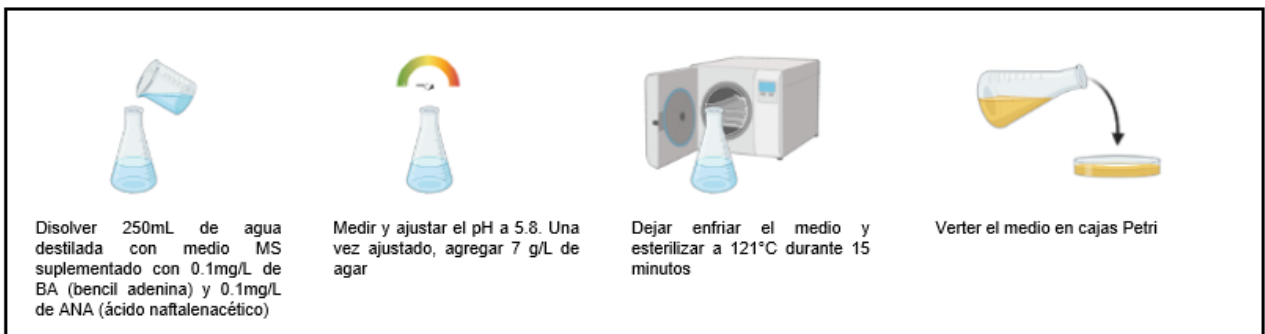


Figura 21. *Preparación del medio de cultivo*



Figura 22. *Polinización de corte estilar.*

Ilustración 25. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de corte estilar.

Como se puede observar en la Ilustración 26, el cuestionario diseñado para la práctica 8 cuenta con diversas preguntas, entre las cuáles, las más relevantes fueron ¿En qué consiste el corte estilar?, ¿Cuál es la función de la silica en gel? y ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del cruzamiento de especies?, ya que estas preguntas introducen al lector a la práctica de manera más significativa. Por otro lado, es necesario conocer la altura de los pistilos de ambas

especies ya que este dato es esencial para la realización de la práctica, por lo cual, se incluyó como parte de las preguntas de investigación para anticipar posibles limitaciones en la práctica.

CUESTIONARIO

1. ¿Cuál es la definición de polinización?
2. Dibuja e identifica las partes de una flor
3. ¿Qué es la hibridación en plantas?
4. Menciona los tipos de hibridación vegetal que existen
5. ¿Cuáles son las ventajas y desventajas del cruzamiento de especies?
6. ¿Qué importancia tienen los reguladores de crecimiento en los cultivos vegetales?
7. ¿Cuál es la función del bencil adenina y ácido naftalenacético?
8. Investiga la altura (cm) del pistilo de dos especies de *Lilium*: oriental y asiática.
9. ¿En qué consiste el corte estilar?
10. ¿Qué función o de qué manera actúa el silica gel en el polen?

Ilustración 26. Cuestionario elaborado para la práctica 8.

PRÁCTICA 9. FERTILIZACIÓN IN VITRO

El objetivo de la práctica es conocer la importancia del método de fertilización *in vitro* para el estudio de la interacción e hibridación de gametos, esto surge por el reciente interés de estudiar la compatibilidad de los cultivos de plantas en el polen o desde los óvulos. La práctica de fertilización *in vitro* consiste en el pretratamiento de polen y óvulos del fruto de agave (*Agave sp.*) para después sembrarlas en medio MS dividiendo la caja Petri en dos, de manera que el polen sea colocado de lado izquierdo y en el derecho se inserten los óvulos del agave. Como último paso, se mantiene el cultivo en un espacio oscuro durante dos días, con el fin de lograr la fertilización, simulando el ambiente en el que generalmente se encuentran los óvulos (Ilustración 27 y 28). De igual manera para la práctica 9 se realizó un cuestionario sobre la fertilización *in vitro* y su fundamento (Ilustración 29).

METODOLOGÍA

Pretratamiento del polen

1. Almacenar el polen recolectado de agave en un desecador con sílica gel a una temperatura de 17°C a 20°C.
2. Rehidratar el polen con RH al 100% por 2 horas a 22°C.

Pretratamiento de óvulos

1. Recolectar los frutos de agave verdes y tomar las semillas blancas (óvulos) que se sitúan en el interior de éste.
2. Desinfectar las semillas aplicando etanol al 70% (v/v) durante 3 minutos y después realizar enjuagues con agua destilada.
3. Sumergir en hipoclorito de sodio las semillas durante 10 minutos y posteriormente realizar nuevamente enjuagues con agua destilada.

Preparación del medio de cultivo

1. Disolver 250mL de agua destilada con medio MS suplementado con 0.1mg/L de BA (bencil adenina) y 0.1mg/L de ANA (ácido naftalenacético).
2. Medir y ajustar el pH a 5.8
3. Agregar 7g/L de agar y calentar hasta llegar al punto de ebullición para disolver completamente el agar.
4. Dejar enfriar el medio y esterilizar a 121°C durante 15 minutos.
5. Verter el medio en cajas Petri.

Fertilización in vitro

1. Dividir el área de una caja Petri en dos partes y colocar de lado izquierdo el polen anteriormente recolectado dentro de la campana de flujo laminar.
2. Situar los óvulos en el lado derecho de la caja Petri en condiciones estériles.
3. Mantener los cultivos en oscuridad durante 2 días.

Ilustración 27. Protocolo para la fertilización *in vitro* de *Agave sp.*

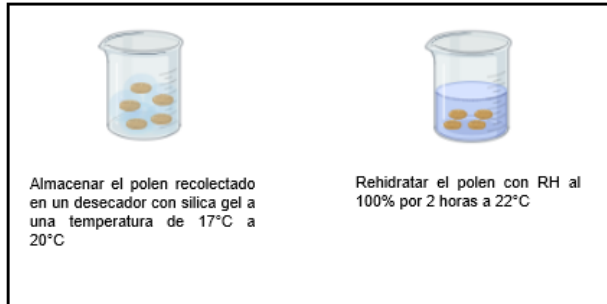


Figura 23. *Pretratamiento de polen*

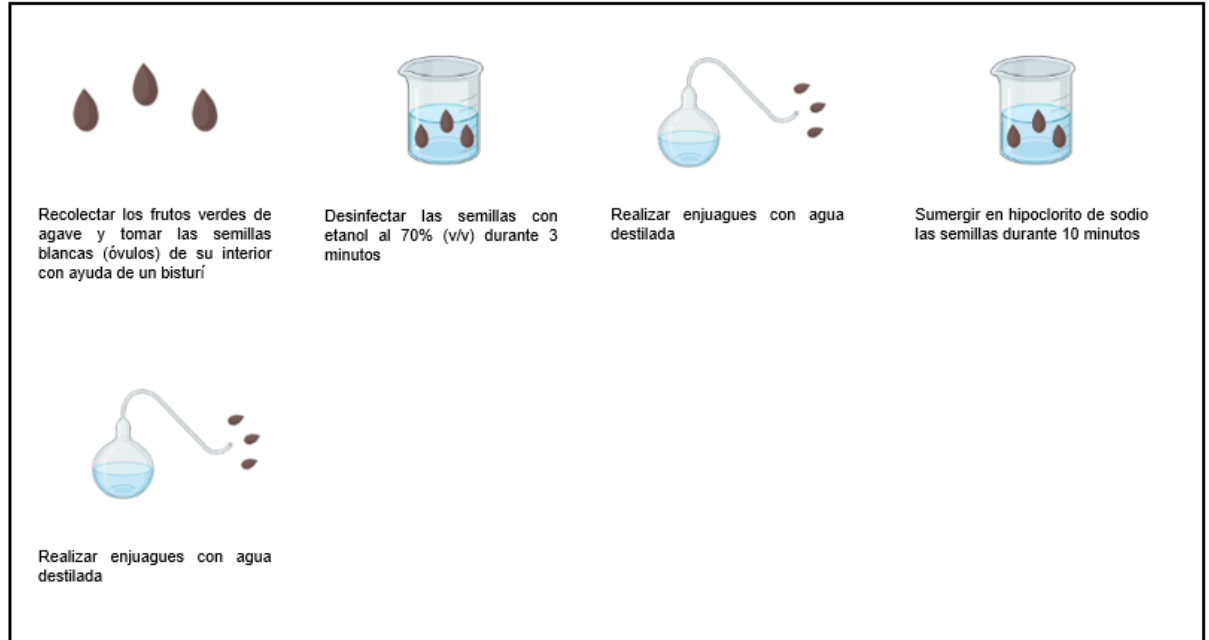


Figura 24. *Pretratamiento de óvulos*

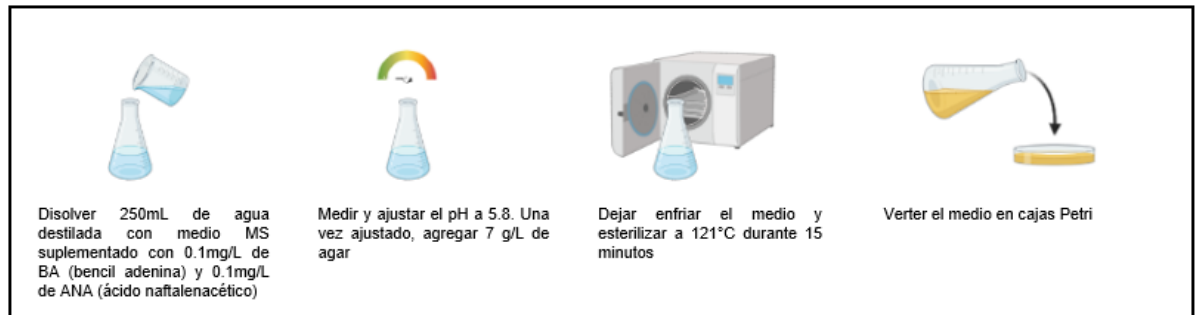


Figura 25. Preparación del medio de cultivo

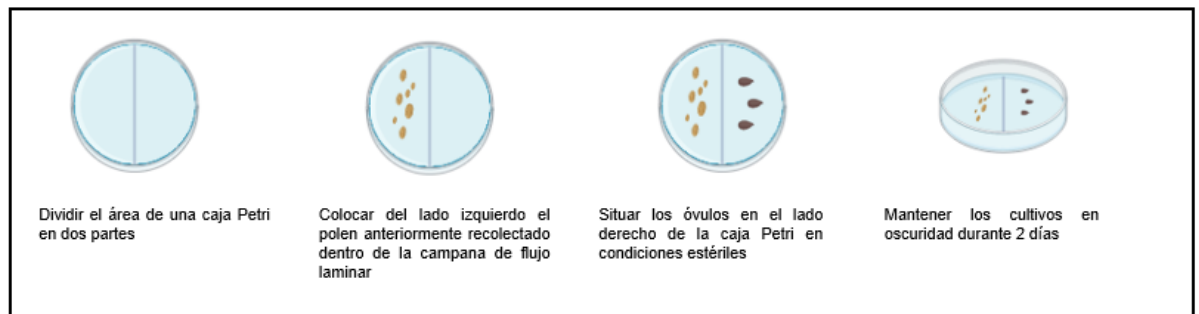


Figura 26. Fertilización *in vitro*

Ilustración 28. Diagramas de flujo de la metodología diseñada para la realización de fertilización *in vitro*.

CUESTIONARIO

1. ¿De qué manera se lleva a cabo la fertilización en plantas? Explica.
2. ¿Qué es la fertilización *in vitro* y qué importancia tiene en las plantas?
3. Investiga e ilustra las partes de una flor
4. ¿En qué parte de las plantas se encuentran los óvulos?

Ilustración 29. Cuestionario elaborado para la práctica 9.

1.6. Valoración de productos, resultados e impactos

En principio, se logró el objetivo de fomentar la relación entre estudiantes del ITESO e investigadores de manera satisfactoria donde ambas partes obtuvieron beneficios. Por parte del alumno, se logró adquirir información y habilidades acerca del mejoramiento genético, así como conocimientos de micropropagación, evaluación de cultivos, búsqueda de información especializada y diseño de experimentos, que le proporcionan un gran avance para su desarrollo profesional.

El objetivo principal de este proyecto fue la elaboración de un manual de prácticas de laboratorio, el cual fue logrado de manera exitosa. En dicho documento se presentan diferentes técnicas de mejoramiento genético explicadas de manera detallada, donde se tomaron en cuenta los recursos y equipos con los que el ITESO y el CIATEJ cuentan. Esto, debido a que se pretende adecuar un curso de mejoramiento genético vegetal orientado para el público en general, con el objetivo de aumentar el interés por la ciencia y la investigación.

El manual de prácticas diseñado cuenta actualmente con nueve prácticas, sin embargo, este queda abierto a la posibilidad de añadir más contenido y nuevas tecnologías que puedan enriquecerlo. Mediante este proyecto de aplicación profesional se proporcionan las bases del mejoramiento genético en plantas, de manera que puedan construirse diferentes conocimientos, tanto teóricos como experimentales.

A causa de la situación actual de la pandemia de COVID 19 no fue posible asistir a CIATEJ de manera presencial por lo que no se logró llevar a cabo las prácticas previamente desarrolladas para comprobar la metodología de cada una. Se propone que se realicen otros PAP con los investigadores de CIATEJ para tener la certeza de que la metodología investigada sea la óptima. Solo se adicionó una práctica nueva al manual debido a que los investigadores decidieron que no era necesario agregar más prácticas.

Se diseñaron diagramas de flujo que lograran proporcionar un apoyo visual a los usuarios, así como también se realizó un cuestionario para cada práctica con el fin de impulsar la revisión bibliográfica e investigación científica de los diferentes temas desarrollados en el manual y que de esa manera sea sencillo comprender el objetivo de cada práctica.

1.7. Bibliografía y otros recursos

[1] Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Historia del mejoramiento genético vegetal [En línea] 2022 [Citado: 04 03, 2022] <https://www.argenbio.org/recursos/45-campanas/12531-historia-del-mejoramiento-vegetal>

[2] CONACYT. Fitomejoramiento participativo [En línea] 2018 [Citado: 05 09, 2021]
https://www.conacyt.gov.py/sites/default/files/upload_editores/u454/Manual-Fitomejoramiento.pdf

[3] J Rodríguez. Caracterización citogenética de geofitas mexicanas con potencial ornamental. Jalisco: Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, 2016.

[4] Centro de Estudios para el Desarrollo Rural Sustentable y la Soberanía Alimentaria. Reporte de la situación del sector agropecuario en México. [En línea] 2020 [Citado: 07 09, 2021]
http://www.cedrssa.gob.mx/files/b/13/22Situacion_Sector_Agropecuario_Me%CC%81xico.pdf

[5] Beraldo dos Santos Silva, Danielly, Endres da Silva, Lara, do Amaral Crispim, Bruno, Oliveira Vaini, Jussara, Barufatti Grisolia, Alexéia, & Pires de Oliveira, Kelly Mari. (2012). Biotecnología aplicada a la alimentación y salud humana. Revista chilena de nutrición, 39(3), 94-98. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-75182012000300014>

[6] Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Capital natural de México. [En línea] 2017 [Citado: 07 09, 2021]
https://www.biodiversidad.gob.mx/pais/pdf/CapNatMex/Sintesis_CNM_2017.pdf

[7] SEMARNAT. Diversidad Genética. [En línea] 2018 [Citado: 07 09, 2021]
http://dgeiawf.semarnat.gob.mx:8080/ibi_apps/WFServlet?IBIF_ex=D3_R_BIODIV05_01&IBIC_user=dgeia_mce&IBIC_pass=dgeia_mce

[8] CIATEJ. Biotecnología Vegetal. Jalisco: Gobierno de México. [En línea] 2021 [Citado: 07 09, 2021] <https://www.ciatej.mx/investigacion/biotecnologia-vegetal>

[9] CIATEJ. Ciencia y Tecnología para el Desarrollo Sostenible. Jalisco: Gobierno de México. [En línea] 2022 [Citado: 03, 03, 2022] <https://ciatej.mx/el-ciatej/quienes-somos>

1.8. Anexos generales

2. Productos

Nombre y código del PAP	Programa de Apoyo a Centros de Investigación Externos II 4G03
Nombre del proyecto	Manual de Prácticas de Laboratorio de Herramientas Biotecnológicas para el Mejoramiento Genético en Plantas
Descripción (qué es, para quién se realizó y para qué es):	Manual de prácticas de laboratorio con herramientas biotecnológicas para el mejoramiento genético de diversas especies de plantas realizado en colaboración con CIATEJ para el público en general ya que busca implementar las prácticas diseñadas en futuros cursos.
Autores:	Vanessa Izquierdo Zepeda Andrea Castillo Ibarra

3. Reflexión crítica y ética de la experiencia

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

3.1 Sensibilización ante las realidades

Andrea Castillo Ibarra

Desde un punto ético profesional el trabajar con un centro de investigación externo que en este caso fue CIATEJ es importante mantener la confidencialidad sobre los temas de investigación que se desarrollan y como están siendo desarrollados, es importante el no compartir información a figuras externas para que se mantenga entre investigadores y nosotros los auxiliares hasta su publicación. Otro punto ético es la responsabilidad que adquieres al difundir información, se debe tener la certeza de que sea verídico y fiable debido a que es posible que se comparta con cientos de investigadores y se lleven a cabo las metodologías por lo que se debe alertar si hay un riesgo de salud o de infraestructura para que su proceso no se vea afectado.

Vanessa Izquierdo Zepeda

A partir de la experiencia adquirida en este proyecto apoyando a un centro de investigación pude conocer la dinámica con la que se trabaja en el CIATEJ y la importancia de la confidencialidad en este tipo de instituciones, al tratarse con investigaciones y proyectos que cuentan con valiosa información. Por otro lado, se diseñó una sección de medidas de seguridad en el manual, con el fin de ser responsables con los usuarios que decidan replicar las prácticas, es decir, se pensó en evitar cualquier tipo de accidente y prevenir a las personas interesadas en el manual, generando un ambiente seguro para todos.

3.2 Aprendizajes logrados

Andrea Castillo Ibarra

Al tomar participación en el presente proyecto logré reforzar y adquirir nuevos conocimientos y habilidades. Como primer punto, reforcé los aprendizajes obtenidos del curso de Tejidos y Células Vegetales retomando desde las partes de una planta hasta los medios o suplementos necesarios para lograr el crecimiento de una planta, de igual manera retomé el estudiar las diferentes técnicas que existen para el mejoramiento genético de plantas redactadas en el manual. El llevar a cabo la redacción y el diseño de un manual para prácticas de laboratorio me permitió desarrollar y mejorar mis habilidades en el área de revisión bibliográfica, buscar información de fuentes fiables y seguras como fue de diversos libros y artículos. Conforme se realizaba la investigación sobre las técnicas se volvieron a estudiar técnicas de laboratorio antes vistas y también se adquirió conocimiento de nuevas metodologías ya implementadas en el área de cultivos vegetales, pero en cursos pasados de ITESO no se han incluido aún. El realizar el diseño de los diagramas de flujo me ayudo a fortalecer las habilidades de síntesis de información y orden.

A nivel universitario fue un reto el llevar a cabo un PAP debido a que es cuando en realidad se ponen a prueba todos tus conocimientos y habilidades desarrolladas a lo largo de la carrera. Gracias al PAP logré reforzar mis aptitudes y destrezas como estudiante y a comprender como funciona trabajar de la mano de personas externas a la institución que en este caso fue con investigadores de CIATEJ; observar y aprender como es el proceso de diseño y publicación de artículos o material para la difusión de información y todo esto llevándose a cabo con apoyo de los conocimientos y medios proporcionados por nuestro profesor a cargo.

El diseñar un manual de prácticas con todos sus componentes que son: medidas de seguridad, una breve explicación sobre la práctica a modo de introducción, la metodología desarrollada de forma escrita y en diagrama de flujo y por último un cuestionario por cada práctica, me hizo comprender que todos los componentes son muy importantes, debido a que es importante comprender el objetivo de la práctica y cuál es la manera más segura para realizar la práctica. El entender todo esto a manera personal y profesional me hace ser consciente de que en un futuro laboral sea en laboratorio o en algún tema administrativo debo tener una

buena organización, responsabilidad, disposición de estar adquiriendo conocimientos constantemente y tener una buena comunicación con mi equipo de trabajo.

Desde un punto social es un proyecto muy ambicioso debido a que se busca despertar el interés del público en general, ya sean investigadores, estudiantes de ingeniería de biotecnología en cultivos vegetales o incluso personas ajenas a esta área de investigación incentivándolos a investigar sobre el tema y observar que hay una gran área de oportunidad en el desarrollo de plantas como el crear o diseñar una planta con valor nutricional agregado o modificar alguna planta para obtener resistencia al estrés hídrico, salino, de temperatura, entre otros. Todas estas modificaciones repercuten de forma positiva para la industria agrícola. El desarrollo de material donde nos explican las modificaciones genéticas que se pueden realizar es un avance para que la sociedad que tenga de alguna manera satanizada los alimentos o productos modificados genéticamente sea capaz de comprender como suceden estas modificaciones y por qué no son un peligro si son utilizadas de la manera correcta.

Vanessa Izquierdo Zepeda

Durante la realización de este proyecto de aplicación profesional pude reconocer mi desempeño y completar los desafíos presentes en el trabajo en línea, ya que a pesar de las dificultades y las limitaciones se logró completar y enriquecer un manual de mejoramiento genético en plantas que es de gran interés social y económico. Dicho proyecto me permitió conocer y demostrar mi capacidad de redacción, búsqueda de información específica, diseño de protocolos, organización y automotivación.

En primera instancia, logré reforzar mis conocimientos acerca del cultivo de tejidos y células vegetales al analizar nuevamente cada una de las prácticas realizadas durante el semestre pasado, ya que fue necesario comprender las prácticas para realizar los diagramas de flujo y las preguntas basadas en los temas que contenía el manual. Para esto fue necesario, realizar una revisión bibliográfica acerca de los métodos empleados en el mejoramiento genético, las posibles aplicaciones, los medios de cultivo utilizados, los compuestos y el fundamento de emplearlos en las prácticas, así como también aspectos relacionados con la morfología y funcionamiento de las plantas.

A partir de este proyecto, pude reconocer mis conocimientos y habilidades obtenidos a lo largo de todo mi desarrollo académico, ya que no habría logrado todo esto sin antes haber realizado reportes de laboratorio, leído manuales de prácticas, haber cursado materias como cultivos vegetales, microbiología, ingeniería genética, entre otras. Por otra parte, tuve un acercamiento con el diseño de cursos, ya que este proyecto surgió del interés en proponer una materia enfocada en el mejoramiento genético vegetal, con el objetivo de generar conocimientos enriquecedores para los estudiantes del ITESO. Sin embargo, el manual tiene ahora como fin llegar al público en general y producir un interés científico en la sociedad.

La finalización y presentación de este proyecto, nos permitió obtener una retroalimentación de nuestros resultados, lo cual nos ayudó a analizar posibles áreas de mejora en el diseño de manuales. Durante este periodo, se buscó diseñar nuevos apartados como lo son los diagramas de flujo y el cuestionario, que facilitarían la comprensión y entendimiento del manual. Así como también se añadió una sección de medidas de seguridad con el objetivo de generar un espacio seguro al momento de replicar las prácticas del manual. Sin embargo, a partir de las observaciones de nuestros asesores, hay algunas sugerencias innovadoras que podrían enriquecer aún más el manual, siempre con el objetivo de proporcionar al usuario diversas alternativas de apoyo y seguridad tanto personal como de los equipos, reactivos y espacio a utilizar.

Gracias a los conocimientos y habilidades adquiridas, espero algún día trabajar en mi propia línea de investigación, solucionando algún problema social y optimizando los procesos de cultivo y producción de plantas. El Proyecto de Aplicación Profesional me motivó a utilizar mis conocimientos para un bien social, ya que existen diversas problemáticas en el ámbito agrícola que pueden ser solucionadas mediante el uso de herramientas biotecnológicas y estoy segura de que el manual diseñado en colaboración con el CIATEJ es un gran paso para la investigación científica en México y de gran ayuda para los interesados en generar cultivos con características específicas.

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

- Considera las competencias iniciales (conocimientos, habilidades y actitudes), sobre ese escrito indica las competencias nuevas en otro color y las competencias potencializadas al terminar su PAP (en otro color).
- Realiza una síntesis de lo significativo de este análisis.

Andrea Castillo Ibarra

Color verde: competencias iniciales

Color naranja: competencias nuevas

Color azul: competencias potencializadas

Inventario de competencias inicial

Ingeniería en cultivos de células y tejidos vegetales tuvo la oportunidad de retomar los temas teóricos vistos en el curso y la experiencia de llevar a cabo prácticas como la germinación de polen, germinación de semillas, viabilidad de los granos de polen.

Trabajo en equipo organizando y repartiendo tareas/actividades para la realización de un trabajo.

Capacidad de una revisión bibliográfica para investigación y elaboración de reportes, ensayos, entre otros materiales de difusión.

Inventario de competencia final

Comprendí la teoría y fundamentos de las prácticas sin necesidad de llevarlas a cabo.

Logré organizar tiempos, actividades y tareas con mi equipo manteniendo una buena comunicación y coordinación.

Desarrolle la capacidad de entender temas y sintetizar la información logrando que el objetivo siempre fuera claro a través de la redacción y diseño de la metodología de cada práctica con el apoyo de herramientas como Biorender.

Vanessa Izquierdo Zepeda

Color naranja: competencias nuevas

Color azul: competencias potencializadas

Inventario de competencias inicial

El cultivo de células y tejidos vegetales me permitió tener conocimientos acerca de los medios de cultivo utilizados en plantas, así como también información de la estructura y funcionamiento de éstas. Lo cual, fue de gran ayuda para determinar las condiciones óptimas necesarias en las diversas metodologías diseñadas en el manual.

Mis conocimientos enfocados en la ingeniería genética y metabólica generaron en mí una mayor comprensión de los factores y técnicas que pueden afectar la genética de los organismos en general. A partir de esto, pude analizar los diversos métodos que fueron encontrados en la bibliografía y diseñar prácticas innovadoras que produjeran cambios cromosómicos en plantas.

A partir de los conocimientos adquiridos en microbiología, conozco las medidas necesarias para mantener los cultivos libres de contaminación. Esto, me ayudó a diseñar protocolos de esterilidad que evitaran ruido en los resultados de cada práctica.

Las entregas fueron realizadas en tiempo y forma gracias a la adecuada organización y planeación de cada uno de los entregables mostrando la responsabilidad necesaria para cumplir con los objetivos del proyecto. Así como también se logró demostrar la buena comunicación y capacidad de trabajo en equipo al dialogar y dividir las tareas.

Para la adecuada colaboración con el CIATEJ fue necesario la flexibilidad y adaptación a los cambios, ya que surgieron algunos imprevistos y cambios de dinámica. También fue de gran importancia la honestidad y la iniciativa para generar una mejor relación investigador-auxiliar y obtener los resultados esperados.

Inventario de competencia final

La realización de diagramas de flujo a lo largo de la carrera me permitió diseñar protocolos ilustrativos mediante la herramienta de BioRender con el objetivo de generar un apoyo visual para los usuarios del manual.

A partir de la revisión bibliográfica que ayudó a obtener una mayor comprensión de los temas, se elaboraron cuestionarios enfocados en los temas presentados en cada una de las prácticas, lo cual permitirá a los usuarios generar conocimientos previos a la realización de las metodologías incluidas en el manual.

Se logró adquirir conocimientos acerca de diversas técnicas no transgénicas para el mejoramiento genético en plantas mediante la investigación y el diseño de prácticas que permitieron comprender los fundamentos de cada metodología y la importancia de estas en la agricultura, industria, etc.