



Cultivo *in vitro* de plantas y su relación con la Biotecnología

El cultivo *in vitro* (término que literalmente significa *en vidrio*), incluye muchas técnicas destinadas a introducir, multiplicar y regenerar, entre otros recursos, material vegetal o animal en condiciones controladas y asépticas. El cultivo *in vitro*, constituye un paso fundamental en la obtención y regeneración de plantas genéticamente modificadas, o transgénicas, mediante técnicas de ingeniería genética. Es decir que existe una estrecha relación entre el cultivo de tejidos vegetales y la biotecnología moderna. Normalmente se utilizan cultivos de tejidos, seguido de la regeneración de la planta completa, y la subsiguiente expresión de los genes introducidos, o transgenes (Ver Cuaderno N° 5, 18, 28, 98).

Cultivo *in Vitro* de material vegetal

“Cultivo de tejidos vegetales” es una descripción genérica que involucra diferentes técnicas de cultivo de material vegetal diverso, incluyendo las de protoplastos (células desprovistas de su pared celular), células, tejidos, órganos y plantas completas. Mediante éstas y otras técnicas de cultivo, es posible obtener plantas libres de microbios en un medio nutritivo aséptico (estéril) en condiciones ambientales controladas (ver Cuaderno N° 56).

Las primeras experiencias relacionadas al cultivo de tejidos vegetales se remontan a 1902, pero recién en 1922 se logró el primer experimento exitoso: germinación *in vitro* de semillas de orquídeas. Luego de la germinación, las plántulas obtenidas se transfirieron a un medio de cultivo en condiciones asépticas, y así se mantuvieron protegidas del ataque de patógenos (hongos, virus y bacterias).

Esta técnica tiene numerosas aplicaciones (ver Cuadernos 5, 26, 56, 89, 93):

- Propagación masiva de plantas, especialmente beneficiosa para especies de difícil propagación por otros métodos, o en vías de extinción
- Clonación de individuos de características agronómicas muy deseables durante todo el año
- Obtención de plantas libres de virus
- Producción de semillas sintéticas
- Conservación de germoplasma: material de un conjunto de individuos que representa la variabilidad genética de una población vegetal
- Obtención de metabolitos secundarios
- Producción de nuevos híbridos
- Mejora genética de plantas, incluyendo obtención de plantas transgénicas
- Germinación de semillas.
- Producción de haploides.
- Estudios fisiológicos diversos.

Algunas de estas aplicaciones se ilustran en la Figura 1.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

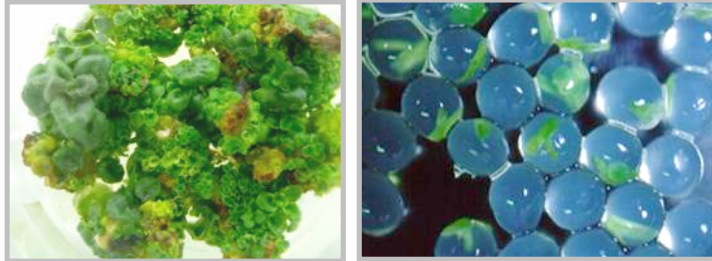


Figura 1. Aplicaciones del cultivo de tejidos en plantas. A la izquierda, micropropagación de violeta africana a partir de trozos de hojas desinfectados e introducidos en condiciones de esterilidad. A la derecha, semillas sintéticas formadas por embriones somáticos, obtenidos por cultivo de células, encapsulados en una matriz inerte (como alginato de calcio). Fotografía tomada de http://www.sp.edu.sg/schools/cls/bioline_08.htm

Las bases biológicas del cultivo de tejidos: la totipotencialidad celular

Antes de comenzar con la descripción del cultivo de tejidos vegetales y sus aplicaciones, se muestra la anatomía de una planta en la figura 2.

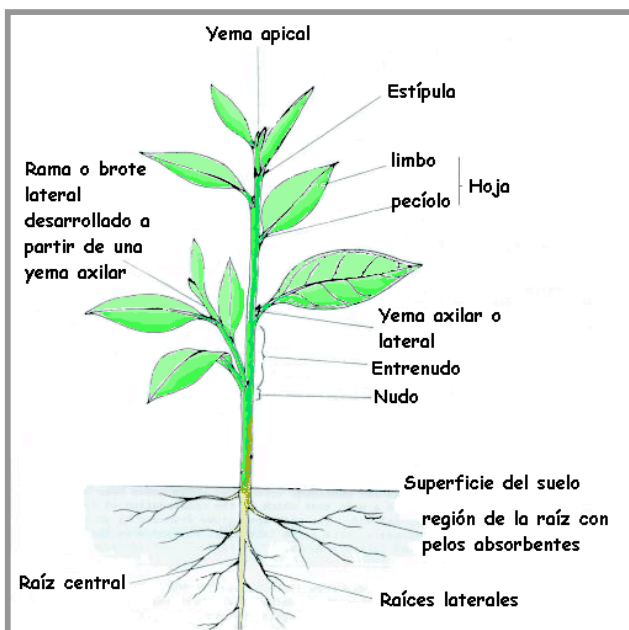


Figura 2: las partes de una planta angiosperma. Adaptado del Libro "Biotecnología", UNQ 2006.

Respecto del proceso de transformación vegetal, existen distintas técnicas para la transferencia de genes a las células vegetales, siendo las principales la interacción con bacterias del género *Agrobacterium* y el método de *Biobalística* (Cuadernos 18 y 28, respectivamente). Una vez realizada la transformación genética por alguno de estos dos métodos, el paso siguiente es el **cultivo *in vitro***, con el fin de regenerar plántulas a partir del explanto inicial transformado, proceso que se sustenta en el principio de **"totipotencialidad celular"** (ver Cuaderno N° 56, "El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



98). De aquí la importancia del cultivo *in vitro* como paso fundamental para la obtención y regeneración de plantas genéticamente modificadas (ver figura 3).

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

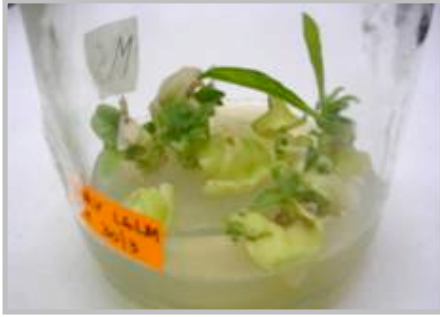


Figura 3. Cultivo de tejidos y transformación vegetal. En la figura se observan explantos que, luego del proceso de selección, han perdido coloración y, aquellas células transformadas exitosamente, se han dediferenciado y rediferenciado para dar origen a un brote (ver texto).

La reproducción asexual de plantas por cultivo de tejidos es posible gracias a que, en general, las células de un individuo vegetal poseen la capacidad necesaria para permitir el crecimiento y el desarrollo de un nuevo individuo, sin que medie ningún tipo de fusión de células sexuales o gametos. Esta capacidad se denomina *totipotencialidad celular* (ver Cuaderno N° 56, 70, 83), y es característica de un grupo de células vegetales conocidas como células meristemáticas, presentes en distintos órganos de la planta. Básicamente, la reproducción asexual se puede realizar debido a que las células vegetales poseen un mecanismo de división mitótico, al igual que las células animales, mediante el cual cumplen sucesivas etapas de crecimiento y desarrollo. La división celular mitótica implica una replicación de los cromosomas de las células hijas, por lo que las mismas poseen un genotipo idéntico al de la célula madre. La potencialidad de una célula diferenciada (una célula de conducción, epidérmica, etc.) para generar tejidos nuevos y eventualmente un organismo completo, disminuye con el grado de diferenciación alcanzado por esa célula, pero puede revertirse parcial o completamente según las condiciones de cultivo a las que se la someta (ver Cuaderno N° 70, 80, 83).

Así, las células vegetales crecidas en condiciones asépticas sobre medios de cultivo adicionados con hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- i) una *dediferenciación* celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células indiferenciadas denominada **callo**, la cual bajo las condiciones adecuadas es capaz de generar **órganos** o **embriones somáticos** (llamados así porque son estructuras similares a un embrión pero que no se originaron por unión de gametas),
- ii) una respuesta morfogenética por la cual se forman directamente órganos (**organogénesis**) o embriones (**embriones somáticos**).

La primera respuesta se conoce como **organogénesis** o **embriogénesis indirecta** (mediada por un estado de callo) mientras que la segunda respuesta se considera **organogénesis** o **embriogénesis directa**.

Como se comentó previamente, el cultivo *in vitro* consiste en tomar una porción de una planta (a la que se denomina **explanto**, como por ej. el ápice, una hoja o segmento de ella, segmento de tallo, meristema, embrión, nudo, semilla, antera,

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

etc.) y colocarla en un medio nutritivo estéril (usualmente gelificado, semisólido) donde se regenerará una o muchas plantas.

La formulación del medio cambia según se quiera obtener un tejido desdiferenciado (callo), crecer yemas y raíces, u obtener embriones somáticos para producir semillas artificiales.

El éxito en la propagación de una planta dependerá de lograr la expresión de la potencialidad celular total, es decir, que algunas células recuperen su condición meristemática. Para lograrlo, debe inducirse primero la desdiferenciación y luego la rediferenciación celular. Un proceso de este carácter sucede durante la formación de las raíces adventicias en el enraizamiento de estacas, la formación de yemas adventicias o cuando se busca la propagación de Begonias, Violeta africana (ver figura 1) o Peperonias mediante porciones de hojas. Entre los factores más importantes a tener en cuenta para lograr la respuesta morfogénica deseada, es la composición del medio de cultivo.

En todo intento de propagación vegetal, ya sea *in vitro* o *in vivo*, el carácter del proceso de diferenciación depende del genoma de la especie, y está regulado por el balance hormonal propio y por el estado fisiológico del órgano, tejido o célula puesta en cultivo. Sin embargo, también se sabe que ese balance puede ser modificado por el agregado de compuestos que imiten la acción de las hormonas vegetales. Esos compuestos, denominados **reguladores del crecimiento**, son los que se emplean en los medios de cultivo para conseguir la micropropagación de una planta

Pasos para generar plantas a partir de explantos aislados

En los protocolos utilizados durante el cultivo *in vitro*, se pueden distinguir las siguientes etapas (sintetizadas en la figura 4):

- 1) Elección de la planta y/o tejido donante de explantos.
- 2) Establecimiento: desinfección de los explantos (generalmente con hipoclorito de sodio) y su posterior adaptación al medio artificial de modo de inducir callo, brote, raíz o embrión somático, según se desee.
- 3) Multiplicación: generar una masa vegetal suficiente para la regeneración del número de plantas necesarias.
- 4) Enraizamiento: formación de raíces con el fin de convertir los brotes o embriones somáticos en plántulas completas.
- 5) Rusticación: aclimatación de las plántulas obtenidas *in vitro* a las condiciones medioambientales *ex vitro* (suelo o algún sustrato inerte)

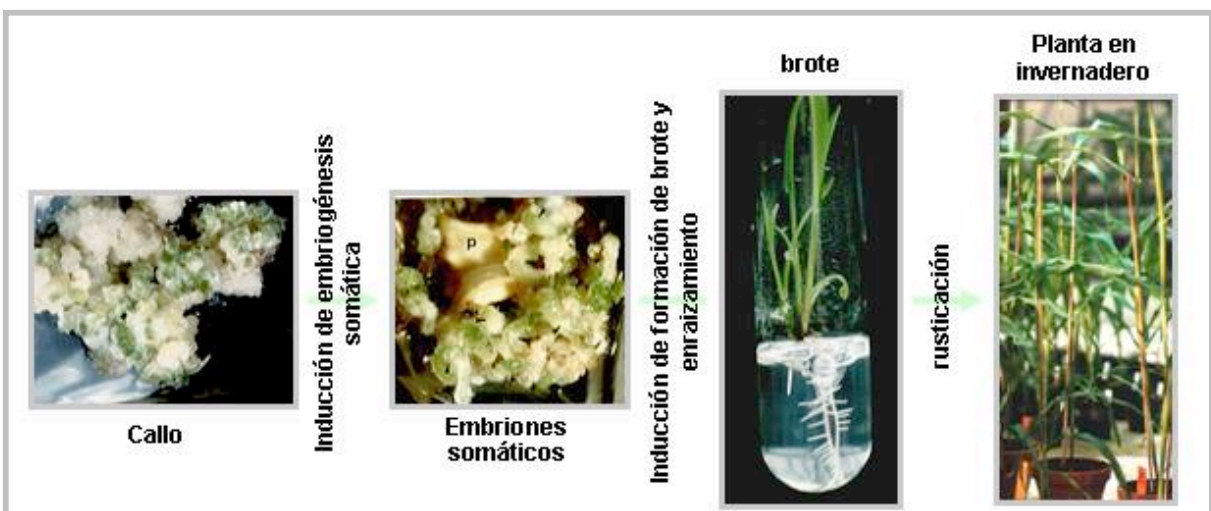


Figura 4. Etapas de la regeneración in Vitro de maíz.

Fuentes: <http://www.cid.csic.es/departaments/genetica/torne/indexC.html> y http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e28_2/maize.html

El éxito de la técnica depende de muchos factores, entre ellos la edad de la planta (a mayor edad, menor potencial de regeneración), el genotipo y las condiciones mediambientales. Entre las ventajas del cultivo *in vitro* de material vegetal, se pueden incluir los tiempos más cortos, y la posibilidad de ocupar un espacio mucho más pequeño que si se desea propagar material *in vivo* (ver Cuaderno N° 98).

Algunos elementos necesarios para hacer cultivo de tejidos vegetales



Para llevar adelante este trabajo, se necesitan equipamientos que generen las condiciones necesarias de esterilidad, como los **flujos laminares**, que son estaciones de trabajo que hacen circular aire filtrado y estéril, protegiendo así a la muestra con la que se desea trabajar (figura 5).

Figura 5. Flujos laminares para el cultivo de tejidos. Se observa uno de los modelos de flujo laminar que puede usarse para preservar la esterilidad de las muestras. Imagen: www.jaelsa.com/laboratorio4.html

Además, se necesita un soporte para el explanto, que puede ser sólido o líquido, y que está conformado por algún agente gelificante inerte (agar, *gelrite*, etc.), macro y micronutrientes esenciales para la supervivencia de la planta, nutrientes (hidratos de carbono, vitaminas), agentes reguladores del crecimiento y hormonas vegetales (ver Tabla 1) que ayudarán a obtener una planta completa, o un órgano vegetal en particular, a partir del explanto elegido (en condiciones de esterilidad). Algunos de los elementos mencionados pueden ser reemplazados por mezclas poco definidas en su composición (jugo de tomate, agua de coco, etc.), que pueden dar buenos resultados y generalmente resultan más económicas. La acidez de los medios de cultivo para plantas suele variar entre pH=5 y 6,5.

Luego, se regulan las condiciones de temperatura, y de fotoperíodo (relación de horas luz y horas oscuridad).

Según sea el balance hormonal y otras condiciones de cultivo, se puede propiciar la regeneración de distintos órganos o formaciones vegetales. Por ej., si el balance de citoquininas/auxinas (ver Tabla 1) es mayor a 1, se favorece la generación de brotes; si es menor a 1, la generación de raíces; si es igual a 1, la formación de callos.

Tabla 1. Composición de medios de cultivo para células vegetales

Componentes	Características y ejemplos
-------------	----------------------------

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

Agua destilada	Representa el 95% del medio nutriente
Fuente de carbono	Generalmente se usa sacarosa. La fuente de carbono se necesita porque los explantos no son completamente autótrofos, y no pueden cubrir sus necesidades con la fotosíntesis que pueden realizar <i>in Vitro</i>
Sustancias inorgánicas	Macroelementos (N, P, K, Ca, Mg, S) y microelementos (Fe, Co, zn, Ni, B, Al, Mn, Mo, Cu, I), en una proporción adecuada para la planta elegida.
Vitaminas	Vitaminas B1, B2, B6, vitamina H, vitamina E, ácido fólico, ácido nicotínico, entre otras.
Hormonas y reguladores del crecimiento	Auxinas: promueven la elongación celular, la formación de callos y raíces adventicias, inhiben la formación de brotes axilares adventicios y, a veces, inhiben la embriogénesis. Citoquininas: promueven la división celular, regulan el crecimiento y el desarrollo de los tejidos vegetales Otras: giberelinas, ácido abscísico, etileno.
Mezclas de sustancias poco definidas	Ejemplos: extracto de levadura, extractos vegetales.
Materiales inertes	Usados como soporte. Incluyen agar, azarosa, otros polisacáridos, lana de vidrio, papel de filtro, arena.

Adaptada del Libro *Biotecnología*, UNQ 2006.

Relación del cultivo *in Vitro* con la Biotecnología

La micropropagación

La propagación de plantas *in vitro* es una técnica de la biotecnología muy utilizada en cultivos de importancia económica. Como fue mencionado anteriormente permite cultivar células, tejidos, órganos, semillas, embriones y obtener individuos selectos en forma rápida. Los cultivos son realizados por personal especializado, con agentes específicos (hormonas, minerales, vitaminas, fuente de carbono, agente gelificante, agua, etc.) y en condiciones ambientales controladas (temperatura, humedad y luz) (figura 6). Una vez ajustados los protocolos para la especie o cultivo de interés, es posible automatizar el proceso de modo de llevarlo a escala industrial.

La micropropagación (propagación clonal por cultivo *in vitro*) constituye uno de los métodos biotecnológicos que mayores logros ha aportado al desarrollo de la agricultura. Se aplica en la producción masiva de especies hortícolas, aromáticas, medicinales, frutícolas, ornamentales y forestales.

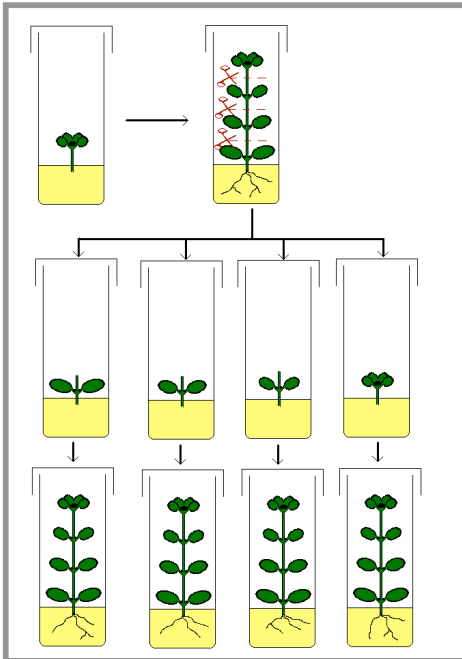
Ventajas de la micropropagación

- Posibilita incrementar rápidamente nuevos materiales.
- Permite controlar las condiciones ambientales,
- Permite estudiar diversos procesos fisiológicos
- Evita el riesgo de que proliferen agentes patógenos (se realiza en medios esterilizados).
- Se pueden obtener gran cantidad de individuos en espacios reducidos.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

- Permite la obtención de individuos uniformes.
- Facilita el transporte del material.

Figura 6. La micropropagación vegetal. A partir de una planta madre, se obtienen numerosos explantos que, sujetos a condiciones y medios de cultivo adecuados, darán lugar a nuevas plantas iguales o similares a la planta original, permitiendo su multiplicación. Adaptado de "Biotecnología",



UNQ 2006

Cultivo de meristemas

En la yema apical se encuentra un grupo de células que conforman el meristema apical (con un tamaño entre 0,01 y 0,3 mm). Es un tejido embrionario que tiene la capacidad de formar todos los tejidos de la planta y regenerar plantas

completas (figura 7).

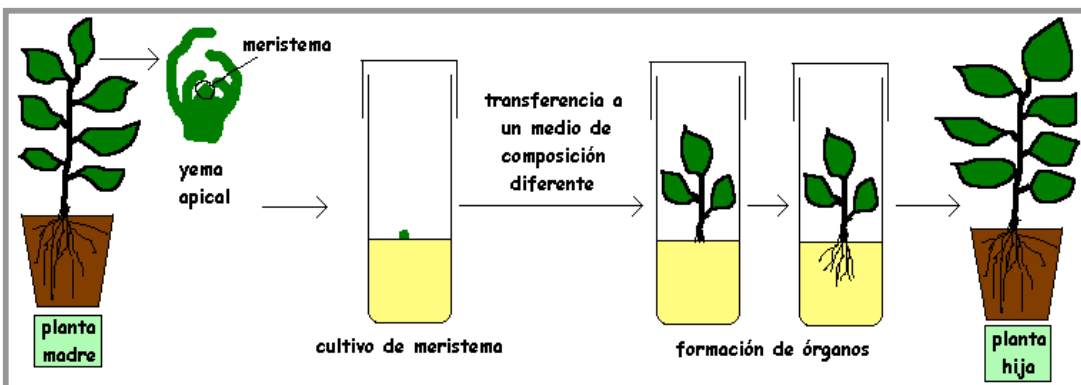


Figura 7. Cultivo de meristemas. a partir de un meristema aislado, se puede obtener una planta completa. Adaptado de "Biotecnología", UNQ 2006

El cultivo de meristemas tiene numerosas aplicaciones. Una de las más importantes, es la obtención de plantas libres de virus, ya que esta pequeña zona de tejido generalmente no está afectada por estos patógenos vegetales. Otra aplicación es la multiplicación vegetal de enorme potencial: a partir de una yema apical, se pueden obtener 4 millones de claveles en un año.

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.

La técnica permite multiplicar especies de plantas con reproducción lenta o dificultosa (como las orquídeas), o acelerar la producción de plantas bianuales.

Cultivo de células y órganos vegetales en biorreactores

Una vez obtenidos los callos a partir de algún explanto, los mismos pueden disgregarse para obtener una suspensión de células. La misma puede utilizarse para generar embriones somáticos (la base de las semillas sintéticas), o puede directamente cultivarse para producir metabolitos secundarios, que son compuestos químicos sintetizados por las células vegetales en determinadas condiciones, con gran utilidad para las industrias farmacéutica y alimenticia, entre otras (ver Cuadernos 17, 21, 25, 29, 45, 49, 51, 52). Por ejemplo, son metabolitos secundarios el mentol y las drogas anticancerígenas vincristina y taxol, algunos edulcorantes, entre otros. Los cultivos celulares se llevan a cabo en biorreactores, que son recipientes de distinta capacidad (de unos pocos a miles de litros), diseñados para propiciar el crecimiento y/o la multiplicación de distinto tipo de células y/u órganos (figura 8).

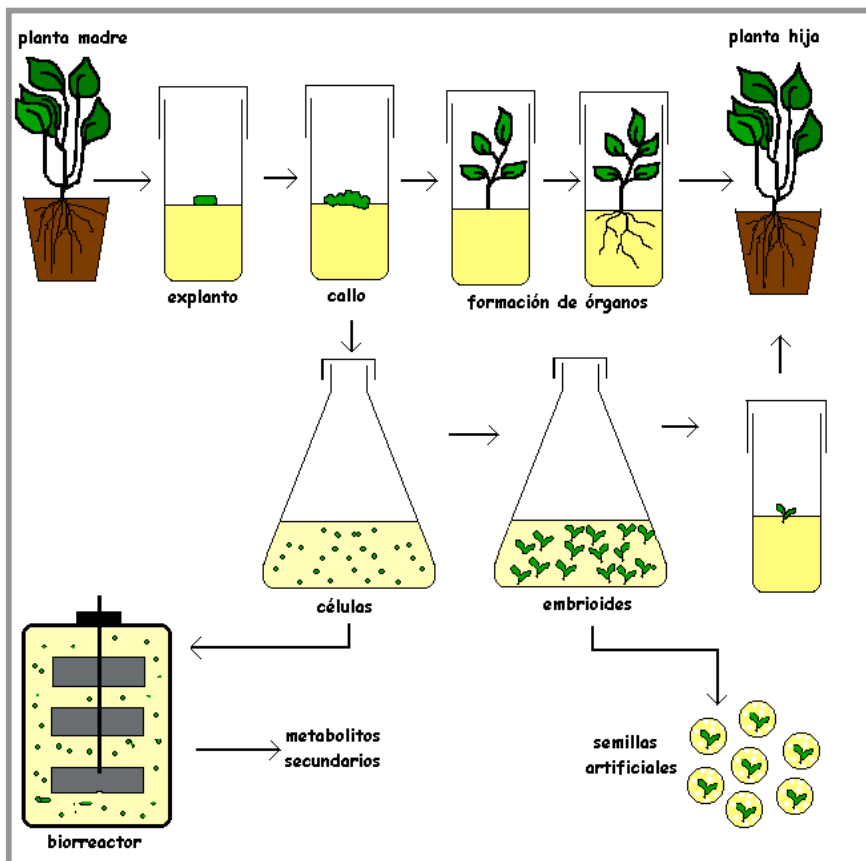


Figura 8. Cultivo de células y órganos vegetales. A partir de un explanto, se pueden establecer cultivos de células para producir compuestos de interés, o para obtener embriones somáticos y semillas artificiales, entre múltiples aplicaciones. Adaptado de "Biotecnología", UNQ 2006

Las raíces vegetales también pueden ser cultivadas en biorreactores, especialmente aquellas transformadas por *Agrobacterium rhizogenes*, que produce un aumento

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



abrupto en el tamaño y ramificación de la raíz, aumentando así la biomasa, y por ende la cantidad de producto deseado. Un ejemplo de compuesto farmacológico producido por cultivo de raíces es el paclitaxel, o taxol, que es utilizado como anticancerígeno.

CONSIDERACIONES METODOLÓGICAS

El tema desarrollado en este Cuaderno se vincula con conceptos previos que los alumnos poseen, probablemente de la vida cotidiana, como es la multiplicación de plantas que pueden realizar en su propio jardín o huerta. Es importante retomar en clase estas ideas previas y trabajarlas a partir de los conceptos teóricos que se presentan en el Cuaderno. Esto se verá favorecido con el análisis de textos y con la realización del trabajo práctico que se propone, el cual puede llevarse a cabo en la escuela, con materiales cotidianos y en forma sencilla.

Si estos temas se incluyen al trabajar el tema reproducción, es interesante que los alumnos puedan establecer similitudes y diferencias entre los diferentes tipos y mecanismos de reproducción que presentan las plantas y los animales. Se pueden incluir conceptos tales como: órganos reproductivos, células sexuales, meiosis, mitosis, fecundación, gestación, semilla, útero, etc.

Los temas vinculados con las plantas y su crecimiento se abordan habitualmente desde los niveles inferiores de la enseñanza escolar, particularmente a partir de experiencias de germinación de semillas, o del estudio de la fotosíntesis. Sin embargo, los conceptos vinculados con el ciclo de vida de las plantas suelen ser temas complejos y que, en ocasiones, llevan a errores conceptuales. Entre ellos, uno de los más frecuentes entre los alumnos es la confusión entre los procesos de fotosíntesis y respiración en las plantas, o la poca claridad en cuanto a la relación entre la flor, el fruto y la semilla.

Si bien este Cuaderno no está destinado específicamente a trabajar esos conceptos, es importante clarificarlos, y se pueden incorporar al estudiar la reproducción en animales, en el ser humano, y comparar las estructuras y procesos que involucran. La comprensión de estos procesos permite interpretar cómo la biotecnología podría intervenir en su modificación (ver Cuaderno N° 70).

Otro aspecto que es posible trabajar con los alumnos se refiere al concepto mismo de la clonación. Habitualmente, se considera la clonación una técnica nueva debido, fundamentalmente, a la difusión que recibió en los medios de comunicación la clonación de la oveja Dolly. Es interesante interpretar la clonación de plantas como un procedimiento antiguo (que, de hecho, realizan en sus casas al cortar un gajo de una planta) y, a su vez, plantear las diferencias que presenta con la clonación de animales cuyas células difieren en cuanto a su totipotencialidad.

Este Cuaderno, a su vez, resulta una fuente interesante de información que se puede adaptar al aula en trabajos más simples destinados a comprender cómo

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



trabajan los investigadores, cómo se realiza un cultivo de células y cómo es posible observar células.

Se sugiere introducir estas ideas a partir de conocimientos más cotidianos que tienen los alumnos. Por ejemplo, es posible que a muchos alumnos se les haya practicado en alguna oportunidad un exudado de fauces, como consecuencia de una infección o dolor de garganta. Se puede utilizar este caso para explicar qué hace luego el médico con esa muestra, cómo se hace el cultivo de células en el laboratorio de análisis, la detección de bacterias y la realización de un antibiograma para determinar el antibiótico a recetar. Esta sería una aplicación práctica y más próxima a los alumnos que podría acercar el concepto de cultivo de células y su utilidad, más allá de su uso en la investigación básica. Para trabajar estas ideas se sugiere realizar una experiencia simple de cultivo de microorganismos (ver Actividades Cuaderno N° 80). Si se cuenta con microscopios se puede intentar hacer un preparado a partir de esas colonias y verlo al microscopio con la idea de detectar células individuales. Y, si en la escuela cuentan con preparados de células, vegetales o animales, es interesante realizar la observación al microscopio, el registro de lo observado y su interpretación.

Actividades

Actividad 1. Integración de conceptos

Ordenar temporalmente las siguientes etapas de un protocolo de cultivo *in vitro* para transformación genética de una variedad vegetal para la cuál no existe experiencia previa.

- Elegir la combinación de hormonas que regenera mayor cantidad de brotes nuevos
- Observar la respuesta morfogénica de los distintos explantos
- Transformar genéticamente la variedad vegetal evaluada
- Colocar los explantos en medio de cultivo estéril conteniendo sales, vitaminas, reguladores del crecimiento y distinta concentración de hormonas vegetales
- Desinfectar superficialmente una porción de la planta elegida
- Separar distintos explantos (meristemas, porciones de hojas, porciones de entrenudos)

Rpta. correcta:

1. Desinfectar superficialmente una porción de la planta elegida
2. Separar distintos explantos (meristemas, porciones de hojas, porciones de entrenudos)
3. Colocar los explantos en medio de cultivo estéril conteniendo sales, vitaminas, reguladores del crecimiento y distinta concentración de hormonas vegetales
4. Observar la respuesta morfogénica de los distintos explantos

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



5. Elegir la combinación de hormonas que regenera mayor cantidad de brotes nuevos
6. Transformar genéticamente la variedad vegetal evaluada

Actividad 2. Trabajo Práctico: “Germinación de porotos de soja *in vitro*”

Esta actividad experimental incluye varios pasos, por lo que se sugiere una lectura previa con los alumnos de toda la experiencia, antes de ir al laboratorio para interpretar cada etapa, familiarizarse con la metodología a emplear, conocer los objetivos de la experiencia, y las observaciones y registros que deberán realizar. Al llegar al laboratorio, es importante identificar los materiales, organizar la tarea y ordenar el trabajo en los grupos de manera de hacer un trabajo seguro y controlado tomando todos los recaudos necesarios, fundamentalmente, al trabajar con fuego. Si los grupos deben compartir elementos de trabajo, es importante que el docente ordene los grupos para trabajar de manera organizada, sin que se amontonen alumnos y se corran riesgos.

a. Preparación de medio de cultivo

Materiales:

- 1 sobre de gelatina sin sabor, cantidad para 1 litro de gelatina. **Nota: en el práctico se lo disuelve con menos líquido para que resulte más consistente.**
- 20 g de azúcar
- 750 ml. de agua caliente
- Mechero de Bunsen
- Olla a presión
- 2 botellas de litro de vidrio resistente al calor, con tapa

Procedimiento

1. Dividir el agua en dos botellas de litro de vidrio y agregar la gelatina sin sabor de forma equitativa en los dos frascos.
2. Agregar en cada frasco 10 g de azúcar y mezclar hasta que la mezcla quede homogénea.
3. Esterilizar en olla a presión durante 20 minutos con las tapas de los frascos flojas **Nota: si las botellas están cerradas corren riesgo de explosión. Nunca llenar las botellas por completo con el medio de cultivo porque se derramará y además no alcanzará la temperatura de esterilización necesaria.**
4. Apagar el fuego y dejar que se iguale la presión interna de la olla con el exterior.
5. Abrir la olla y cerrar las botellas.

b. Preparación de material de vidrio para distribuir el medio de cultivo

Materiales: Frasquitos de vidrio estériles con tapa

Procedimiento

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



1. Distribuir 50 o 100 ml de medio de cultivo, preparado y esterilizado, en los frasquitos (según el volumen de los mismos).
2. Realizar este procedimiento por delante de un mechero prendido, abriendo los frascos y botella cerca de la llama (**no hablar ni soplar para no contaminar**).
3. Distribuir e inmediatamente cerrar los frascos también cerca de la llama.
4. Dejar que la preparación se solidifique y enfríe.

c. Desinfección de granos o porotos de soja

Materiales:

- Granos de soja comercial
- Alcohol 70% (70 ml de alcohol diluido en 30 ml de agua)
- Lavandina 20% (20 ml de lavandina comercial diluida en 80 ml de agua)
- Agua estéril (esterilizar de la misma forma que el medio de cultivo)
- Pinza de metal
- Recipientes bien limpios para desinfectar las semillas

Procedimiento

1. Usando una pinza estéril, pasar los granos de soja durante un minuto por una solución de alcohol 70%.
2. Luego sumergirlos en lavandina al 20% durante 15 minutos y por último, darles 4 lavados en agua estéril.

Nota: Tanto para la desinfección como para la siembra, la pinza se esterilizará de la siguiente manera: mojar la pinza en alcohol puro, quemarla a rojo en el mechero, dejar enfriar. Esto se realizará al inicio de cada etapa que requiera el uso de la pinza. Si la pinza se usa muchas veces para lo mismo, solo se mojará la pinza con alcohol y se quemará sin llevar a rojo. No usar guantes mientras se trabaja con el mechero.

d. Siembra

1. Sembrar con pinza estéril 4 granos por frasco de modo que el hilio (punto oscuro) quede hundido en el medio de cultivo y el resto del grano por encima del mismo.
2. Asegurarse de que los porotos queden firmes o agarrados al medio pero no totalmente hundidos (por lo menos la mitad del poroto debe salir hacia la superficie, de lo contrario no germinará). **Nota:** Esta etapa se realizará cerca del mechero. Esterilizar la pinza cada vez que tomo un nuevo grano
3. Tapar cada frasco con papel film (el de envolver alimentos) y dejar a una temperatura entre 24 ° y 26° (no debe ser menor a 20°C), en un lugar donde reciba luz directa durante el día.

e. Observaciones y Registro

Desde el comienzo de la actividad se aconseja que los alumnos diseñen un cuadro de 10 filas en el cual registrarán los cambios que observen durante 10 días:

- Si hay *imbibición* de las semillas (si absorben líquido y se hinchan);

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



- Si hay emergencia de raíces
- Cuál es la longitud de la raíz y cómo va variando a lo largo de los días.
- Una vez obtenida la germinación completa, se le pedirá a los alumnos distinguir los cotiledones (hojas de reserva) del resto de las hojas, si hay presencia de pelos en las hojas, etc.

Preguntas para el análisis de la experiencia:

1. ¿Qué contiene un medio de cultivo?
2. ¿Por qué se esteriliza el medio de cultivo?
3. ¿Cómo se esteriliza el medio de cultivo cuando se prepara y cuando se vierte en los frascos?
4. ¿Por qué se deben esterilizar las semillas?
5. ¿Por qué debe colocarse la semilla con el hilio hacia el medio de cultivo?
6. ¿Cuáles son las condiciones de crecimiento requeridas por estas semillas?

Respuestas:

1. Sustancias nutritivas, por ejemplo, azúcar, para los embriones que se desarrollan en las semillas, o para cualquier organismo que crezca en ese medio.
2. El medio de cultivo se debe esterilizar para eliminar cualquier agente extraño, como microorganismos, que puedan haberlo contaminado y que podrían alterar los resultados de la experiencia.
3. Se esteriliza con calor. Al prepararlo se lo coloca en una olla a alta presión y al verterlo se lo coloca cerca de la llama de fuego.
4. El objetivo es desinfectarlas para que las plantas crezcan libres de patógenos.
5. El hilio es el punto que queda después de separar la semilla del tallo, y por donde crecen las raíces.
6. Una temperatura moderada (24-26°C) y luz, para realizar la fotosíntesis.

Material de consulta

1. Reproducción sexual y ciclos de vida. Hipertextos del área de la biología. Universidad Nacional del Nordeste. Argentina. Incluye ilustraciones y animaciones del ciclo de las plantas. <http://fai.unne.edu.ar/biologia/reproduccion/sexual.htm#INDICE>
2. Biología. Curtis H & N.S.Barnes. Biología. 6° Ed. en español. 2000.
3. Biotecnología y mejoramiento vegetal. Echenique V., Rubinstein C., Mroginski L. (eds.). 2004. Buenos Aires. Ediciones INTA.
4. "El gran escape de la planta". Extensión de la Universidad de Illinois. Sitio con recursos para enseñar a niños pequeños acerca de las plantas, su estructura y ciclo de vida. http://www.urbanext.uiuc.edu/gpe_sp/index.html
5. Muñoz de Malajovich, M. A. (2007) Biotecnología. Editorial Universidad Nacional de Quilmas.
6. Plantas transgénicas. En español - European Initiative for Biotechnology Education. <http://www.ipn.uni-kiel.de/eibe/UNIT09ES.PDF>

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.



7. Microbios y moléculas; Apéndice 2. Técnicas microbiológicas. Incubación de cultivos. Tratamiento y esterilización del material utilizado. En español. European Initiative for Biotechnology Education. <http://www.ipn.uni-kiel.de/eibe/UNIT01ES.PDF>
8. Barthelemy R, Dawson J, Lee A (1977) Técnicas para el laboratorio de biología. Compañía Editorial Continental
9. Devlin, R. (1976) Fisiología vegetal. Editorial Omega.
10. Pierik, R.L.M. (1987) *In vitro* culture of higher plants. Editorial Martinus Nijhoff Publishers
11. Strasburger, E. (1981) Tratado de Botánica. Editorial Marin

"El Cuaderno de Por Qué Biotecnología" es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico del Programa Educativo Por Qué Biotecnología. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología.