

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



**ITESO, Universidad
Jesuita de Guadalajara**

PAP 4G03 APOYO A CENTROS DE INVESTIGACION EXTERNOS I
“Mejoramiento genético de cempasúchil” en 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 Nanotecnología. Fabricio Ociel Del Toro De La Cruz.

Profesor PAP: Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez.

Tlaquepaque, Jalisco, Mayo de 2020

ÍNDICE

Contenido

REPORTE PAP	2
Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional	2
Resumen	2
1. Introducción.....	3
1.1. Objetivos	3
1.2. Justificación.....	4
1.3 Antecedentes.....	5
1.4. Contexto	5
2. Desarrollo	7
2.1. Sustento teórico y metodológico	7
2.2. Planeación y seguimiento del proyecto	8
3. Resultados del trabajo profesional.....	22
4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto	25
5. Conclusiones.....	28
6. Bibliografía.....	28

REPORTE PAP

Presentación Institucional de los Proyectos de Aplicación Profesional

Los Proyectos de Aplicación Profesional (PAP) son una modalidad educativa del ITESO en la que el estudiante aplica sus saberes y competencias socio-profesionales para el desarrollo de un proyecto que plantea soluciones a problemas de entornos reales. Su espíritu está dirigido para que el estudiante ejerza su profesión mediante una perspectiva ética y socialmente responsable.

A través de las actividades realizadas en el PAP, se acreditan el servicio social y la opción terminal. Así, en este reporte se documentan las actividades que tuvieron lugar durante el desarrollo del proyecto, sus incidencias en el entorno, y las reflexiones y aprendizajes profesionales que el estudiante desarrolló en el transcurso de su labor.

Resumen

En el siguiente reporte se presentan los resultados obtenidos a partir del uso de la planta de cempasúchil (*Tagetes erecta*) para la obtención de un pigmento amarillo (zeaxantina) y naranja (astaxantina) de origen natural que se pueda usar en diversos alimentos para mejorar su presentación física y hacer los alimentos más atractivos para los consumidores. Para lograr esto, se obtuvo material vegetal a partir de un tipo de planta con una producción de más del 22% de pigmento respecto a las demás plantas de cempasúchil promedio, al cual se le denominó HZ, la cual fue obtenida mediante cruza en campo realizadas en los campos de la empresa, y posteriormente se creó un protocolo de micropropagación para encontrar la concentración ideal de hormonas realizar la proliferación de yemas axilares, con el objetivo de generar clones de dichas plantas, los cuales posteriormente se transfirieron al invernadero para su crecimiento y desarrollo, para finalmente entregarlas a la empresa a fin de que en sus instalaciones se realice la extracción de pigmento para comprobar que la producción del mismo no se modificó con lo que se comprobará que la técnica de micropropagación utilizada efectivamente generó plantas clonadas. Las flores de las plantas

se utilizarán para combinarse con comida para alimentar aves de corral a fin de que la carne de estas se pinte con una tonalidad amarilla, lo cual es más atractivo para el mercado y dado que la tendencia en alimentación va dirigida hacia lo orgánico, esto le dará un valor agregado, pues se eliminarán las tinturas químicas que actualmente se utilizan, las cuales pueden generar daños en la salud de los consumidores.

Por otra parte, también se están realizando experimentos a fin de incrementar la producción de pigmento a través de la poliploidización de las plantas. El primer paso es determinar el nivel de ploidía de las plantas originales y posteriormente realizar tratamientos con arrestadores mitóticos (como colchicina) a fin de incrementar los niveles de ploidía y por lo tanto la producción de pigmentos. La comprobación del nivel de ploidía original, así como después de aplicado el tratamiento se realizará mediante conteos cromosómicos.

En este proyecto se aprendió aparatos especializados como el microscopio de fluorescencia, además de nuevas técnicas y composición de medios para la micropropagación de esta y más plantas.

1. Introducción

1.1. Objetivos

Buscar la promoción y el desarrollo de la investigación científica con el convenio establecido entre la universidad ITESO (Instituto Tecnológico de Estudios Superiores y de Occidente), el CIATEJ (Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C.) y con otros centros de investigación para poder formar a los estudiantes como investigadores, y así tener un desarrollo continuo de la sociedad al resolver los problemas que se tienen en la actualidad mediante la generación de información, experimentación y la obtención de resultados.

Mejorar genéticamente por métodos no transgénicos la planta de cempasúchil para incrementar la cantidad y el uso del pigmento natural que la planta contiene al realizar el

estudio cromosómico de la planta y realizar la microprogación exitosa por el método de proliferación de yemas axilares usando medios de cultivos con hormonas de crecimiento.

Se busca obtener este pigmento de color amarillo y naranja a partir de esta planta debido a que sería uno de los primeros pigmentos de origen vegetal, además que contiene la luteína y su isómero zeaxantina que son carotenoides que previenen la oxidación y la degeneración macular, y pueden usarse como suplementos alimenticios (1).

1.2. Justificación

Este tipo de pigmento obtenido a partir de la flor de cempasúchil es de especial de interés, ya que es a partir de una fuente natural, contiene vitaminas que son necesarias para la buena salud y la obtención de su pigmento no genera residuos contaminantes al ambiente ni a la salud, ya que se considera material orgánico.

Se busca usar este tipo de colorante natural ya que la sociedad está consumiendo más alimentos de origen vegetal. Se cree que los alimentos de origen animal o sintetizados en un laboratorio, tienen un rol en el incremento de cáncer y otras enfermedades metabólicas que se tienen hoy en día. Se busca mejorar genéticamente la planta de cempasúchil para obtener una mayor producción de pigmento por flor, debido a que actualmente hay una gran demanda por ese pigmento y los métodos actuales de obtención a partir de cultivar gran cantidad de plantas, no son rentables.

Entre los beneficiados del proyecto se encuentra la empresa que busca al CIATEJ como una institución para resolver este problema que actualmente se enfrenta, el CIATEJ se beneficia debido a que puede obtener un recurso económico a partir de esta empresa, y que sus investigadores puedan publicar información nueva y especializada, lo que eleva la calidad del centro y la información disponible para la sociedad. El ITESO con sus estudiantes se benefician debido a que le da la oportunidad a sus estudiantes de conocer y aprender el proceso de investigación guiados por una persona con alto grado académico de estudios que pueda enseñar sus conocimientos, y al mismo tiempo, usar materiales y equipo de

laboratorio para continuar con su desarrollo profesional. Al mismo tiempo, el público en general se beneficia al tener mayor disponibilidad de escoger alimentos que contengan ingredientes de origen natural, ya que se eliminarán los tintes que actualmente se utilizan, las cuales son elaboradas por productos químicos que pueden dañar la salud de las personas.

1.3 Antecedentes

Este proyecto se desarrolla en el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, (A.C.) ubicado en el municipio de Zapopan, Jalisco. Este centro está incorporado al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), donde su principal función es mejorar la competitividad del sector agrícola, alimentario, medio ambiente y salud.

El desenvolvimiento de este proyecto se realizó en la unidad de Biotecnología Vegetal en la cual el Dr. José Manuel Rodríguez Domínguez previamente ha realizado estudios relacionados en otras especies de plantas. (2).

Este proyecto inició en Enero 2020, por lo cual es un proyecto nuevo compuesto por 10 integrantes, entre ellos 5 doctores que están a cargo de diferentes procesos del proyecto, y 5 alumnos aproximadamente, con los cuales se trabajara de manera conjunta, haciendo diferentes pasos en el proyecto; liderado por la directora de la unidad de biotecnología vegetal, Dra. Antonia Gutiérrez Mora. El proyecto se centra en el mejoramiento genético de la planta de cempasúchil; primeramente se elaboró el protocolo de micropropagación donde se determinó la concentración más adecuada para la micropropagación de la planta, y posteriormente se realizará el mejoramiento genético por el uso de arrestadores mitóticos como la colchicina para intentar obtener células 4x a partir de 2x y aumentar el tamaño de la planta. Otros 3 investigadores realizarán diferentes métodos de mejoramiento genético para obtener métodos alternativos y esperar respuestas diferentes

1.4. Contexto

La micropropagación *in vitro* es una tecnología reciente que consiste en el cultivo de órganos o partes de la planta en condiciones asépticas, a través de diversas técnicas

derivadas de distintas concentraciones de hormonas vegetales como lo es la embriogénesis directa e indirecta, la organogénesis que consiste en crecimiento de hojas y tallos (caulogénesis) o el crecimiento de raíces (rizogénesis), además de la proliferación de yemas axilares. Esta última representa un método para obtener plantas genéticamente iguales o con muy poca variación genética, además que presenta una fuente de obtención de plantas muy rápida, ya que, en la mayoría de las plantas, a partir de temas preexistentes, se obtienen dos tallos genéticamente iguales que pueden usarse para generar una gran cantidad de plantas en un periodo muy corto de tiempo. Esta técnica permite tener plantas genéticamente iguales; se le puede aplicar biotecnología vegetal como lo es el mejoramiento genético de las plantas, con el fin de obtener una característica de interés que se busca, ya sea mayor producción de frutos en un determinado tiempo o la búsqueda de nuevos colores en las flores.

Se pretende obtener una mayor producción de pigmento en las flores de cempasúchil para alimentar a los pollos con estas flores con mayor concentración de estos carotenoides con la finalidad de dar al pollo un color amarillo que sea más atractivo para los consumidores, a la vez que sea más nutritivo en comparación con los otros pollos de piel blanca alimentados con soya, debido a que se ha demostrado que el pollo de este color es más consumido por los compradores.

Actualmente una tendencia económica es a un mayor consumo de alimentos de origen natural, especialmente los orgánicos, ya que las personas que compran estos productos, creen que la alimentación es la fuente más importante de salud y bienestar mental, porque estos alimentos le dan la sensación de seguridad y confort (3), debido a que logran ser cultivados de una manera más sustentable, que no genere residuos o contaminación al medio ambiente, que no se usen pesticidas y herbicidas que puedan perjudicar la salud de los consumidores (4) y al medio ambiente; por lo que el aumento de producción de este pigmento será uno de los más usados debido a su fuente natural que sustituirá a los colorantes sintéticos de color amarillo y naranja.

En México, la rama de la biotecnología está enfocada principalmente a la biotecnología roja que busca resolver los problemas de la salud que se dan con la vejez, la aparición de las

enfermedades sistemáticas como lo es la diabetes, y otras. Sin embargo, México cuenta con un gran potencial de crecimiento en comparación con los demás países de la OCDE ya que el país contiene una gran cantidad de climas y biodiversidad, mano de obra capacitada con precios sumamente competitivos, y tratados de libre comercio con 45 países. Tan solo en 2013, los costos de investigación y desarrollo, pruebas clínicas, pruebas de producto y fabricación de productos farmacéuticos resultaron ser 30% más baratos en comparación con los costos que tuvo Estados Unidos.

Tan solo en el año 2013 el gasto federal en ciencia y tecnología fue de 4510 millones de dólares, lo que representó un 0.39% del PIB de ese año.

Jalisco es una de las principales regiones en donde se desarrolla la investigación y el desarrollo de la biotecnología, en donde destacan instituciones como el Centro Universitario de Ciencias Biológicas y Agropecuarias en la Universidad de Guadalajara (CUCBA, UdeG) y el Centro de Investigación y Asistencia en Tecnología y Diseño del Estado de Jalisco, A.C. (CIATEJ, A.C.); donde el principal objetivo es aumentar la competitividad de las compañías farmacéuticas y biomédicas en el estado, así como promover el desarrollo de nuevas empresas de biotecnología (5).

2. Desarrollo

2.1. Sustento teórico y metodológico

A lo largo de la historia se han utilizado a las plantas como la principal fuente de alimento que tenemos, constantemente se han desarrollado nuevas técnicas para obtener mayor producción de alimento o materia prima para textiles, esto debido al mejoramiento genético que podemos aplicar a ellas; esto es una de las principales actividades que se pueden hacer con la biotecnología vegetal. Sin embargo, para hacer el mejoramiento genético se deben de conocer los aspectos citogenéticos de la especie, que es el estudio de la estructura, función y comportamiento de los cromosomas, donde un aspecto citogenético es el número cromosómico. El número cromosómico se refiere al número de cromosomas que tienen las plantas.

Para poder determinar este número se debe de hacer una serie de preparaciones sobre la planta, que consiste en la recolección del espécimen, su tratamiento previo, la fijación y su tinción para poder ser observadas en el microscopio óptico y poder ver las características que los cromosomas presentan. El conteo de los cromosomas es de especial importancia para hacer el mejoramiento genético de la planta, ya que uno de los métodos para hacer el mejoramiento es aumentar o disminuir los niveles de ploidía de la planta a fin de tener plantas con mayor biomasa (flores, hojas y frutos más grandes) o bien aislar genes recesivos de importancia económica, respectivamente, por lo cual es de suma importancia conocer el nivel de ploidía de la planta original. (6)

2.2. Planeación y seguimiento del proyecto

- Descripción del proyecto

Para llevar a cabo el conteo cromosómico, se debe de realizar una serie de técnicas, en las cuales se incluye observar las fases de la mitosis, específicamente en la metafase, ya que los cromosomas se encuentran condensados lo que hace más fácil su visualización y su conteo, además, hacer que las células pierdan su pared celular y su citoplasma, de manera que los cromosomas se dispersen, facilitando su conteo.

En la preparación de los cromosomas primeramente se debe de cortar 1 centímetro de la punta de la raíz de la planta y se deben de colocar en un envase, preferiblemente un tubo eppendorf de 1.5 mililitros, con una solución de 0.1% α -bromonaftaleno por 48 horas a 4° C (grados centígrados) (1000:1, agua destilada: α -bromonaftaleno), esto con la finalidad de detener la activa división celular en el tejido. Posteriormente se deben trasladar a una solución Carnoy (3:1, etanol: ácido acético) por 24 horas a 4° C para la fijación de las células, que consiste en dejar a las células en una sola etapa de división celular sin ocasionar distorsión, hinchazón o encogimiento en la célula. Posteriormente se debe de cortar el meristemo de la raíz, la punta donde se da la mayor división celular, con la ayuda de pinzas y bisturí y un estereoscopio, y ser colocadas en una solución de buffer de citrato de sodio 10

milimolar con un pH de 4.5 durante 10 minutos, drenarse y se colocarse en 50 microlitros de mezcla enzimática conteniendo 0.2% w/v (peso/volumen) de pectinasa Y23, 0.2% w/v de celulasa RS y 0.2% w/v de citohelicasa en solución con 10 milimolar de buffer de citrato de sodio a un pH de 4.5 por 2 horas a 37° C en una cámara húmeda. Al finalizar este paso, se debe utilizar un agitador de tubos vortex para tener una suspensión celular uniforme, agregar 600 microlitros de agua destilada y ser centrifugados a 10,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 45 segundos, desechar el sobrenadante y resuspender en 600 microlitros de metanol, centrifugarse a 11,000 rpm por 30 segundos, desechar el sobrenadante y ser almacenados en 100 microlitros de metanol a 4° C.

En la preparación de las láminas a utilizar en microscopio, la técnica que se usará fue el steamdrop modificado(7), que consiste en colocar un portaobjetos en una solución de etanol al 96%, ser limpiada y transferida a una solución del 100% de ácido acético. Sacar el portaobjetos de la solución y colocarlo en un ángulo de 45 grados y rápidamente colocar 7 microlitros de la solución celular con 2 gotas de ácido acético. Inmediatamente exponer la lámina boca abajo a los vapores de un baño maría que está a 55° C durante 10 segundos y dejar secar la lámina boca arriba hasta que esté completamente seca, posteriormente colocar 7 microlitros de acetorceína, el pigmento rojo que se une al material genético de los cromosomas, colocar el cubreobjetos y ser analizadas en un microscopio óptico.

Para realizar el conteo cromosómico, se utilizará un microscopio de fluorescencia Leica DMRA2 (Leica Microsystems, Germany) acoplado a una Cámara Evolution QEI (Media-Cybernetics), y analizando las imágenes con el software Image-Pro (Media-Cybernetics). Las células que presenten las mejores metafases serán fotografiadas para su conteo cromosómico. La figura 1 muestra el microscopio de fluorescencia utilizado.

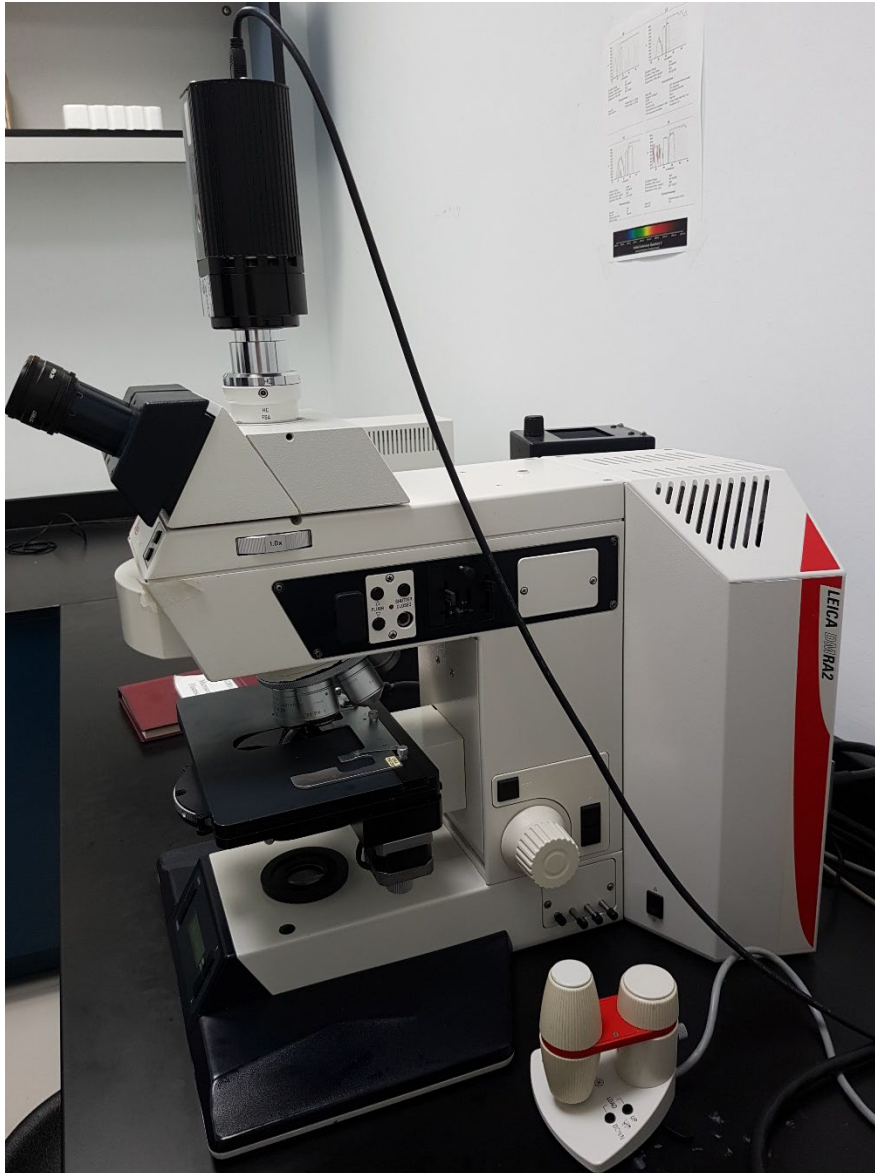


Figura 1. Microscopio de fluorescencia utilizado, usado como microscopio óptico.
Fuente: CIATEJ.

El principio físico en que se basa el microscopio es en el uso de una serie de lentes que permiten ampliar la muestra para observar estructuras que no son visibles a simple vista. Se divide en 2 partes, el sistema de soporte y el sistema óptico.

El sistema óptico consiste en un conjunto de lentes denominados ocular, objetivo y condensador. Las primeras 2 se alojan al extremo del tubo de un microscopio y es lo que producen un aumento sobre la imagen. Entre sus partes se encuentran:

-Condensador: Es el conjunto de lentes que se encuentran entre la fuente de luz y la muestra. Recogen los rayos de la fuente de luz y los concentra en la muestra. Tiene un diafragma tipo iris que permite ajustar la cantidad de luz que llega a la muestra y modifica el contraste sobre la muestra.

-Objetivos: Es la parte del microscopio que da la principal magnificación sobre la muestra, se compone de varios aumentos que pueden ser de 10x (ampliar la imagen 10 veces), 20x, 40x, 100x, etc.

-Ocular: Es el lente por donde el observador ve, puede tener un aumento más pequeño, generalmente de 10x.

El sistema de soporte son los elementos que presentan apoyo fijo, sostienen y mueven a la muestra en las coordenadas X, Y, y Z. Contiene el resto de los elementos del microscopio. Está conformado por:

-Base: Es donde se encuentra la fuente de luz que puede ser incandescente o halógena, puede contener un reóstato para variar la intensidad de luz que pasa.

-Brazo: Soporta el sistema óptico, donde este contiene al cabezal portaoculares que puede ser mono o binocular, revólver con los objetivos, un mecanismo de anclaje como lo es la platina, y la distancia vertical controlada por tornillos macrométricos y micrométricos.

-Platina: Es la pieza en donde se coloca la muestra, puede contener una pinza que sostiene a la muestra en su lugar.

-Revólver: Sostiene a los objetivos y permite girarse para cambiar de objetivo.

-Tornillo macrométrico y micrométrico: Controlan la distancia vertical de la muestra, o eje Z, el macrométrico sirve para enfocar la muestra en el plano correcto y el micrométrico sirve para enfocar los detalles de esta. (8)

La Figura 2 presenta el diagrama de las partes del microscopio de fluorescencia utilizado.

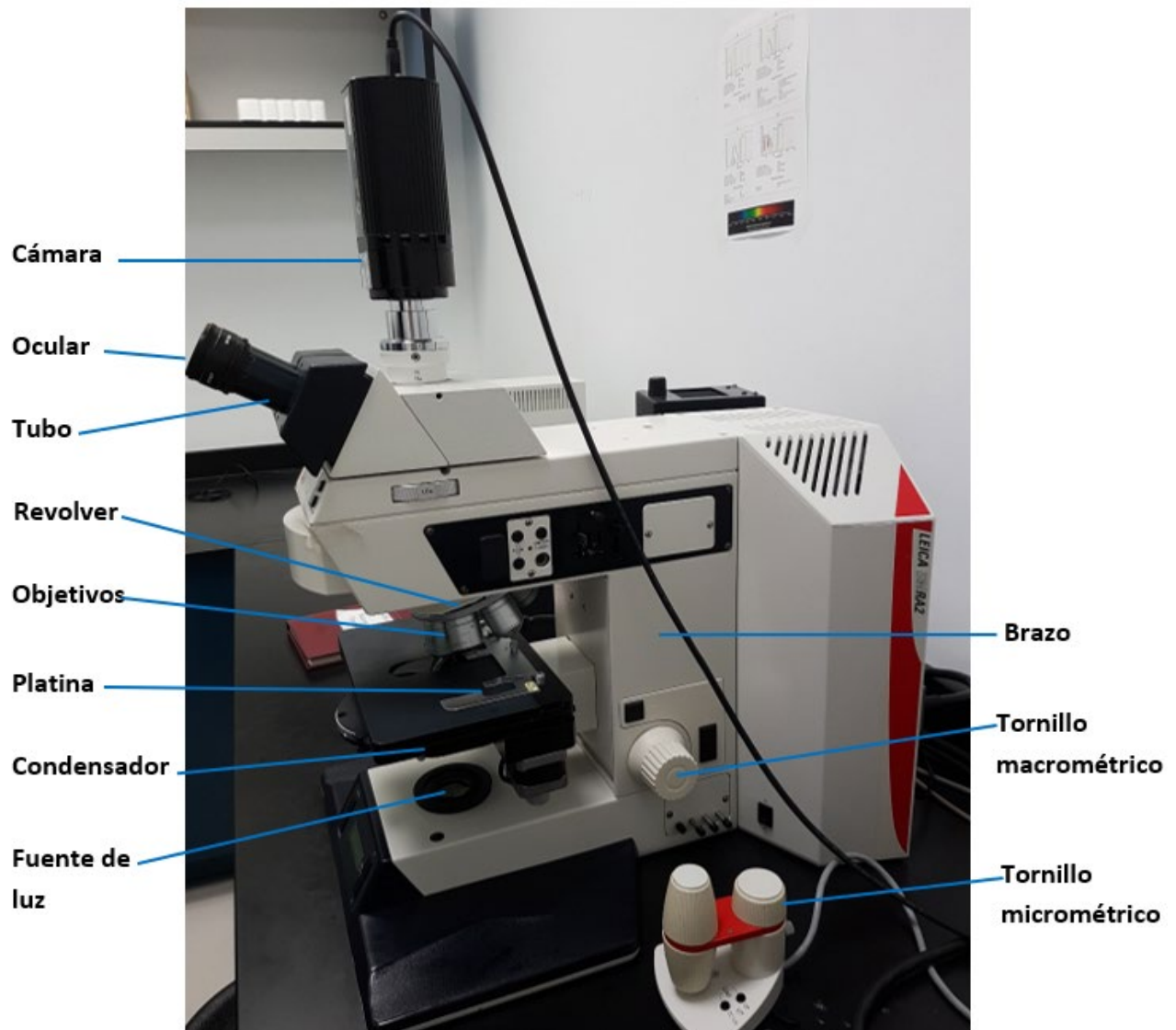


Figura 2. Partes del microscopio de fluorescencia. Fuente: Elaboración propia.

- Plan de trabajo

La Tabla 1 se presenta el plan de trabajo utilizado para el desarrollo del proyecto, en el cronograma se muestran las actividades realizadas, los recursos y el tiempo necesario en las primeras 8 semanas de trabajo realizado en el centro de investigación.

El tiempo consiste en 4 días de 4 horas durante 8 semanas

Tabla 1. Cronograma de actividades realizadas de la semana 1 a la 8.

Actividades	Recursos utilizados	Duración (horas)	Semana							
			1	2	3	4	5	6	7	8
Preparación de medio de cultivo										
Medio para establecimiento	LAB	4	■							
Medio para germinación de semillas	LAB	4				■				
Medio para enraizamiento	LAB	4								■
Medio para proliferación de yemas	LAB	4								■
Siembra										
Siembra de semillas	CF	4				■				
Siembra en medio de p. de yemas	CF	4								■
Siembra para enraizamiento	CF	4								■
Tratamiento de raíces										
Recolección de raíces	PI, LAB, INV	2	■		■		■		■	
Colocación en sol. (solución) α -bromonaftaleno	LAB	2	■	■	■	■	■	■	■	■
Colocación en sol. carnoy	LAB	1		■		■		■		■
Colocación en sol. citrato, enzimática y metanol	LAB	4		■		■		■		■
Preparación de la muestra										
Preparación de las muestras para microscopio	CE, LAB	1		■		■		■		■
Análisis en microscopio										
Análisis en microscopio de las muestras	M	3		■	■	■	■	■	■	■

Tabla 2. Simbología de los recursos utilizados.

Código del recurso	Descripción
INV	Invernadero exterior.
LAB	Se incluyen reactivos, balanzas, potenciómetro, refrigeradores, autoclaves, microondas, placas calentadoras, micropipetas, vórtex, centrífuga y otros materiales para preparar soluciones.
CF	Campanas de flujo laminar.
M	Microscopio de fluorescencia.
CE	Campana de extracción.
PI	Plantas <i>in vitro</i> utilizadas.

- Desarrollo de propuesta de mejora

En esta sección se presenta evidencia del trabajo realizado en las primeras 8 semanas, el trabajo se basó en lo descrito en el “Desarrollo del proyecto”.

Las primeras muestras se obtuvieron de una planta de cempasúchil llamada “HZ”, esta planta presenta una alta producción de pigmento en comparación con las demás plantas de cempasúchil de la misma especie. Se cortaron las raíces y se colocaron en 5 tubos Eppendorf con la solución de α -bromonaftaleno al 0.1% y se continuaron con los pasos descritos en la sección de “Descripción del proyecto”.

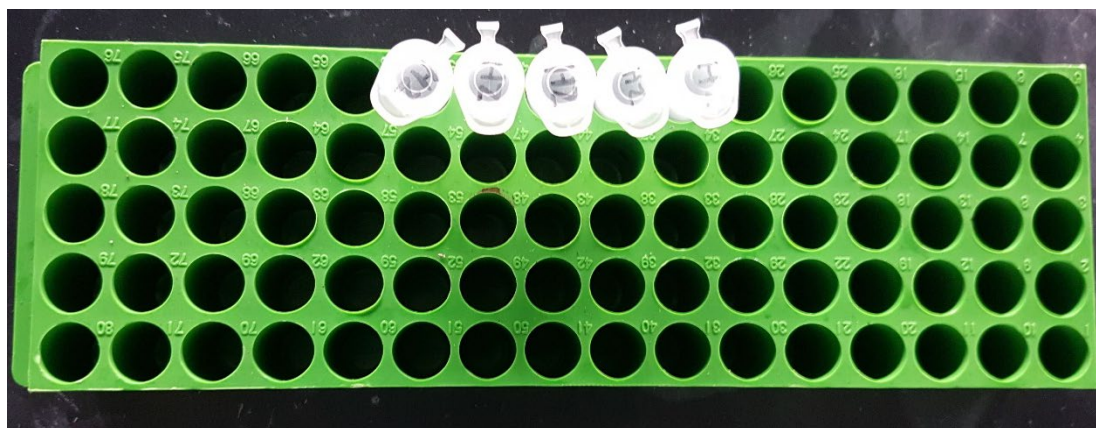


Figura 3. Muestras recolectadas a partir de la planta de HZ.

En la figura 3 se presentan las 5 muestras que fueron preparadas a partir de la primera toma de raíces. Estas raíces se dividieron en 5 tubos con la finalidad de encontrar células que puedan presentar diferentes pares de cromosomas entre ellas. Después, se siguió con la suspensión de las raíces en soluciones previamente explicadas y se almacenaron a 4 grados centígrados con la finalidad de continuar con el proceso de preparación de la muestra.

Después de ser tratadas con solución Carnoy por 24 horas, se debe de cortar el meristemo de la raíz, por lo que un estereoscopio debe de ser utilizado, ya que el

meristemo es muy pequeño, y si se realiza bien, es más fácil encontrar células con cromosomas condensados. En la figura 4 se muestra el proceso de cortado, donde se toman las raíces y se colocan bajo el estereoscopio, donde se busca cortar la parte más blanca de la punta de la raíz, lo que corresponde al meristemo.



Figura 4. Muestras recolectadas a partir de la planta de HZ.

Posteriormente en la figura 5, se muestra el proceso de preparación de la laminilla para ser usada en el microscopio de fluorescencia. En esa figura se pueden ver los diferentes reactivos utilizados como lo fue el ácido acético y el etanol, además de otro equipo especializado como lo son las micropipetas, cubreobjetos y portaobjetos.

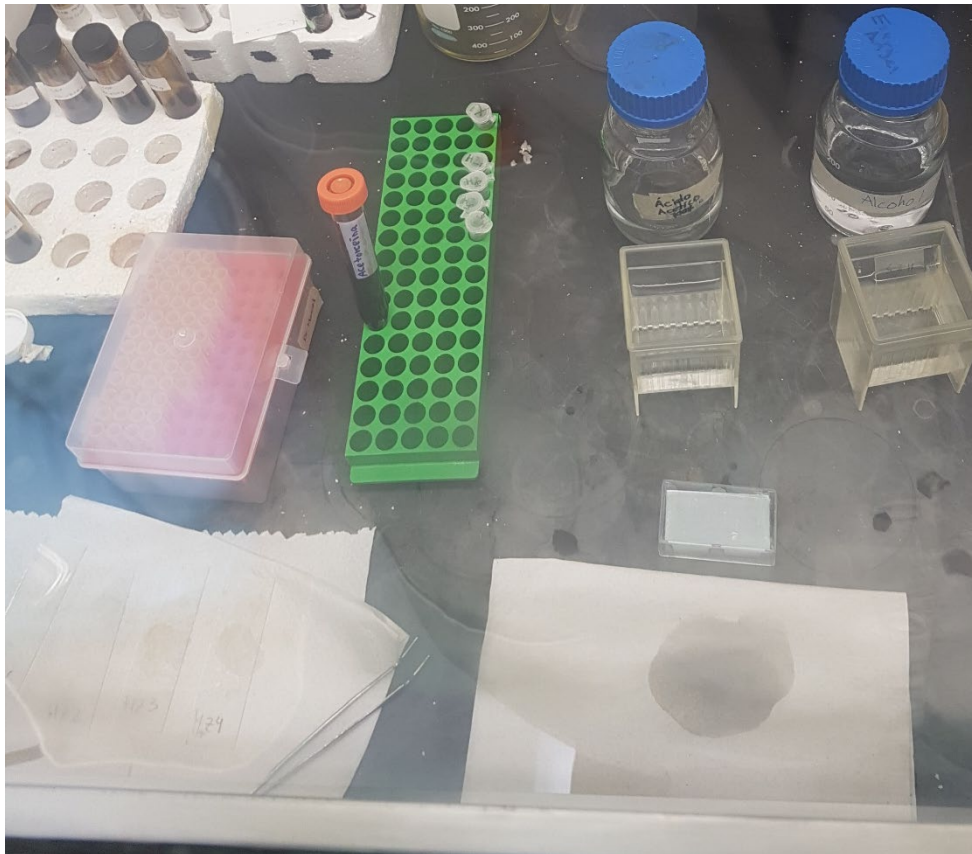


Figura 5. Preparación de las muestras para su búsqueda en el microscopio a partir de la solución de células en suspensión.

Al tener la muestra preparada, se realizó su examinación en el microscopio de fluorescencia, donde se buscó por varias horas las mejores células que estuvieran en metafase, con los cromosomas condensados y bien separados, a partir de esto, se obtuvieron las primeras fotos que se muestran en la figura 6, donde corresponden a la preparación 2.

Figura 6. Selección de las mejores células que presentaban cromosomas condensados a partir de 37 fotografías tomadas, cromosomas caracterizados por los pequeños círculos más opacos en las imágenes, fotografías tomadas con el objetivo a 100x con aceite de inmersión.

Obteniendo estos primeros resultados, se obtuvieron semillas de HZ, por lo que se buscó germinar estas semillas *in vitro* para que se pudiera tomar raíces en condiciones de esterilidad, sin ningún contaminante como lo es la tierra, otras raíces o patógenos que pudieran interferir con el desarrollo de las raíces. Se preparó medio para germinación de las semillas, posteriormente se utilizó la campana de flujo laminar para hacer la siembra en condiciones de esterilidad y los botes se colocaron en un cuarto de cultivo con condiciones de luz y temperatura constantes.

En la figura 7 se aprecia la campana de flujo laminar que se utilizó para llevar a cabo la siembra estéril y el contenedor con las semillas listas, donde se obtuvieron 14 contenedores.



Figura 7. Izquierda, campana de flujo laminar utilizada, Derecha, contenedores con las semillas de *Tagetes erecta* en el cuarto de cultivo.

Todo este proceso desde la toma de raíces hasta la caracterización de las células con el microscopio se hizo 6 veces debido a que el conteo cromosómico era difícil de llevar a cabo porque los cromosomas de esta planta son pequeños (de 0.88 a 2.2 micras). En cada vez se utilizaron diferentes tomas de raíces y diferentes métodos para la preparación de las láminas. A continuación, se describe los 6 procesos diferentes y sus resultados correspondientes.

Preparación 1: Se tomaron las raíces del invernadero a partir de plantas juveniles en proceso de crecimiento, se siguió un tratamiento de raíces normal, de acuerdo en la sección de “desarrollo del proyecto”, y se prepararon las laminillas sin usar el método steamdrop, solo se colocaron sobre el portamuestras con la finalidad de observar células con cromosomas, no se obtuvieron imágenes.

Preparación 2: A partir de las raíces tomadas en la preparación 1, solo se utilizó el método de steamdrop para la preparación de la laminilla, que consiste en limpiar el portaobjetos con una solución de etanol y posteriormente trasladarlo a una solución de ácido acético puro, posteriormente, sacar el portaobjetos, colocar 7 microlitros

de muestra y poner boca abajo en contacto con los vapores del baño maría a 55 grados Celsius, permitiendo que la célula se hinche, la hidrólisis del citoplasma ocurra y que se dispersen los cromosomas. Las imágenes obtenidas fueron presentadas en la figura 6.

Preparación 3: Debido a un riego excesivo sobre las plantas de cempasúchil en el invernadero, estas presentaron crecimiento de hongo y murieron, no obstante, se pudieron obtener nuevas raíces a partir de estas plantas. El proceso de tratamiento de raíces fue seguido de manera normal y esta vez se utilizó el método de steamdrop modificado (reportado por Rodríguez-Domínguez y cols., 2017) para su observación. A pesar del proceso utilizado, no se analizaron las laminillas más a fondo debido a que no se presentaban concentraciones de células y se decidió por una nueva preparación.

Preparación 4: Se obtuvieron raíces a partir de cultivos *in vitro* de HZ ya enraizados, el tratamiento de las raíces no tuvo cambios y se decidió usar de nuevo la preparación de las laminillas por el método de steamdrop modificado. En esta preparación se sospechó que la mezcla de enzimas no tenía efecto porque las células presentaban pared celular. Las células obtenidas se presentan en la figura 8.

Figura 8. Preparación celular número 4, mejor selección de células a partir de 15 fotografías tomadas, pared celular y citoplasma aún presentes, fotografías tomadas con el objetivo a 100x con aceite de inmersión.

Preparación 5: Las raíces jóvenes se tomaron a partir de las semillas germinadas *in vitro*, se hizo un tratamiento normal sobre las raíces y se siguió utilizando el método de steamdrop modificado, esta vez, utilizando una enzima de otro recipiente. Se obtuvieron mejores resultados debido a que las raíces tomadas eran más jóvenes, mostrados en la figura 9 se presentan las imágenes tomadas.

Figura 9. Preparación celular número 5, mejor selección de células a partir de 40 fotografías tomadas, imágenes obtenidas con el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

Preparación 6: Se siguieron los pasos de la preparación 5 mostrados en la figura 10 se presentan las imágenes obtenidas.

Figura 10. Preparación celular número 6, mejor selección de células a partir de 30 fotografías tomadas, imágenes obtenidas con el objetivo de 100x con aceite de inmersión.

En todas las preparaciones se buscaba el recuento de cromosomas, donde esto se presentará en la siguiente sección, “Resultados del trabajo profesional”, donde se demostrará que la planta utilizada, denominada HZ, contiene 24 cromosomas.

3. Resultados del trabajo profesional

Los principales resultados obtenidos son información nueva sobre el método de micropropagación de esta especie. Donde se encontraron diferentes medios para la propagación de estas plantas.

Se determinó que el mejor medio para el enraizamiento es con sales MS (Murashige y Skoog, 1962) a máxima potencia, 30 g/L (gramos sobre litro) de Sacarosa, 1 mg/L

(miligramos sobre litro) de la hormona Ácido Indolbutírico, 8g/L de Agar y el medio ajustado a 5.8 de pH.

Para la proliferación de yemas, el mejor medio que se determino es con sales MS a máxima potencia, 30 g/L de Sacarosa, 1.5 mg/L de la hormona 6-Bencilaminopurina, y 0.05 mg/L de la hormona Ácido Naftalenacético, 8g/L de Agar y con el medio ajustado a un pH de 5.8.

Para la germinación de semillas, el mejor medio encontrado fue de 10% de concentración de sales del medio MS, 3 g/L de Sacarosa, 8 g/L de Agar, sin reguladores de crecimiento y ajustado a un pH de 5.8.

Estos son los mejores medios para el crecimiento óptimo de esta especie, los mismos que fueron utilizados para lograr el crecimiento esperado a lo largo del experimento para obtener más material con el cual trabajar.

Además, a partir de las fotografías obtenidas a lo largo de los experimentos, se determinó que la mejor fotografía es la que se muestra en la figura 11. Donde se aprecia a los cromosomas condensados, los cuales fueron contados en la figura 12.

Figura 11. Mejor fotografía obtenida a partir de las preparaciones realizadas.

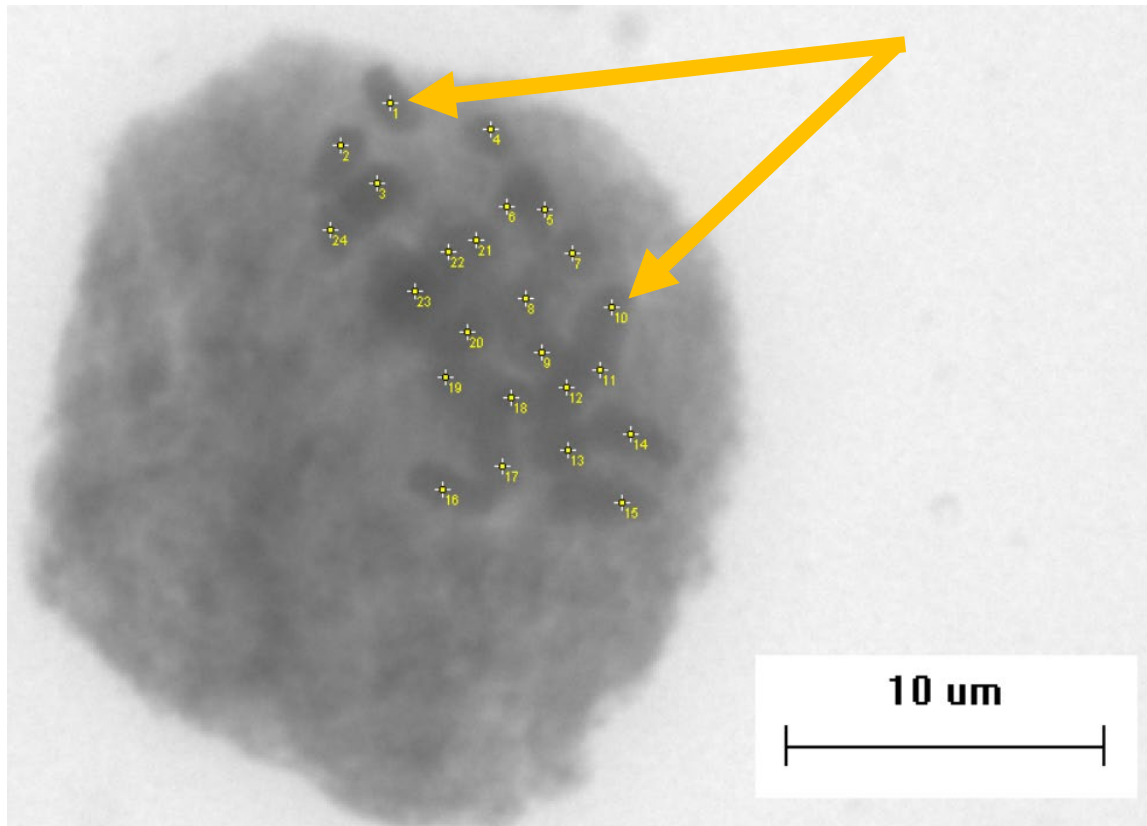


Figura 12. Conteo cromosómico realizado con el software ImageJ donde se comprueba que la célula tiene 24 cromosomas, las flechas indican los cromosomas que son contados del 1 al 24 con los números amarillos en la figura.

Se determinó que esta variedad de planta “HZ”, tiene un número cromosómico de ($2n=2x=24$), lo que nos quiere decir que cada célula de la planta presenta 2 juegos de 12 cromosomas cada uno, por lo que esta variedad no presenta un número diferente de cromosomas.

4. Reflexiones del alumno o alumnos sobre sus aprendizajes, las implicaciones éticas y los aportes sociales del proyecto

- **Aprendizajes profesionales**

En el desarrollo de este proyecto, varias habilidades fueron reforzadas, entre las que puedo mencionar, se destacan las habilidades referentes a la química, donde tuve que continuar haciendo soluciones, ajustar pH, medir volúmenes y reactivos;

también se reforzaron habilidades referentes a la microbiología, donde se tuvo que recordar como se esterilizan diferentes materiales y los procesos para hacerlo, recordar el proceso de reproducción celular y uso de microscopio óptico.

Sobre las disciplinas referentes a la profesión y mi vida profesional se destaca el aprendizaje que tuve en el desarrollo del cultivo de células o tejidos vegetales. Esta es la disciplina que quiero enfocarme en mi vida profesional y aprendí más sobre las diferentes formas de hacer el proceso de cultivo in vitro de las plantas, en las que destaca saber más sobre la optimización dentro de un laboratorio comercial o de investigación, sobre la prevención de contaminación en los tejidos, sobre la supervivencia de los explantes, el diseño del laboratorio, la creación de protocolos de micropropagación y el proceso del mejoramiento genético de las plantas; todo esto complemento lo que aprendí en la materia de cultivos de células y tejidos vegetales.

Dentro del contexto económico y campo profesional destaco que lo más importante que aprendí fue conocer como se trabaja en un centro de investigación y cuales son los pasos necesarios que se tienen que hacer para desarrollar nueva información y publicar artículos, aprendí de varios profesores y alumnos acerca de otras disciplinas como de microscopía, equipos, instrumentos, biología y química, conocimientos que me enriquecen en mi vida profesional.

- Aprendizajes sociales

En la realización de este proyecto el principal aporte social que se quiere dar es el aporte de nuevos alimentos cada vez más nutritivos y saludables para las personas y el medio ambiente. También, con la realización de este PAP, se busca relacionar a estudiantes con profesores para que siga habiendo un flujo cada vez más de investigadores que se dediquen a resolver los problemas económicos y ambientales que se presentan con una población cada vez más creciente y longeva. Y si por el momento el investigador me enseña a mí, probablemente yo enseñe a más alumnos y crezca el número de personas que se dediquen al mundo de la investigación.

Añadiendo al impacto social, el mejoramiento genético de las plantas y su micropropagación va a ser posible tener una seguridad alimentaria en los gobiernos y por ende en la población ante cualquier escasez que pueda ocurrir, con lo que cada aporte y cada mejora que se realice sobre las plantas va a producir un rendimiento mayor de las plantas, ahorro de agua, costos estables, disponibilidad y ahorro de dinero.

Con lo que he aprendido, soy totalmente capaz de preparar y dirigir un proyecto sobre el desarrollo de micropropagación de una planta o de la creación de un laboratorio de micropropagación de plantas, estos conocimientos que he adquirido con la práctica han complementado lo que he aprendido con la teoría.

- Aprendizajes éticos

La experiencia vivida en este PAP me lleva a poder trabajar en un centro de investigación de cualquier rama, especialmente sobre tecnología, ya que he aprendido a realizar el trabajo que se hace día a día en estos centros de investigación por lo que puedo ejercer estos conocimientos en empresas ya establecidas, especialmente en el departamento de investigación y desarrollo haciendo investigaciones que mejoren el rendimiento de una empresa o ahorren costos, tiempo y esfuerzo.

- Aprendizajes en lo personal

El PAP me dio una idea de ver como me desempeño haciendo labores de investigación, elaboración de reportes y de comunicación con la gente que trabajo, me dio una oportunidad de ver como sería mi día a día al trabajar en un centro de investigación como este; me dio la capacidad de poder interactuar con personas de distintas carreras para lograr un objetivo común.

Con los conocimientos adquiridos de este PAP, en algún futuro, podre crear un laboratorio de micropropagación comercial y crear empleos con salarios justos para la repartición de la riqueza.

5. Conclusiones

Primeramente, se logró el objetivo de poder vincular a los alumnos, investigadores y el ITESO de una manera satisfactoria, donde las 3 partes fueron beneficiadas, y por parte del alumno, se obtuvieron conocimientos más avanzados sobre la micropropagación de plantas. Posteriormente, los medios que se determinaron para la regeneración de esta planta suponen de un gran aporte al desarrollo de la micropropagación de esta planta, medios que definitivamente se usarán en etapas posteriores de este proyecto y de otros. Finalmente, se comprobó el número cromosómico de la variedad “HZ” ($2n=2x=24$), y a partir de esto se pueden hacer futuras investigaciones como la realización del cariotipo de la planta, y poder empezar con el mejoramiento genético de la misma, acciones que podrán realizarse en una etapa futura de este proyecto.

6. Bibliografía

1. W. Leigh Hadden, Ruth H. Watkins, Luis W. Levy, Edmundo Regalado, Diana M. Rivadeneira, Richard B. van Breemen, and Steven J. Schwartz. Carotenoid Composition of Marigold (*Tagetes erecta*) Flower Extract Used as Nutritional Supplement. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 4189-4194.
2. José Manuel Rodríguez Domínguez, Lilia Priscila Benavides-Gómez, Rodrigo Barba-González. Cytotypes of *Sprekelia formosissima* (Amaryllidaceae) collected in three localities of the state of Jalisco, Mexico. *The Journal of the Torrey Botanical Society*, 91-99.
3. Aertsens, J., Verbeke, W., Mondelaers, K., Van Huylenbroeck, G. Personal determinants of organic food consumption: a review. *British Food Journal*, pp. 1140-67.

4. Burger, Mabel, & Fernández, Salomé. (2004). Exposición al herbicida glifosato: aspectos clínicos toxicológicos. *Revista Médica del Uruguay*, 20(3), 202-207. Recuperado en 19 de febrero de 2020, de http://www.scielo.edu.uy/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1688-03902004000300006&lng=es&tlng=es.
5. Ana Gabriela Izquierdo Tolosa, Giselle Pérez Zazueta Diseño, Javier Gibran Quiroga Prado. (2013). Biotecnología. *ProMéxico*. Recuperado en 19 de febrero de 2020, de https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/75579/05052014_DS_Biotecnologia_ES.pdf
6. Serrato Cruz, Miguel Ángel, Hernández Rodríguez, Martha, Savidan, Yves, Bárcenas Ortega, Nina M. Contenido de ADN y nivel de ploidía en *Tagetes* spp. Utilizando citómetro de flujo. *Agrociencia* [en línea]. 2000, 34(6), 729-734[fecha de Consulta 21 de Marzo de 2020]. ISSN: 1405-3195. Disponible en: <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=30234607>
7. Rodríguez-Domínguez, J.M, Ríos-Lara, L.L., Tapia-Campos, E. and Barba-González, R. 2017. An improved technique for obtaining well-spread metaphases from plants with numerous large chromosomes. *Biotech. Histochem.* 92: 159–166.
8. Rasilla, C. G., Díaz, R., & López-Goñi, I. *Manual práctico de microbiología*. Tercera edición. Barcelona: Elsevier Masson. 2005.