

Optimización a metodología in vitro para la especie Dahlia pinnata aplicada dentro de las instalaciones del IDIT

Borja González, Daynally Georgette

2022

<https://hdl.handle.net/20.500.11777/5528>

<http://repositorio.iberopuebla.mx/licencia.pdf>

Optimización a metodología *in vitro* para la especie *Dahlia pinnata* aplicada dentro de las instalaciones del IDIT

Borja González Daynally Georgette (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, *Escalera Arroyo Emilia Monserrat (sexto semestre en Ingeniería de Negocios)¹, Herrera Morales Adell Victoria (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Morales Contreras Gabriela (sexto semestre en Ingeniería de Negocios)¹, Ortíz Santos Arely Desirée (sexto semestre en Ingeniería en Biotecnología)¹, Lomas Montaudon Yvonne (profesor responsable)¹ y Rivas Arreola María José (profesor asesor)¹

¹Universidad Iberoamericana Puebla, San Andrés Cholula, Puebla, México

Resumen

La *Dahlia pinnata* es la flor nacional de México que posee distintas propiedades medicinales, cosméticas, y alimentarias. Sin embargo, es una planta propensa a distintas plagas y enfermedades que pueden afectar estas propiedades. La técnica de cultivo *in vitro* permite la multiplicación de plantas en condiciones estériles, elimina el problema de contaminación y a su vez permite un mejor aprovechamiento de las propiedades. Los problemas a los que se enfrenta esta técnica son sus procedimientos meticulosos, sus tiempos de desarrollo y sus costos elevados. El objetivo de este trabajo es optimizar la metodología *in vitro* de la especie *Dahlia pinnata* dentro de las instalaciones del IDIT de la Ibero Puebla. La metodología consistió en la selección de segmentos nodales que pasaron por un tratamiento de desinfección con hipoclorito de sodio al 5% y que se sembraron en frascos que contenían medio MS, así como fitohormonas. La metodología fue evaluada y reportada en cursogramas analíticos de procesos que se emplearon para poder realizar la optimización. Se aplicaron los cambios a la metodología y se realizó una comparación y análisis de ambas metodologías. Los principales resultados son la optimización de tiempos y movimientos reduciendo un total de 79 minutos. A su vez se observó que hubo una mayor elongación y porcentaje de supervivencia (75%) en la metodología optimizada, siendo los tratamientos control los que brindaron mejores resultados. Se concluye que la optimización fue diseñada y realizada con una reducción relevante de tiempos de proceso, sin afectar el crecimiento de los cultivos.

Palabras clave: Cultivo *in vitro*, *Dahlia pinnata*, segmentos nodales, optimización, metodología.

***Autor Corresponsal:** daynally.borja@iberopuebla.mx

Introducción

En el país existe una gran demanda de plantas medicinales que se utilizan desde productos certificados hasta remedios caseros. Sin embargo, debido a la falta de conocimiento en el tratamiento, su existencia se ha reducido. Tan solo en el estado de Puebla se reportó una pérdida de alrededor del 30% de estas plantas en los últimos 7 años [1]. La mayor parte de las flores que se cultivan en México provienen del extranjero, esto ha ocasionado que las plantas endémicas del país no sean aprovechadas y estudiadas [2]. La *Dahlia pinnata*, es una flor endémica de México designada la flor nacional, que ha adquirido una importancia ornamental en el extranjero provocando una mayor demanda en el mercado [3,4]. No se trata de una flor sino una inflorescencia, esto quiere decir que se compone de dos tipos de flores pequeñas por lo que no se han realizado muchos trabajos de investigación en el país [2].

La *Dahlia pinnata* es una planta que cuenta con propiedades medicinales, cosméticas, y alimentarias, esto quiere decir que tiene un alto valor nutricional y farmacéutico [1,5-7], el problema al que se enfrenta esta flor es que tiene una tendencia a presentar plagas y enfermedades que afectan sus propiedades medicinales y demás usos por lo que su extracción directa puede resultar costosa y complicada [8-10].

La importancia de plantas medicinales *in vitro* recae en la demanda que existe de estas, esta técnica permite desarrollar cultivos donde se pueden producir niveles de metabolitos secundarios superiores y con actividad terapéutica mayor a la de plantas cultivadas de manera tradicional, además de la necesidad de que estén libres de patógenos. La técnica *in vitro*

al ser un proceso realizado de manera estéril asegura que la planta se encuentra en óptimas condiciones y lista para su distribución, es decir, incrementa la productividad, eficiencia, la calidad, y por lo tanto rentabilidad del producto [4].

Una de las principales características de la *Dahlia pinnata* es que contiene inulina, un prebiótico el cual beneficia la digestión además de colaborar en la asimilación de ciertos minerales como el calcio y el magnesio. Los camotes de esta especie vegetal tienen fibra dietética y fibra natural, aporta agua, proteínas y su consumo beneficia a la flora intestinal [11].

La técnica *in vitro* permite el saneamiento y propicia la multiplicación de la especie, garantizando fidelidad genética, sin embargo, el planteamiento del problema del cultivo *in vitro* es que es un proceso que requiere métodos meticulosos y específicos, cuyo tiempo de desarrollo y costo es elevado en comparación al cultivo tradicional de plantas [12]. Si bien el cultivo *in vitro* ha existido desde 1934, éste ha avanzado considerablemente con el paso del tiempo y conforme van existiendo nuevas tecnologías e ideas éste se puede seguir modificando para optimizar sus tiempos y costos [13-18].

Como se mencionaba anteriormente para los investigadores la *Dahlia pinnata* es propensa a diversas plagas y enfermedades que no le permiten desarrollarse por completo o es más tardado el tiempo de su cultivo [7]. La propuesta de mejora a la metodología de reproducción *in vitro* de la especie vegetal *Dahlia pinnata* busca acelerar la reproducción del cultivo para el máximo aprovechamiento de sus propiedades medicinales y usos comunes antes mencionados. A su vez se propone una optimización de metodología y de costos ya que es un procedimiento

considerado costoso y que puede tener tiempos muertos o improductivos.

A diferencia de Bosky, que es un laboratorio mexicano dedicado a la micropropagación de plantas con el fin de impulsar al sector agrícola ofreciendo material vegetativo de alta calidad para contribuir a la seguridad alimentaria y al cuidado del medio ambiente, la solución que este proyecto busca es proponer una optimización y reducción de costos de la metodología existente para que sea más eficiente y accesible para los estudiantes y colaboradores de la Universidad Iberoamericana Puebla dentro de las instalaciones del IDIT.

La importancia de este proyecto radica en que, al ser una flor endémica, se busca contribuir a la preservación de la biodiversidad en el país, ya que en los últimos años se ha perdido gran parte de las plantas medicinales debido al cambio climático y a la destrucción de ecosistemas [19].

El objetivo general de este proyecto es optimizar la metodología *in vitro* de la especie *Dahlia pinnata* dentro de las instalaciones del IDIT de la Ibero Puebla. Mientras que los objetivos específicos son: examinar mediante la descomposición de la metodología aspectos a mejorar del proceso inicial de reproducción *in vitro* de *Dahlia pinnata* como planta medicinal, presentar los cambios sugeridos a la metodología aplicada en las instalaciones del IDIT a partir de los diagramas propuestos, analizar los parámetros necesarios para que la metodología propuesta sea exitosa desarrollando el cultivo *in vitro* a partir de las mejoras identificadas mediante pruebas realizadas en el laboratorio y comparar ambas metodologías mediante el análisis de resultados.

Los alcances de este proyecto son la investigación de la metodología existente del cultivo *in vitro* para *Dahlia pinnata*, el desarrollo de esta, la presentación y el estudio de los cursogramas analíticos de proceso, el estudio y las sugerencias de mejora a la metodología existente y el desarrollo de esta aplicando sugerencias propuestas y la comparación de metodologías a partir de resultados. La limitación de este proyecto radica en la manipulación de los explantes de la especie *Dahlia pinnata* hasta la fase de establecimiento *in vitro* debido a las propiedades mencionadas como su contenido de inulina, así como su aporte ornamental.

Metodología

Material biológico

Los explantes fueron tomados de la planta donante (Fig. 1), la cual se obtuvo en el vivero llamado Vivero Cabrera La Unión en Atlixco, Puebla. Los explantes empleados para la siembra fueron segmentos nodales.

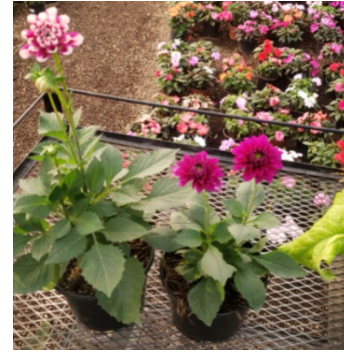


Fig. 1. Plantas donantes de *Dahlia pinnata*.

Elaboración del medio de cultivo

Se utilizó el Medio MS (Murashige y Skoog, 1962) enriquecido con AIA 0,5 mg/L, sacarosa y agar bacteriológico como agente gelificante. Se pesaron 3.1 g del polvo del medio MS, 1.7 g de sacarosa y 0.7 g de agar bacteriológico, se vertió en un matraz con 85 mL de agua destilada, agitó y calentó en una parrilla eléctrica hasta homogeneizar. Se colocó un tapón apto para esterilización. Junto con el medio, se esterilizaron frascos de vidrio, dos pinzas de disección, cuatro vasos de precipitado de 100 mL y 1.5 L de agua destilada a 120 °C durante 15 minutos en la autoclave eléctrica, una vez finalizado se dejaron enfriar a temperatura ambiente y el medio de cultivo se refrigeró a 5 °C.

Preparación de la campana de flujo laminar

Con la solución de etanol al 70%, se roció la campana y se limpió con papel el exceso. Posteriormente se prendió la luz UV de 250 nm de longitud, durante 15 minutos, se apagó y cuando se comenzó a usar, se prendió el aire por unos segundos para después poder alzar la tapa y comenzar.

Preparación del material biológico

De la planta donante se obtuvieron once segmentos nodales, los cuáles se cortaron con ayuda de un bisturí. Posteriormente, se lavaron con una solución de jabón comercial al 2% y se enjuagaron con agua. Los segmentos se dejaron en agua destilada para que no se deshidrataran.

Trabajo dentro de la campana de flujo laminar

Se prendió el flujo de aire de la campana, posteriormente se rociaron los materiales que se ocuparían con una solución de alcohol al 70% y se introdujeron. Los segmentos se sumergieron en un vaso de precipitado que contenía concentración de hipoclorito de sodio al 0,5 % en intervalos de 5 min y se enjuagó en agua destilada estéril entre cada intervalo hasta completar 20 min de tiempo de exposición. Mientras se desinfectaron los segmentos, se vertieron 20 mL del medio estéril en los cuatro frascos donde dos de ellos son de control y dos se enriquecieron con fitohormona, antes de que el medio se gelificara, se añadió la fitohormona AIA con ayuda de una pipeta y una perilla, mezclando con movimientos suaves.

Con cuidado de no lastimar al explante, se sembraron de dos a tres segmentos en cada frasco con las pinzas estériles y, sin enterrarlos demasiado. Para finalizar, se cerraron los frascos

con la tapa, Kleenpack para evitar contaminaciones, un pedazo de aluminio y por último una liga. Los frascos se marcaron con la fecha y fitohormona.

Los cultivos se incubaron en luz natural a temperatura ambiente con fotoperiodos de 16/8 horas y se evaluaron al inicio y dos semanas después para realizar las pruebas necesarias.

Elaboración de diagramas para la optimización de la metodología y plano del laboratorio

Tabla 1: Simbología de cursograma analítico.

Símbolo	Acción	Objeto
	Operación	Para cambiar
	Inspección	Para verificar
	Demora	Para esperar
	Transporte	Para mover
	Almacenaje	Para proteger

Se utilizó el cursograma analítico de procesos. Donde se indican movimientos de materiales, inspecciones, operaciones, almacenamientos y retrasos (Tabla 1) para

contribuir con la productividad en los procesos de una organización [20].

Se observó la metodología ejecutada dentro del laboratorio y se llenó el formato del cursograma analítico (Fig. 2). Se colocó el nombre de la tarea, número del diagrama, número de hojas y número de hoja en la que se trabajó. Posteriormente, se indicó el punto de partida y de término del proceso. A su vez, se especificó el lugar en el que se llevó a cabo la metodología, indicando el nombre tanto del operario como del observador. Se incluyó la fecha del estudio junto con una descripción de la simbología utilizada. Por otro lado, se desarrolló el resumen de los puntos realizados tales como las cantidades, distancias, tiempo, así como consideraciones como el costo de mano de obra y de materiales.

El desarrollo de la metodología se dividió en dos días considerando los puntos correspondientes. En el primer día (Fig. 3) se analizaron las actividades respectivas a la preparación del medio de cultivo y la esterilización del material.

En cuanto al segundo día (Fig. 4), se indicaron las actividades realizadas para la preparación del medio y el sembrado de explantes, en los cuales se identificó los puntos a mejorar.

CURSOGRAMA ANALÍTICO DE PROCESO					ASE II - Desarrollo de Proyectos							
Diagrama no.		1		de:		2		Resumen				
Tarea:		Metodología in vitro			Actividad		Actual	Propuesto	Economía			
					Operación		0	0	0			
					Inspección		0	0	0			
Actividad:		Cultivo in vitro de <i>Dahlia Pinnata</i> día 1			Espera		0	0	0			
					Transporte		0	0	0			
					Almacenamiento		0	0	0			
					Distancia (mts)		0	0	0			
					Tiempo (minutos)		0	0	0			
Método:		Actual										
Lugar:		IDIT			Costo							
Operario(s):		D. Georgette Borja G. Ficha no. 1 A. Victoria Herrera M. Arelly D. Ortiz S.			Mano de obra							
					Material							
					TOTAL ACTIVIDADES		0	0	0			
Compuesto por:		Gabriela Morales C. Fecha: 23/03/22 Emilia M. Escalera A.										
DESCRIPCIÓN		Cantidad	Distancia	Tiempo	Actividad		OBSERVACIONES					
					●	■	◐	➡	▼			
TOTAL:					0	0	0	0	0			

Fig. 2. Formato cursograma analítico por G. Morales.

CURSOGRAMA ANALÍTICO DE PROCESO					ASE II- Desarrollo de Proyectos					
Diagrama no. 1		Hoja: 1		de: 2		Resumen				
Tarea: Metodología in vitro					Actividad	Actual	Propuesto	Economía		
Actividad: Cultivo in vitro de <i>Dahlia Pinnata</i> día 1					Operación	17	16	1		
					Inspección	4	4	0		
					Espera	1	1	0		
					Transporte	2	2	0		
					Almacenamiento	3	0	3		
Distancia (mts)					44	25	19			
Método: Actual					Tiempo (minutos)	81	111	-30		
Lugar: IDIT					Costo					
Operario(s): D. Georgette Borja G. A. Victoria Herrera M. Arely D. Ortiz S.		Ficha no. 1		Mano de obra						
				Material						
Compuesto por: Gabriela Morales C. Emilia M. Escalera A.		Fecha: 23/03/2022		TOTAL ACTIVIDADE		27	23	4		
DESCRIPCIÓN			Cantidad	Distancia	Tiempo	Actividad			OBSERVACIONES	
						●	■	●		➡
Requisición al almacén					indef			➡	Se solicitan los materiales y químicos necesarios	
Organizar materiales					5		■			
Realizar cálculos de las cantidades a utilizar					10	●			Para este paso se realizan tablas de 3	
Pesar el medio de cultivo MS			3.1 g		1	●				
Pesar el agar bacteriológico			0.7 g		1	●				
Pesar la sacarosa			1.7 g		1	●				
Guardar la báscula en su lugar				3	1				▼ Para despejar el área de trabajo	
Almacenar los químicos utilizados				3	1				▼ Para despejar el área de trabajo	
Recolectar agua destilada (85ml) en una probeta			85ml	5	2	●			Se usa la probeta para mayor exactitud	
Pasar el agua a un matraz					0.5	●				
Precalentar parrilla de calentamiento a 500°C					0.5	●				
Poner a calentar el matraz con agua destilada					1	●				
Verter quimicos en el matraz con agua destilada					3	●			El orden es irrelevante	
Precalentar autoclave				10	3	●			Se requieren 2 personas si son de baja estatura	
Se despeja área de trabajo				3	2	●				
Calentar el matraz hasta que quede un líquido homoganeo, o bien, hasta que hierva					20			●		
*Mientras se esperaba a que calentara el matraz:										
Fabricar un tapón para el matraz con gasa y algodón			1		2	●				
Seleccionar los frascos a utilizar			4		3		■			
Limpiar y marcar los frascos			4		5	●				
Envolver frascos en papel aluminio			4		5	●			Para su posterior esterilización	
Retirar del fuego el matraz					1			➡		
Cerrar con el tapón el matraz					1	●				
Verificar que esté bien cerrado (con vacío)					1		■		Se corrobora que haga un sonido al quitarse	
Colocar el matraz en el autoclave				10	3	●				
Cerrar el autoclave					3	●			Se requien 2 personas si son de baja estatura	
Corroborar que esté bien cerrado					1		■			
Almacenar el medio de cultivo para su uso en el día 2				10	4				▼	
TOTAL:						17	4	1	2	3

Fig. 3. Cursograma analítico de la metodología *in vitro* de *Dahlia pinnata* día 1 por G. Morales y E. M. Escalera.

CURSograma ANALÍTICO DE PROCESO					ASE II- Desarrollo de Proyectos					
Diagrama no.	1	Hoja:	2	de:	2	Resumen				
Tarea:	Metodología in vitro				Actividad	Actual		Propuesto	Economía	
Actividad:	Cultivo in vitro de <i>Dahlia Pinnata</i> día 2				Operación	30	25	5		
					Inspección	2	0	2		
					Espera	5	4	1		
					Transporte	4	2	2		
					Almacenamiento	1	0	1		
					Distancia (mts)	61	10	51		
Método:	Actual				Tiempo (minutos)	179.7	71	109		
Lugar:	IDIT				Costo					
Operario(s):	D. Georgette Borja G. A. Victoria Herrera M. Arelly D. Ortiz S. Gabriela Morales C. Emilia M. Escalera A.				Ficha no.	2				
					Mano de obra					
					Material					
Compuesto por:	Fecha: 23/03/2022				TOTAL ACTIVIDADES	42	31	11		
DESCRIPCIÓN		Cantidad	Distancia	Tiempo	Actividad	OBSERVACIONES				
Requisición de material				indef		Se solicitan los materiales y químicos necesarios				
Organización de material				5						
Precalentar autoclave			10	15		Al menos 15 min antes				
Rociar con alcohol la campana de flujo laminar			10	1						
Encender la campana de flujo laminar para su esterilización				0.5		Al menos 15 min antes de utilizarse				
Calcular cantidad de solución de hipoclorito				5		Se utiliza una regla de 3 para los cálculos				
Llenar probeta con agua destilada			3	1						
Vaciar contenido de probeta en vaso precipitado				0.5						
Verter el alcohol en vaso precipitado con agua destilada				1						
Mezclar con agitador				0.5						
Enjuagar probeta y ponerla a secar				2						
Esperar 15 minutos para...				5		Se esperan los 5 minutos que faltan para que den los 15 minutos desde que se encendio				
...Apagar campana de flujo laminar			10							
Cortar explantes a utilizar de la Dahlia pinnata con bisturi			5	15		Al menos 8 explantes				
Enjuagar los explantes en solución de agua con jabon comercial al 2%				1						
Enjuagar los explantes con agua corriente				1						
Repetir al menos 3 veces los dos pasos anteriores				5						
Llevar los materiales al salon de la campana de flujo			10	2						
Rociar con alcohol todo lo que se va a introducir en la lampara de flujos, incluyendo las manos de la persona que manipulara las cosas dentro de la lampara				3						
Verter agua destilada en vaso precipitado				1						
Introducir explantes en el vaso con agua destilada				3						
Agitar con mezclador para un mejor enjuague				1						
Dejar reposar				30						
Introducir materiales a esterilizar en autoclave			10	2						
Asegurarse que este bien sellado el autoclave				4						
Dejar hervir despues de alcanzar los 120°C				20						
Llevar los materiales al salon de la campana de flujo laminar				3						
Introducir a la campana materiales a utilizar				3		Una persona destapa las cosas y se las pasas a quien esta manipulando los explantes				
Verter medio en frascos gerber con explantes				8		Importante que el medio no este caliente pero si en estado liquido				
Verter en frascos de gerber con micropipetas fitohormonas				8						
Se agitan delicadamente para mezclar				2						
Tapar frascos de gerber				1						
Pasar los explantes que estaban en agua destilada al hipoclorito al 0.05%			3	3						
Dejar reposar				5						
Enjuagar en agua esteril				1						
Repetir los 3 pasos anteriores cuatro veces				15		cumplir con 20 min en hipoclorito				
Se plantan de dos a tres explantes en un frasco de gerber				4		Cuidar que las pinzas no toquen el medio				
Tapar frascos de gerber				1						
Sellar los frascos con kleenpack				0.6		3 vueltas en horizontal y 3 en vertical				
Poner aluminio sobre la tapa y asegurar con una liga				0.4						
Se dejan reposar por dos semanas para la fase de multiplicación				0.2						
TOTAL :					30	2	5	4	1	

Fig. 4. Cursograma analítico de la metodología *in vitro* de *Dahlia pinnata* día 2 por G. Morales y E. M. Escalera.

Por otra parte, el plano consistió en el ordenamiento físico de los elementos necesarios dentro del laboratorio. Se realizó un bosquejo de dicho ordenamiento con ayuda del software PowerPoint.

Ejecución de metodología a partir de los cambios propuestos

La metodología se desarrolló siguiendo el protocolo [21] considerando las propuestas de los cursogramas analíticos realizados. El medio de cultivo fue enriquecido con la fitohormona BAP, esto con el objetivo de observar que fitohormona favorece el crecimiento de los explantes.

Se realizaron cuatro frascos de los cuales dos se dejaron como control y los otros dos se les añadió 100 μ L de BAP. Se sembraron de dos a tres segmentos nodales por frasco siendo en total once explantes con un fotoperiodo de luz de 16/8 por dos semanas.

Análisis de parámetros necesarios

Se realizaron una serie de pruebas: esterilidad, supervivencia y longitud de crecimiento para analizar el correcto procedimiento de la metodología empleada.

Pruebas de esterilidad

Se preparó un caldo nutritivo adicionado con agar bacteriológico como agente gelificante para identificar el crecimiento de microorganismos. Éste se vertió en cajas Petri las cuales se colocaron en las áreas: campana de flujo laminar, incubadora y Laboratorio de Biorreactores (Salón J008) durante 15 minutos. Pasando el tiempo se metieron a la incubadora a 35 °C dejando crecer los microorganismos durante 24 horas.

Prueba de supervivencia

Se hizo uso de la fórmula de supervivencia ec. (1) en la cual se consideran el número de explantes vivos y el número total de explantes.

$$S = \left(\frac{\text{Número de explantes vivos}}{\text{Número total de explantes sembrados}} \right) (100) \quad (1)$$

Prueba de longitud

Se colocó una regla transparente de plástico a un lado del frasco de vidrio (Fig. 5) debido a que no se puede abrir ya que se contaminaría y su ambiente estéril se vería afectado para medir la elongación de los explantes.

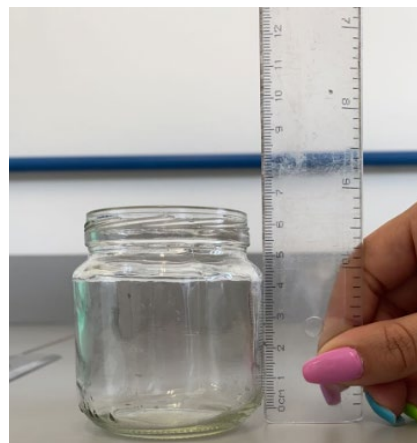


Fig. 5. Ejemplo de medición de longitud de explantes.

Resultados y Discusión

Fase de establecimiento in vitro

A partir de los frascos realizados, se pudo observar una tonalidad diferente (Fig. 6) en los medios de cultivo que tenían fitohormona a los de control. Para los frascos con fitohormona, el medio se tornó de color amarillento, mientras que, los de control conservaron la apariencia reportada en la literatura.



Fig. 6. Observación de distintas tonalidades en el medio de cultivo.

Se determinó que la procedencia de la planta donante pudo influir en el resultado ocasionando que la concentración de fitohormona quemara los segmentos nodales, es decir, se tornaran de color amarillo o negro (Fig. 7).



Fig. 7. Explantes quemados a causa de la concentración de AIA.

En cuanto a los medios de control, se observó crecimiento de los segmentos nodales. Esto se debe a que la base del medio

MS contiene ciertos macro y micronutrientes que favorecen el crecimiento de los explantes (Fig. 8), se observa una elongación en la parte superior del segmento nodal. Esto permite determinar que el explante está creciendo correctamente.



Fig. 8. Elongación y formación de los nodos.

puede atribuir que la planta muriera a causa del estrés que se generó en ella.



Fig. 9. Planta donante enferma.

La planta obtenida del vivero después de un mes presentó plaga, ocasionando que la planta se enfermara y las hojas se tornaran amarillas, por lo tanto, esta planta ya no era viable como planta donante (Fig. 9). Esto confirma que la especie *Dahlia pinnata* tiende a contraer enfermedades y plagas, se

Diagramas de optimización y plano del laboratorio

Con el análisis y la realización de los diagramas (Fig. 10 y 11) se pudo observar que existen tiempos muertos, sobre todo por la falta de organización y/o claridad de lo que se debe hacer.

CURSOGRAMA ANALÍTICO DE PROCESO					ASE II- Desarrollo de Proyectos					
Diagrama no.	1	Hoja:	1	de:	2	Resumen				
Tarea: Metodología in vitro						Actividad		Actual	Propuesto	Economía
						Operación	●	16		
Actividad: Cultivo in vitro de <i>Dahlia Pinnata</i>						Inspección	■	4		
						Espera	▶	1		
						Transporte	▶	2		
						Almacenamiento	▼	0		
						Distancia (mts)		28		
						Tiempo (minutos)		111		
Método: Propuesto						Costo				
Lugar: IDIT						Mano de obra				
Operario(s): D. Georgette Borja G.		Ficha no.		1	Material					
A. Victoria Herrera M.										
Gabriela Morales C.		Fecha:		24/03/2022						
Compuesto por: Emilia M. Escalera A.						TOTAL ACTIVIDADES		23		
DESCRIPCIÓN		Cantidad	Distancia	Tiempo	Actividad					OBSERVACIONES
					●	■	▶	▶	▼	
Realizar cálculos de las cantidades a utilizar				10	●					
Requisición al almacén				5				▶		Si se solicita con tiempo requiere menos
Precalentar autoclave			10	9	●					Llevó más tiempo porque estaba sucia la
Organizar materiales				3		■				
Pesar el medio de cultivo MS		3.1 g		0.62	●					
Pesar el agar bacteriológico		0.7 g		0.62	●					
Pesar la sacarosa		1.7 g		0.62	●					
Despejar área de trabajo			3	0.93	●					
Recolectar agua destilada en una probeta		85ml	2	0.52	●					
Pasar el agua a un matraz				0.19333	●					
Poner a calentar el matraz con agua destilada				2.15	●					Se mantiene en la parrilla hasta que sea un
Verter reactivos en el matraz con agua destilada					●					líquido homogéneo o que hierva
Despejar área de trabajo			3	0.167	●					
*Mientras se espera a que caliente el matraz:										
Fabricar un tapón para el matraz con gasa y algodón				2.42	●					
Seleccionar los frascos a utilizar				1.25		■				*Se trasladaron al 2do laboratorio por los
Limpiar y marcar los frascos				6.07	●					
Envolver frascos en papel aluminio				2.4	●					
Retirar del fuego el matraz				20				▶		
Cerrar con el tapón el matraz				0.167	●					
Verificar que esté bien cerrado (con vacío)				0.0667		■				
Introducir materiales a esterilizar en autoclave			10	2.5	●					
Asegurarse que este bien sellado el autoclave				4.2		■				
Alcanzar los 120°C				24.21				▶		
Esperar 15 minutos cuando esté a 120°C				15				▶		
TOTAL:					16	4	1	2	0	

Fig. 10. Cursograma analítico de la propuesta de optimización de la metodología *in vitro* de *Dahlia pinnata* día 1 con tiempos por G. Morales y E. M. Escalera.

CURSOGRAMA ANALÍTICO DE PROCESO					ASE II- Desarrollo de Proyectos					
Diagrama no.	1	Hoja:	2	de:	2	Resumen				
Tarea:	Metodología in vitro				Actividad			Actual	Propuesto	Economía
Actividad:					Operación	●	25			
					Inspección	■	0			
	Espera	▢	4							
	Transporte	➡	2							
Cultivo in vitro de <i>Dahlia Pinnata</i>	Almacenamiento	▼	0							
	Distancia (mts)			33						
	Tiempo (minutos)			71.03						
	Método:	Propuesto				Costo				
Lugar:	IDIT				Mano de obra					
Operario(s):	D. Georgette Borja G.		Fecha no.	2	Material					
	A. Victoria Herrera M.									
Compuesto por:	Gabriela Morales C.		Fecha:	24/03/2022	TOTAL ACTIVIDADES	31				
	Emilia M. Escalera A.									
DESCRIPCIÓN		Cantidad	Distancia	Tiempo	Actividad					OBSERVACIONES
					●	■	▢	➡	▼	
Rociar con alcohol la campana de flujo laminar			10	0.8833	●					
Encender la campana de flujo laminar para su esterilización					●					
Llenar probeta con agua destilada		200 ml		0.45	●					
Vaciar contenido de probeta en vaso precipitado				0.22	●					
Llenar probeta con hipoclorito de sodio		12 ml		0.867						
Verter el hipoclorito de sodio en vaso precipitado con agua destilada				0.0167	●					
Mezclar con agitador				0.216	●					
Esperar 15 minutos para...				5			▢			Se esperan los 5 minutos que faltan para que
Apagar campana de flujo laminar			10		●					den los 15 minutos desde que se encendio
Despejar área de trabajo			3	0.3	●					
Cortar explantes a utilizar de la <i>Dahlia pinnata</i> con bisturi				9	●					Como ya se conoce dónde cortar, es más rápido
Apagar campana de flujo laminar				0.033	●					
Enjuagar los explantes en solución de jabón comercial al 2%				5	●					
Enjuagar los explantes con agua corriente				6	●					
Repetir al menos 3 veces los dos pasos anteriores					●					
Llevar los materiales al salón de la campana de flujo			10	0.5833				➡		Se reducirían tiempos con el nuevo layout
Rociar con alcohol todo lo que se va a introducir en la campana de flujo laminar, incluyendo las manos de la persona que manipulará el material dentro de la lámpara				3	●					
Verter agua destilada en vaso precipitado				0.183	●					
Agitar con mezclador para un mejor enjuague				0.033	●					
Dejar reposar				5			▢			
Verter medio en frascos de vidrio		20 mL		0.33	●					
Verter en frascos de vidrio con micropipetas fitohormona		100μL		0.167	●					
Se agitan delicadamente para mezclar				0.05	●					
Pasar los explantes que estaban en agua destilada al hipoclorito al 0.5%				0.41667				➡		
Dejar reposar				5			▢			
Enjuagar en agua esteril				0.1166	●					
Repetir los 3 pasos anteriores cuatro veces				25	●					
Se siembran de dos a tres explantes en un frasco				3	●					
Tapar frascos de vidrio				0.033	●					
Sellar los frascos con kleenpack				0.05	●					
Poner aluminio sobre la tapa y asegurar con una liga				0.0833	●					
Se dejan reposar por dos semanas para la fase de multiplicación							▢			
TOTAL:					25	0	4	2	0	

Fig. 11. Cursograma analítico de la propuesta de optimización de la metodología *in vitro* de *Dahlia pinnata* día 2 con tiempos por G. Morales y E. M. Escalera.

Debido a la organización de las instalaciones del IDIT se pierde tiempo al realizar traslados de un salón a otro, ya que

se utilizan tres salones distintos. A partir del bosquejo elaborado con el software Power Point (Fig. 12) se diseñó

con ayuda del programa AutoCAD el laboratorio ideal para realizar cultivos *in vitro*. En la Fig. 13 se muestra el diseño final.

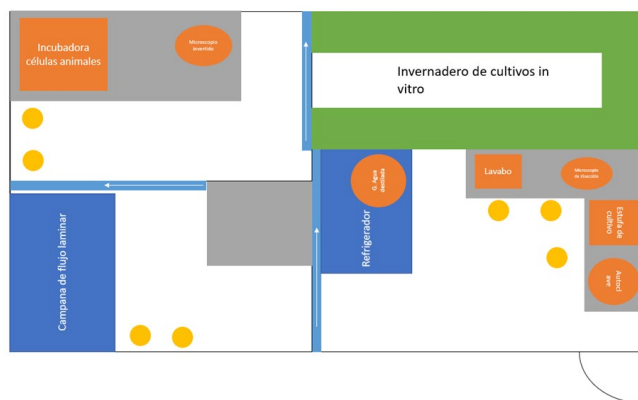


Fig. 12. Propuesta de un laboratorio "ideal" para la metodología de cultivo *in vitro*.

Primero se encuentra el área de preparación, lavado y esterilización que contiene la autoclave, mesa de trabajo, congelador, incubadora, espacio de lavado de material, congelador y microscopio de disección. Posteriormente la persona se traslada a la segunda habitación la cual se encuentra dividida por una puerta corrediza, en esta área es vital que se consideren condiciones de asepsia debido a que se encuentra la campana de flujo laminar y una mesa de trabajo para colocar el material previamente esterilizado. Continúa a ésta a través de una puerta corrediza se encuentra la tercera habitación, la cual cuenta con la incubadora de célula animal y un microscopio de inmersión. Finalmente, la cuarta habitación se conoce como invernadero, donde se almacenarán los cultivos *in vitro*, permitiendo una reserva de cultivos que podrán ser utilizados para continuar con su propagación.

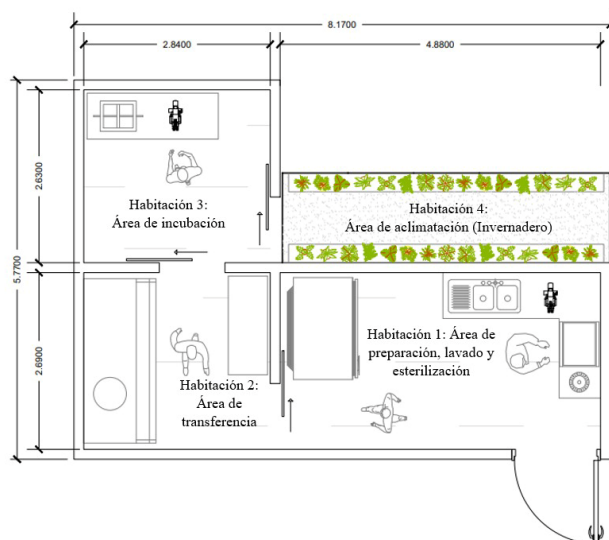


Fig. 13. Diseño de laboratorio de cultivo de células y tejidos realizado en AutoCAD.

Ejecución de metodología a partir de los cambios propuestos

A partir del tratamiento 2 se puede observar que la adición de la fitohormona BAP no modificó la apariencia del medio (Fig. 14) por lo que se puede determinar que la concentración no influye en el ambiente artificial.

Se observó que los explantes que se encontraron sembrados con la fitohormona se tornaron de color negro y uno de ellos presentó contaminación, esto se puede deber a un mal manejo del material biológico (Fig. 15).

A pesar de la contaminación, uno de los frascos mostró un ligero crecimiento de los explantes como se expuso en la prueba de longitud. Se puede determinar que los nutrientes del medio ayudaron en el crecimiento de los segmentos, caso contrario al frasco que presentó contaminación en el que no se presentó ningún crecimiento.



Fig. 14. Observación de medio de cultivo para frascos de control y frascos enriquecidos con fitohormona.



Fig. 15. Explantes sembrados en medio de cultivo enriquecido con fitohormona BAP.

En cuanto a los medios de control, se observó un crecimiento mucho mayor de los segmentos nodales debido a que la base del medio MS contiene nutrientes que favorecen el crecimiento de los explantes, como se muestra en la figura (Fig. 16) se observa una elongación en la parte superior del segmento nodal, lo que da paso a la formación de un nuevo nodo, en algunos segmentos se presentó la formación de dos nuevos segmentos nodales. A su vez, en uno de los frascos se observó la formación de raíz lo cual indica que las condiciones del medio son adecuadas para este tipo de explante.



Fig. 16. Elongación y formación de raíz de los segmentos nodales en los medios de control del tratamiento 2.

Prueba de esterilidad

Los resultados obtenidos se describen a continuación:
Campana de flujo laminar: No se presentó ningún tipo de crecimiento (Fig. 17), indicando que cumple con características de esterilidad.

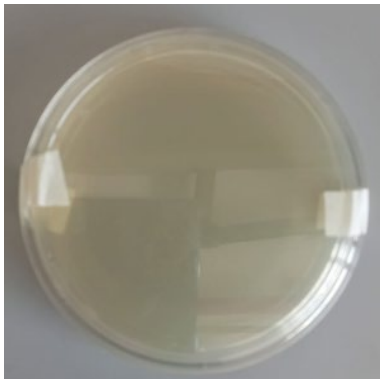


Fig. 17. Placa Petri sin crecimiento de microorganismos.

Incubadora: Se observó la presencia de microorganismos (Fig. 18), indicando que no presenta condiciones asépticas. Esto no influye como factor ya que los cultivos se cierran herméticamente, sin embargo, se puede correr un riesgo de contaminación.

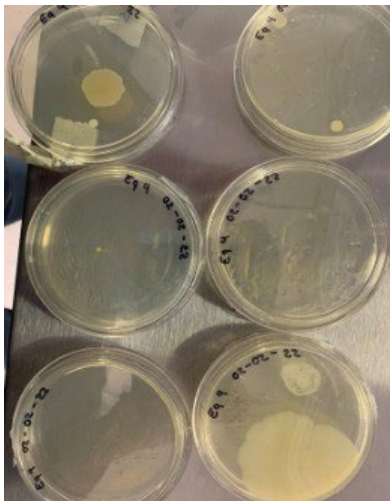


Fig. 18. Placas Petri con crecimiento de microorganismos de la incubadora.

Laboratorio de Biorreactores (Salón J008): Se observó el crecimiento de microorganismos (Fig. 19), demostrando que el laboratorio no cuenta con condiciones asépticas.

Se demostró que el área de manipulación de los explantes en donde se requiere de la esterilidad, siendo este la campana de flujo laminar cuenta con las condiciones de asepsia adecuadas para el desarrollo del cultivo *in vitro*.

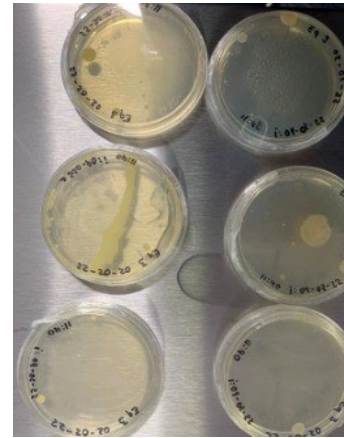


Fig. 19. Placas Petri con crecimiento de microorganismos del laboratorio de biorreactores.

Prueba de supervivencia

Con ayuda de la ec. (1) se analizaron los porcentajes de supervivencia en los cuatro frascos para el tratamiento 1.

$$S_{AIA\ 1} = \frac{0}{2}(100) = 0\%$$

$$S_{AIA\ 2} = \frac{0}{3}(100) = 0\%$$

$$S_{Control\ 1} = \frac{3}{3}(100) = 100\%$$

$$S_{Control\ 2} = \frac{2}{3}(100) = 66.66\%$$

El tratamiento 1 no favoreció el crecimiento de los explantes. El porcentaje promedio de supervivencia fue de 41.67% debido a los nutrientes del medio MS.

A partir de la metodología propuesta se analizaron los porcentajes de supervivencia en los frascos para el tratamiento 2.

$$S_{BAP\ 1} = \frac{0}{3}(100) = 0\%$$

$$S_{BAP\ 2} = \frac{3}{3}(100) = 100\%$$

$$S_{Control\ 1} = \frac{3}{3}(100) = 100\%$$

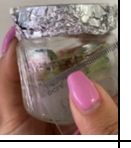
$$S_{Control\ 2} = \frac{2}{2}(100) = 100\%$$

Se puede observar que el tratamiento 2 obtuvo un mejor crecimiento de los explantes, ya que únicamente uno de los frascos presentó un porcentaje nulo de supervivencia, mientras que los otros tres frascos mostraron un porcentaje de 100%. Esto permitió determinar que la fitohormona BAP favoreció de mejor manera la elongación de los explantes y se confirmó que los nutrientes ya contenidos en la base del medio MS permiten el crecimiento de los segmentos nodales teniendo un promedio de supervivencia de 75%.

Prueba de crecimiento

A partir de las medidas realizadas de los frascos que contenían los explantes siendo once explantes analizados, se llenó la tabla 3 para el tratamiento 1.

Tabla 3: Tratamiento 1.

Control 1			Control 2			Fitohormona 1			Fitohormona 2		
Evidencia	Medida inicial	Medida dos	Evidencia	Medida inicial	Medida dos	Evidencia	Medida inicial	Medida dos	Evidencia	Medida inicial	Medida dos
	2.8	5		0.5	0.5		1.5	2		0.4	0.4
	1.6	2.6		1.3	1.6		1	1.2		1	1
	3.4	4		1.7	2					1.3	1.5

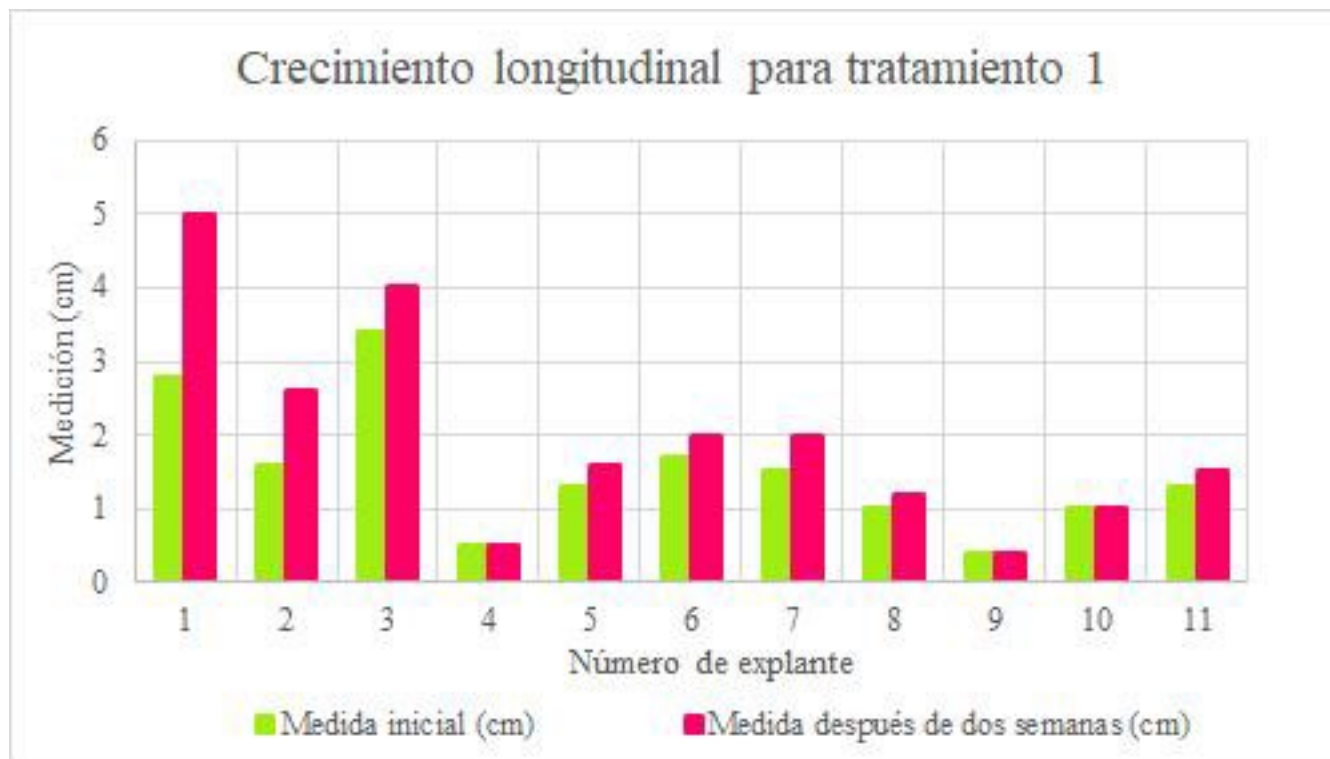


Fig. 20. Crecimiento longitudinal de los explantes con tratamiento 1.

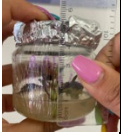
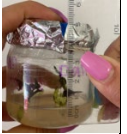
Se realizó un gráfico (Fig. 20) para demostrar el crecimiento de los explantes en el cual se observa un comportamiento similar demostrando que efectivamente existió un crecimiento en la mayoría de los segmentos nodales.

Posteriormente se llenó la tabla 4 correspondiente al tratamiento 2 a partir de las mediciones realizadas de los

frascos que contenían los explantes siendo once segmentos analizados.

Se realizó un gráfico (Fig. 21) para demostrar el crecimiento. Se observa un comportamiento similar demostrando que efectivamente existió un crecimiento en la mayoría de los segmentos nodales. Cabe mencionar la diferencia notoria entre las mediciones.

Tabla 4: Tratamiento 2.

Control 1			Control 2			Fitohormona 1			Fitohormona 2		
Evidencia	Medida inicial	Medida dos	Evidencia	Medida inicial	Medida dos	Evidencia	Medida inicial	Medida dos	Evidencia	Medida inicial	Medida dos
	2.4	4.5		1.8	2.9		2	2.2		0.4	0.4
	0.4	0.6		2.4	3.1		0.4	1.5		1	1
	1.8	2.6					1.8	3		1.3	1.5

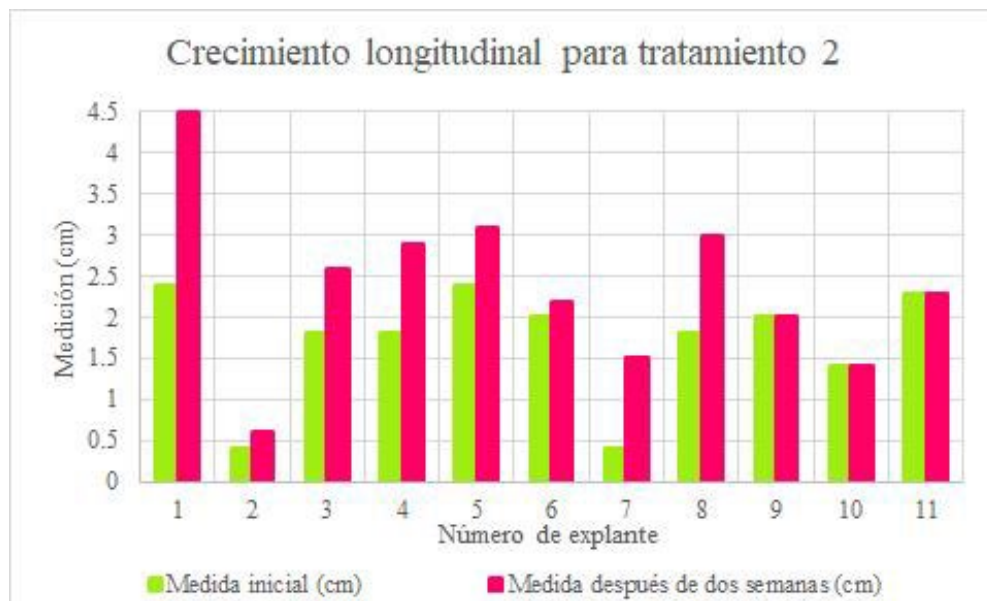


Fig. 21. Crecimiento longitudinal de los explantes con tratamiento 2.

Comparación de ambas metodologías

Se puede apreciar cómo se optimizan tiempos y movimientos en la columna de “economía” (Tabla 5). De acuerdo con el análisis realizado se puede observar que se ahorraron 79 minutos con la metodología propuesta. La metodología original requería de 79 actividades desglosadas ahora la metodología propuesta se disminuyó a cincuenta y cuatro actividades.

Tabla 5: Resumen de cursograma analítico con comparación de metodologías.

Actividad	Resumen		
	Actual	Propuesto	Economía
Operación ●	47	41	6
Inspección ■	6	4	2
Espera ◐	6	5	1
Transporte ➡	6	4	2
Almacenamiento ▼	4	0	4
Distancia (m)	105	61	44
Tiempo (minutos)	261	182	79

Conclusiones, perspectivas y recomendaciones

Los cultivos *in vitro* se usan para generar plantas a través de un segmento logrando así multiplicar de manera eficaz nuevas plantas. Se necesita que el medio de cultivo tenga las condiciones adecuadas, de acuerdo con el objetivo específico la propuesta del laboratorio ideal podría mejorar tanto en tiempos como en condiciones de asepsia. Este trabajo presentó la forma en que se optimiza exitosamente un cultivo *in vitro*, reduciendo tiempos mediante el uso de cursogramas analíticos permitiendo una mejor logística y claridad en la ejecución de la metodología.

En cuanto a los objetivos específicos con ayuda del diagrama realizado en AutoCAD se presentó una propuesta del acomodo ideal para un laboratorio dedicado al cultivo *in vitro* dentro de las instalaciones del IDIT de la Ibero Puebla y se determina que los cultivos *in vitro* abren una puerta grande para ayudar a la reforestación y preservación de especies vegetales.

El protocolo evaluado durante este proyecto permitió determinar que el medio MS cuenta con nutrientes necesarios para el crecimiento de los cultivos vegetales *in vitro*, de manera que la adición de fitohormona le otorga un ambiente favorable a la elongación de los segmentos nodales mostrando un porcentaje de supervivencia más alto con la fitohormona BAP siendo del 75%.

La realización del cuadro comparativo permitió determinar que la optimización fue exitosa ya que hubo una reducción de tiempo y distancia siendo 79 minutos y 44 metros.

Se espera continuar con la repetición del cultivo *in vitro* modificando los componentes del medio de cultivo para analizar su eficacia con el uso como alternativa de agente gelificante para el medio siendo el alginato o grenetina. Ambos enriquecidos con nutrientes que favorezcan las condiciones de crecimiento dentro de un ambiente artificial.

Se recomienda realizar pruebas cuantitativas para determinar la tonalidad del medio y de las hojas.

Referencias

- [1] Notimex, «Puebla ha perdido 30% de sus plantas medicinales,» 01 junio 2014. [En línea]. Available: <https://www.poblanerias.com/2014/06/puebla-ha-perdido-30-de-sus-plantas-medicinales/>.
- [2] B. P.-A. L. D. O.-M. Z. N.-J. G. Velázquez-Vázquez, «Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México,» 2019. [En línea]. Available: <https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.3.17>.
- [3] SEMARNAT, «Dalia, flor que colorea México,» 04 agosto 2020. [En línea]. Available: <https://www.gob.mx/agricultura/articulos/dalia-flor-que-colorea-mexico#:~:text=La%20Dalia%20contiene%20inulina%20que,as%C3%AD%20como%20bajar%20el%20peso>.
- [4] L. B. M. L. B. F. T. Elena Cristina Ciobanu, «Studies and research on the species and varieties of dahlia in cultivation, » 2021. [En línea]. Available: http://horticulturejournal.usamv.ro/pdf/2021/issue_1/Art93.pdf.
- [5] M. Rodríguez, «Cultivo *in vitro*: Alternativa al cultivo tradicional de plantas medicinales,» julio 2018. [En línea]. Available: <http://147.96.70.122/Web/TFG/TFG/Memoria/MIGUEL%20RODRIGUEZ%20AMARO.pdf>.
- [6] B. P.-A. L. D. O.-M. Z. N.-J. G. Velázquez-Vázquez, «Conocimiento etnobotánico sobre el uso de plantas medicinales en la Sierra Negra de Puebla, México,» 2019. [En línea]. Available: <https://doi.org/10.37360/blacpma.19.18.3.17>.
- [7] M. D. B.-M. V. V.-R. J. R.-L. M. C. G. Avelino-Flores, «Evaluación *in vitro* de la actividad citotóxica y antitumoral de plantas medicinales recomendadas en Cuetzalan del Progreso, Puebla, México,» 2019. [En línea]. Available: <https://doi.org/10.18387/polibotanica.47.9>.
- [8] M. D. Z. Nerway, «*In vitro* elimination of dahlia mosaic virus by using meristem culture, electrotherapy and chemotherapy,» 2020. [En línea]. Available: <https://doi.org/10.36103/ijas.v5i12.994>.
- [9] R·弗里姆M·阿萨拉夫, «Methods, formulations and articles of manufacturing for disinfecting substances, products and structures». China Patente CN101111152B, 2005.
- [10] C. R. Serrano, «Fungal strains, culture and use thereof as saprophytes and/or symbionts for the *in vitro* culture of plants». Patente WO2017131504A1, 2016.
- [11] T. D. W. W. H. Nur Kusmiyati, «Extraction and Identification of Inulin-Type Fructo-Oligosaccharides from *Dhalia pinnata* L, » 2018. [En línea]. Available: 30. 355-358. 10.14233/ajchem.2018.20965.

- [12] A. Castillo, «**Propagación de plantas por cultivo *in vitro*: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo,**» 2017. [En línea]. Available: <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/111219220807102417.pdf>.
- [13] A. Guerrero-Martínez, «**Aplicación de herramientas de control de calidad para la optimización del cultivo de células madre *in vitro*,**» 2019. [En línea]. Available: <https://rei.iteso.mx/bitstream/handle/11117/6116/TOG-APLICACI%C3%93N%20DE%20HERRAMIENTAS%20DE%20CONTROL%20DE%20CALIDAD%20PARA%20LA%20OPTIMIZACI%C3%93N%20DEL%20CULTIVO%20DE%20C%C3%89LULAS%20MADRE%20IN%20VITRO,%20INVESTIGACION%20DEL%20ESTADO%20DEL%20ARTE%20>.
- [14] M. T. A. Santos, «**Optimización de un medio de cultivo para la vitro propagación de Vanilla planifolia G. Jackson,**» diciembre 2019. [En línea]. Available: <https://repositorioinstitucional.buap.mx/handle/20.500.12371/11348>.
- [15] A. Ontaneda, «**Eficiencia del sistema de inmersión temporal frente al método de propagación convencional *in vitro*,**» 2020. [En línea]. Available: <http://remca.umet.edu.ec/index.php/REMCA/article/view/284>.
- [16] G. V. H. K. S. Z. E. A. S. Ileana Moreira González, «**Optimización de un protocolo de cultivo *in vitro* de embriones de Coyol (Acrocomia aculeata),**» 2019. [En línea]. Available: <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7450828>.
- [17] J. A. G. Nava, «**Optimización de un medio de cultivo para la germinación *in vitro* de semillas de Drosera Capensis,**» 2018. [En línea]. Available: <http://ri.uaemex.mx/handle/20.500.11799/110622>.
- [18] J. S. Sánchez, «**Estudio y optimización del proceso de propagación *in vitro* de Limonium sinuatum,**» 2018. [En línea]. Available: <https://repositorio.upct.es/handle/10317/7627>.
- [19] J. P. Chaves, «**Biotechnología vegetal: mejoramiento de cultivos ante el cambio climático,**» 11 noviembre 2021. [En línea]. Available: Biotechnología vegetal: mejoramiento de cultivos ante el cambio climático.
- [20] Hernández, «**Diagramas para estudio del trabajo,**» Apuntes tomados en clase Estudio del Trabajo. Universidad Iberoamericana de Puebla, México. Primavera de 2021
- [21] L. Jiménez, «**Metodología de propagación *in vitro* de Dahlia sp.,**» 2020. [En línea]. Available: <http://portal.amelica.org/ameli/jatsRepo/145/1451814007/1451814007.pdf>.