



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **Un modelo pedagógico para la enseñanza de la producción biotecnológica de material vegetal**

**Carlos Alberto Delgado**

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2012

Un modelo pedagógico para la enseñanza de la producción biotecnológica de material vegetal

## **Carlos Alberto Delgado**

Trabajo de investigación presentado como requisito parcial para optar al título de:

**Magister en la Enseñanza de las Ciencias Exactas y Naturales**

Director a:

MSc., Emira Garcés de Granada

Línea de Investigación:

Enseñanza de la biotecnología

Universidad Nacional de Colombia

Facultad de Ciencias

Bogotá, Colombia

2012



"... la educación no es algo que haga el maestro, sino que es un proceso natural que se desarrolla espontáneamente en el ser humano. No se adquiere escuchando palabras, sino en virtud de las experiencias que el niño realiza en su medio ambiente. La tarea del maestro no es hablar, sino preparar y organizar una serie de motivos para la actividad cultural en un ambiente especialmente preparado para el niño"

(María Montessori)



## **Agradecimientos**

El autor quiere expresar sus agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia por la oportunidad que me brindó para aprovechar su infraestructura académica, su calidad y prestigio durante el desarrollo de esta Maestría. Agradezco especialmente a la Profesora MSc. Emira Garcés de Granada, de la Universidad Nacional de Colombia, por su dirección, asesoría y motivación para alcanzar los objetivos propuestos en este trabajo. Igualmente quiero agradecer a Ivonne Cubillos González, mi esposa quien junto con mis hijos Nataly Andrea y Diego Alejandro siempre estuvieron a mi lado expresando su apoyo incondicional.





## Resumen

La biotecnología vegetal tiene un gran potencial para aportar en la solución de problemas mundiales de alto impacto como el déficit alimentario que se prevé, la producción de materiales para la salud, la industria y la preservación ambiental. De ahí la importancia de introducirla en la enseñanza de la educación básica y media, para que las generaciones futuras puedan hacer un uso adecuado de sus productos y aplicaciones, tomando decisiones responsables en cuanto a políticas públicas y de impacto ambiental. El cultivo de tejidos vegetales “in vitro” es una oportunidad para desarrollar competencias laborales en los jóvenes de la educación media, lo que genera retos para el diseño y desarrollo de herramientas pedagógicas novedosas y creativas que estimulen el pensamiento complejo en los estudiantes. El trabajo por proyectos es una de ellas ya que puede ayudar a resolver problemas reales mediante el trabajo en equipo, la búsqueda de información, la formación para el trabajo y el acercamiento a los conocimientos y procedimientos científicos.

**Palabras clave: micropropagación, cultivos vegetales, alimentos transgénicos, aprendizaje, enseñanza**

## Abstract

Plant biotechnology has a great potential to solve global problems such as high impact food deficit is expected, the production of materials for health, industry and environmental preservation. Hence the importance of introducing biotechnology in basic and secondary education; so that future generations can make an appropriate use of their products and applications, making responsible decisions about public policies and environmental impact. The plant tissue culture "in vitro" is an opportunity to develop labor skills in secondary education students to generate challenges in the design and development of innovative and creative teaching tools that encourage thinking in high level students. Project work is one of the best teaching strategies because it can help to solve real problems through teamwork, the searching of information, and the approach to knowledge and scientific procedures.

**Keywords:** micro propagation, crops, GM food, learning, teaching

## Contenido

Pág.

Resumen V

Lista de figuras IX

Lista de tablas X

Introducción 1

1. Historia de los cultivos vegetales “in vitro” 5

1.1 La ingeniería genética en la historia de la biotecnología vegetal 8

2. La biotecnología vegetal 13

2.1 Biotecnología 13

2.2 Biotecnología vegetal 13

2.3 Mejoramiento de las plantas 14

2.3.1 Mejoramiento tradicional 14

2.3.2 Mejoramiento Genético 14

2.4 Cultivo de tejidos vegetales “in vitro” 15

2.4.1 Micropropagación 17

2.4.2 Cultivo de meristemos 20

2.4.3 Conservación de germoplasma 21

2.4.4 Producción de plantas haploides 23

2.4.5 Rescate de embriones 23

2.4.6 Variación somaclonal (Selección “in vitro”) 24

---

2.4.7	Mutagénesis	24
2.4.8	Hibridación somática	26
2.4.9	Ingeniería genética	26
2.4.10	Metabolitos secundarios	30
2.5	El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales “in vitro”	31
2.5.1	Distribución del laboratorio	31
1.	Area de lavado y esterilización	32
2.	Area de Preparación de medios	32
3.	Area de transferencia	32
4.	Area de incubación	33
5.	Area de observación y examen	34
2.5.2	Proceso de trabajo en el laboratorio	34
1.	Esterilización y asepsia	36
1.	Preparación del medio de cultivo	37
2.	Siembra e inoculación	40
3.	Enraizamiento y aclimatación	41
3.	Enseñanza de la biotecnología vegetal en la educación media	43
3.1	Porque enseñar biotecnología	43
3.2	Algunas propuestas existentes	45
3.3	Modelo para enseñar biotecnología vegetal	46
4.	Conclusiones	51
	Bibliografía	55



## Lista de figuras

Pág.

<b>Figura 1-1:</b>	Escenas costumbristas egipcias extraídas de pinturas murales de mastabas de nobles funcionarios.....	5
<b>Figura 2-1:</b>	Fotografía de plántula de <i>Hylocereus triangularis</i> (pitaya) obtenida in vitro mediante la técnica de rescate de embriones.....	16
<b>Figura 2-2:</b>	Esquema del proceso de micropropagación de las plantas “in vitro” . .....	18
<b>Figura 2-3:</b>	Fotografía de callos y brotes de <i>Dianthus caryophyllus</i> (clavel), obtenidos mediante la siembra de meristemos. ....	20
<b>Figura 2-4:</b>	Estructura del T-DNA según Díaz et al. (2010). ....	28
<b>Figura 2-5:</b>	Diagrama que representa la transformación genética de las plantas mediante <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	28
<b>Figura 2-6:</b>	Cámara de flujo laminar (Flujo de aire horizontal) .....	33
<b>Figura 2-7:</b>	Fotografía de frascos inoculados en el cuarto de incubación y crecimiento.....	34
<b>Figura 2-8:</b>	Diagrama de flujo del proceso de trabajo en el laboratorio de cultivo de tejidos in vitro	35
<b>Figura 2-9:</b>	Fotografía del calentamiento del medio junto con el agente gelificante.....	39
<b>Figura 2-10:</b>	Fotografía de la inoculación del explante en el medio de cultivo .....	41

## Lista de tablas

Pág.

<b>Tabla 2-1:</b> Entidades colombianas que manejan bancos de germoplasma vegetal, bajo condiciones “ <i>ex situ</i> ” .....	22
<b>Tabla 2-2:</b> Medios básicos usados actualmente. ....	37
<b>Tabla 2-3:</b> Funciones principales de los micronutrientes (Epstein y Bloom, 2004). ....	38

## Introducción

El cultivo de tejidos vegetales ha sido de gran importancia para los avances actuales de la biotecnología vegetal, pues han sido una de las herramientas más importantes, para las investigaciones en el campo del mejoramiento vegetal y la biología molecular en la segunda mitad del siglo XX. Fue en esos años cuando las técnicas de micropropagación fueron perfeccionadas, ayudando a que los estudios no requirieran grandes espacios para estudiar la propagación y cultivos de plantas en la búsqueda de mejores variedades en cuanto a productividad y resistencia a factores adversos bióticos y abióticos. De esta manera el trabajo de fitomejoramiento contó con una herramienta que ayudó al gran avance de la agricultura actual.

La industrialización agrícola que alcanzó su máxima expresión a mediados del siglo pasado, lo que se denominó *la revolución verde*, se pensaba era la solución para el suministro alimenticio que demandan los seres humanos en un desbordado crecimiento que no parece detenerse, sin embargo como toda actividad humana trajo consecuencias nada benéficas para el ecosistema del planeta, no solo por los residuos lanzados al ambiente, sino por la cantidad pues eran directamente proporcionales a la producción agrícola aumentada. Ello sumado al crecimiento de la conciencia ambiental ha hecho que se busquen otras formas de producción más limpias, pero sin perder la productividad e inclusive incrementándola. Es así como para finales de siglo el mejoramiento a través de los cultivos vegetales y la ingeniería genética están cambiando la agricultura nuevamente, utilizando las técnicas de micropropagación generando una mayor cantidad de plantas que con las técnicas tradicionales.

Las técnicas de los cultivos in vitro empezaron a desarrollarse hace ya más de un siglo, empezando el siglo XX, y ya para los años setenta eran la base de la agroindustria actual. Sin embargo nacieron en los países desarrollados, los países en vías de desarrollo y los llamados del tercer mundo aun están en proceso de estudiarlas y aplicarlas; por la misma razón quién mayor provecho ha sacado de ellas han sido las multinacionales de la agroindustria que no son mucho más de una decena, lo que significa que los países desarrollados donde se encuentran dichas compañías producen la mayor parte de los alimentos del mundo y la dependencia de los demás países no ha cambiado mucho con respecto a lo que sucedía hace medio siglo. Algunos países emergentes como Brasil, Argentina, India y China han logrado grandes avances especialmente en la producción, con el uso de los cultivos transgénicos, los que sin embargo han generado una fuerte división de opiniones acerca de su impacto ambiental y los posibles riesgos para la salud.

Muchos países con problemas de suministro alimenticio, pero a su vez con una gran riqueza en biodiversidad, ven la oportunidad en la biotecnología vegetal de aprovechar tales recursos, teniendo en cuenta esto países como Colombia, Costa Rica, Chile, Perú entre otros en América Latina, están trabajando fuertemente en la investigación y la educación para adaptar tecnologías como las de los cultivos in vitro para buscar sanidad y productividad de sus cultivos más representativos como: café, caña de azúcar, palma, bananos, frutales, tubérculos, etc. Lo que permite un atractivo potencial de investigación y aplicación.



Las biotecnologías están pasando de ser estudiadas en las instituciones de educación superior, hacia los niveles de básica y media donde presentan oportunidades de diversificación de conocimientos y reflexiones de tipo pedagógico y didáctico para acercarla a los jóvenes y niños, con el objetivo no solamente de enseñarles nuevos contenidos o diferentes a los tradicionales, sino también como una forma de alfabetización tecnológica, pues los productos agrícolas y alimenticios en una buena proporción son obtenidos utilizando herramientas biotecnológicas de las cuales la mayoría de la población no conoce nada, igualmente los productos de origen vegetal transgénicos aumentan diariamente en el mundo y quizá sean masificados en un futuro, donde se debe tener la información para poder decidir si son o no una opción para cada uno de nosotros. Otra oportunidad que ofrece la biotecnología vegetal es como opción de formación para el trabajo especialmente en la educación media, pues el número de laboratorios de producción de material vegetal seguirá creciendo.

En este trabajo se pretende conocer las técnicas y aplicaciones de la biotecnología vegetal en la agricultura, sus antecedentes históricos, epistemológicos, sus avances, sus procedimientos y prácticas, especialmente en lo relacionado con los cultivos de tejidos vegetales "in vitro" de tal manera que se pueda generar una propuesta de trabajo pedagógico para su enseñanza en una institución de educación básica y media de carácter oficial. Se pretende adecuar sus contenidos procedimientos y buscar soluciones a las dificultades que se puedan presentar a la hora de implementar la enseñanza en los jóvenes, que a diferencia de la educación superior aun no han definido completamente sus expectativas de formación profesional, pero que sin embargo tienen afinidad por las ciencias naturales, la tecnología y el medio ambiente.

La biotecnología vegetal y en general la biotecnología tiene un carácter interdisciplinario en su estudio, en su trabajo y en la búsqueda de soluciones a problemas reales que se presentan en el área de la producción agrícola. Ello hace que algunos autores la vean como un área de aplicación de estudio para el pensamiento complejo, ya que son diversos los conocimientos que se deben dominar, lo mismo que los procedimientos de laboratorio y técnicos, lo que garantiza un buen material de tipo pedagógico para explotar, especialmente por los profesores de ciencias naturales, claro sin excluir otros que podrían desarrollar proyectos dentro de este campo, tales como los profesores de tecnología, matemáticas, emprendimiento, entre otras. En los colegios los profesores que han enfrentado el problema de la enseñanza de la biotecnología, casi siempre son los de biología pero esto no quiere decir que los de otras áreas no puedan desarrollar proyectos y actividades en este campo.

El tema de la biotecnología vegetal adquiere importancia pedagógica actualmente, debido a proyectos de mejoramiento en la calidad de la educación desde el punto de vista gubernamental, ya que por ejemplo en la ciudad de Bogotá, se está llevando a cabo la articulación de la educación media con la educación superior, lo que permite que se den encuentros en cuanto al manejo del conocimiento desde la universidad hasta los que se están formando en los niveles inferiores, permitiendo la formación de un criterio más serio y guiado hacia la formación de los nuevos profesionales que necesita el país. Desde el campo docente permite que los profesores de la educación básica y media se preocupen más por actualizar su conocimiento y revisar sus posturas metodológicas, lo que enriquece y mejora su desempeño profesional.

La búsqueda de un modelo para la enseñanza de la biotecnología vegetal en la educación media se presenta aquí en cuatro capítulos. Los dos primeros de ellos son el fundamento disciplinar sobre los cuales se hace la propuesta pedagógica en el tercer capítulo. El último capítulo contiene las conclusiones y recomendaciones para que el tema sirva a otros educadores en la búsqueda de nuevos conocimientos y estrategias de mejoramiento dentro de la educación básica y media.

El primer capítulo revisa el desarrollo histórico de los cultivos de tejidos vegetales “in vitro” desde sus orígenes a comienzos del siglo XX, con la teoría de la totipotencialidad que hizo famosa en 1902 Haberlandt, sin desconocer investigadores anteriores a él, siguiendo por los primeros éxitos de obtener células vegetales cultivadas en un medio aséptico, diferente a su medio natural, por White en la década de los treinta; luego los estudios y descubrimiento de las hormonas vegetales auxinas y citoquininas, hizo que en la década de los sesenta se tuvieran medios de cultivo establecidos como el medio de Murashige y Skoog (1962), de tal manera que las investigaciones con un mayor número de especies hizo que para la década de los setenta, se logaran las primeras aplicaciones reales en la agricultura. A partir de ahí junto con la ingeniería genética y las técnicas de biología molecular, hoy se está dando un cambio importante en la producción agrícola mundial a gran escala.

En el segundo capítulo se revisan las técnicas que se utilizan en la obtención de tejidos vegetales en el laboratorio; empezando por la micropropagación que permite la obtención de miles de plantas a partir de un pequeño trozo de una planta madre (explante), pasando por otras técnicas como la obtención de plantas libres de patógenos a partir de la siembra de meristemas, lo que ha permitido obtener cultivos sanos y libres de plagas y enfermedades. Finaliza con la ingeniería genética y los metabolitos secundarios, estos aun en el campo de la investigación, sin embargo la ingeniería genética y sus métodos ha obtenido plantas transgénicas (modificadas genéticamente) resistentes a plagas y tolerantes a herbicidas, lo que ha puesto a pensar en las infinitas posibilidades de creación de “nuevas plantas”, pero sin saber el impacto ambiental y de salud que tendrán, por lo que es un campo de discusión donde la ética y las ciencias sociales también tienen

parte, sin embargo este trabajo no los profundiza. De la misma forma allí se explica como debe ser un laboratorio de cultivo de tejidos vegetales y sus procedimientos más importantes.

En el tercer capítulo se hace una reflexión pedagógica para mirar cuales serian las teorías de enseñanza aprendizaje, que pueden soportar una propuesta para enseñar la biotecnología vegetal en la educación media. La propuesta está basada en la resolución de problemas para lo cual la estrategia que se pretende desarrollar es la de trabajo por proyectos. Esta es una herramienta que permite afrontar la enseñanza de la "Producción de Material Vegetal" que se desarrollará en la IED Manuelita Sáenz del sistema educativo oficial del Distrito Capital, para que los jóvenes de grado 10° y 11° de la institución obtengan el título técnico del mismo nombre, en un convenio con el SENA (Centro de Biotecnología Agropecuaria de Mosquera, Cundinamarca)

Con esta propuesta se espera mejorar los desempeños de los estudiantes que se inscriben voluntariamente en esta especialidad, y ayudarles a que logren su formación en las cuatro competencias laborales específicas que se les exige para su titulación. Se pretende además que mejoren especialmente el trabajo en equipo, el cual ha sido una de las dificultades más sentidas que el autor ha encontrado en el desarrollo del trabajo con los estudiantes. Esto también permitirá que el programa se mantenga y se fortalezca para que más estudiantes se interesen por el estudio y aplicación de las ciencias naturales.

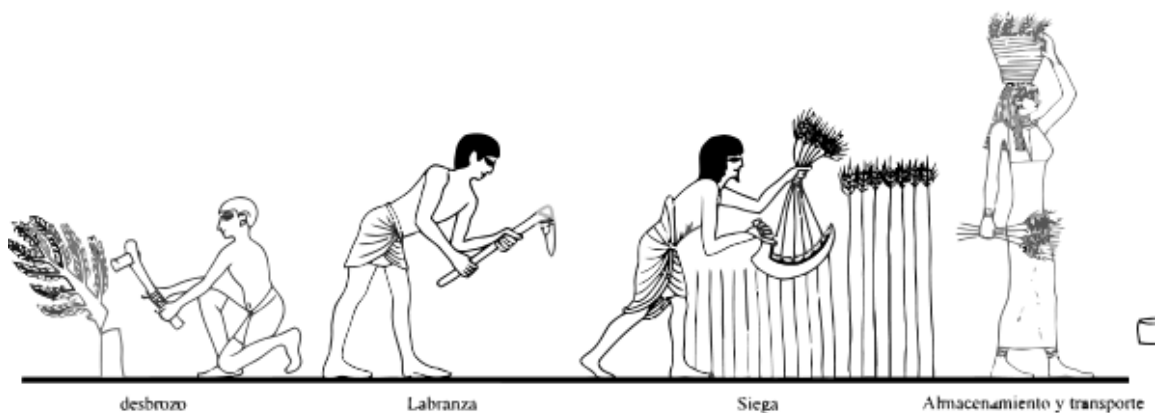
La metodología empleada para la realización del trabajo fue una revisión del estado del arte en cuanto los conocimientos de los cultivos vegetales in vitro, su historia, sus técnicas y procedimientos. De la misma forma se hizo la revisión bibliográfica y en la red de información acerca de procesos de enseñanza de la biotecnología en la educación básica y media. Con estos argumentos y el soporte de algunas teorías pertinentes de enseñanza aprendizaje se hizo la propuesta del modelo de enseñanza de la biotecnología vegetal en la media.

La poca información en cuanto a la enseñanza de la biotecnología en la educación básica y media, fue la dificultad más importante que se encontró en el desarrollo de este trabajo. La mayoría son propuestas de tópicos que se pueden trabajar con niños y jóvenes, pero en la práctica realmente hay muy pocas en Colombia. En otros países se han desarrollado experiencias, algunas de las cuales fueron revisadas y junto con las pocas locales, fueron provechadas para la realización de la propuesta aquí hecha.

# 1. Historia de los Cultivos Vegetales in Vitro

La biotecnología ha existido a la par con la aparición y evolución de la civilización humana, con el inicio de los grupos humanos organizados en asentamientos fijos (sedentarios) surgieron casi al mismo tiempo la agricultura y la ganadería, es decir la intervención controlada de los seres humanos sobre plantas y animales para aumentar los rendimientos en sus productos. En el caso de la agricultura se inició la domesticación de plantas, la siembra controlada, la fertilización, las técnicas agrícolas para el cuidado de los cultivos, las técnicas de cosecha, el almacenamiento y distribución de sus productos (Mannion, 1995). Fueron los sumerios los encargados de iniciar todos estos procesos de tal manera que ya en las antiguas civilizaciones como la China, Egipto, Grecia y Roma; la mayoría de estas técnicas eran dominadas y cada una de ellas aportaba algunas novedades. Estas técnicas tradicionales, algunas de las cuales aún sobreviven en nuestra época pero que en el siglo XIX se mantenían muy similares a las de dos o tres mil años atrás. Es decir en la agricultura no hubo cambios radicales como los que se han dado en los últimos 170 años, donde se ha utilizado el conocimiento científico acerca de las plantas.

Figura 1-1. Escenas costumbristas egipcias extraídas de pinturas murales de mastabas de nobles funcionarios  
(Imagen tomada de: <http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Neolitico-agricultura.svg>)



Estos cambios se iniciaron con estudios como los de Priestley, Steele e Ingen Houzs en 1775 que condujeron a Justus Von Liebig en 1840, a la conclusión de que las plantas asimilan el carbono del  $\text{CO}_2$  de la atmósfera (<http://webpages.ull.es/users/freal/BTema1.pdf>). De manera independiente Matthias Jakob Schleiden en 1838 y Theodor Schwann en 1839 proponen el concepto de la teoría celular en el sentido de que las células son las unidades más elementales y fundamentales de los seres vivos, ahí inherente estaba el concepto de totipotencialidad el cual fue formalizado mediante la frase "Omnis cellula a cellula" de Karl Ludwig Virchow en 1858, esto es que las células deben provenir de otras células y en el caso de las células vegetales el potencial de cada una de ellas de generar la planta completa (Vasil,

2008). Igualmente el trabajo de Gregor Mendel en 1865 (<http://webpages.ull.es/users/freal/BTema1.pdf>) acerca de la herencia de los caracteres genéticos inspiró la búsqueda de mejores variedades de plantas para la producción de alimentos.

El término “in vitro” significa dentro de vidrio, es un salto en el avance de la biotecnología vegetal, que ha surgido en la segunda mitad del siglo XIX, buscando comprobar y aplicar el concepto de totipotencialidad, concepto que había sido propuesto por Schwann y Schleiden, es así como el cultivo de orquídeas que se venía trabajando de manera ornamental desde el siglo XVII participa en la gestación de las nuevas técnicas biotecnológicas de las plantas. Noël Bernard en 1899 intentó la germinación simbiótica de semillas de orquídeas in vitro, siendo quizá la primera propuesta metodológica para propagar plantas con estas técnicas (Yam y Arditi, 2009).

Hasta ya entrado el siglo XX se logró lo que venía intentándose desde el siglo anterior, esto era comprobar experimentalmente la teoría de la totipotencialidad celular, mediante la obtención de un tejido celular completo a partir de unas cuantas células de manera aséptica. Ya en 1893, Carl Reclinger en Viena propuso que partes aisladas de las plantas podrían ser cultivadas in vitro y sugirió que secciones extirpadas podrían desarrollarse en una solución (Gautheret 1983, citado por Arditi y Yam, 2009). El primero en intentarlo experimentalmente fue el botánico austro-alemán Johann Gottlieb Friedrich Haberlandt en 1902; él utilizó como medio de cultivo una solución nutritiva (solución salina) formulada por Knop en 1865 (Vasil, 2008). El proceso no fue exitoso pues informó: "la división celular no se observó" (Arditi y Yam, 2009), debido entre otras cosas a la contaminación que se daba y la imposibilidad de mantener vivas las células en un medio aislado. Para la misma época Wilhelm Pfeffer también trabajaba con soluciones nutritivas para la germinación asimbiótica de orquídeas, referenciadas en su libro *Fisiología de las Plantas* (1900) (Arditi y Yam, 2009).

A pesar de no lograr los objetivos propuestos Haberlandt despertó el interés y la competencia por obtener cultivos vegetales in vitro con divisiones celulares sucesivas. Es de anotar que también en 1902 Haberlandt había sugerido el uso de fluidos del saco embrionario como aditivos para los medios de cultivo, de ahí el uso del agua de coco en algunas formulaciones actuales (Vasil, 2008). Para 1922 Lewis Knudson por su parte estudiaba formulación de medios para la germinación asimbiótica de semillas de orquídeas y obtención de plantas completas de forma aséptica, de ello quedan dos famosos medios (Knudson B y Knudson C) para la germinación y micropropagación de estas plantas (Arditi y Yam, 2009).

Los intentos por obtener cultivos de células vegetales con divisiones celulares sucesivas se vio frenado en los comienzos del siglo XX especialmente por la falta del medio de cultivo apropiado y por la falta de conocimiento de los reguladores de crecimiento de las plantas. Fue hasta comienzos de los años treinta que el estadounidense Philip R. White logró formular un medio de cultivo apropiado en el cual logró un cultivo vegetal de crecimiento indefinido en 1933 (Arditi y Yam, 2009) “Las puntas se mantuvieron con vida por períodos de hasta tres semanas... y en ese tiempo... se produjo la división celular activa, el crecimiento... .. la diferenciación en hojas, tallos y los órganos florales” (White, 1933b citado por Ardití y Yam, 2009). Para ello buscó mejorar la soluciones existentes, tales como la de Knop, y a partir de una solución salina formulada por Uspensky para el cultivo de algas y una de micronutrientes formulada por Trelease, adicionada con glicina, ácido nicotínico, tiamina y piridoxina. Este fue el medio más usado desde 1940 hasta 1960 para la obtención de cultivos de tejidos vegetales (Vasil 2008).

Con su medio de cultivo White sembró ápices de raíces de tomate infectadas con el virus del mosaico del tomate y no solo logró el crecimiento ilimitado de estos tejidos que se mantuvieron por más de cuarenta años, los que mostraba a su colegas y estudiantes con mucho orgullo; sino que en dicho trabajo descubrió que algunos tejidos obtenidos de estos ápices estaban libres del virus, por lo que concluyó que el virus no alcanzaba los tejidos meristemáticos, fundamento teórico para la técnica actual de la obtención de plantas libres de patógenos que se puede realizar con el cultivo de tejidos vegetales “in vitro”. También obtuvo callos de zanahoria de crecimiento indefinido, logro que por la misma época (1939) y por separado obtuvieran Roger Gautheret y Pierre Nobécourt en Francia. Por estos logros y otros que dan fundamento a la biotecnología vegetal, así como inspirador de la creación del Consejo Internacional de Cultivo de Tejidos Vegetales en 1963, que luego se convirtió en la Asociación Internacional de Biotecnología Vegetal (IAPB) y por ser un gran mentor de los jóvenes científicos, White fue muy respetado y venerado. Murió en 1968 en Bombay, India. (Vasil, 2011).

Albert C. Hildebrandt en la Universidad de Wisconsin, realizó estudios más detallados y sistemáticos de la nutrición de las plantas entre los años 1946 y 1966; mientras que en la misma universidad, Toshio Murashige junto con su profesor Folke Skoog, con base en el medio de White formularon y dieron a conocer en 1962 un medio con cantidades altas en amonio, nitrato, fosfato y potasio; adicionando también el hierro en forma de quelato, mioinositol y cuatro vitaminas; producto del extracto de hojas de tabaco que había mostrado mejorar enormemente la división celular de los cultivos de tejidos vegetales con los cuales estaban experimentando. Este es el medio de cultivo más utilizado en los últimos 50 años en el cultivo de tejidos vegetales (Murashige y Skoog, 1962 citado por Vasil, 2008).

---

Otro descubrimiento que logró aportar al avance de los cultivos de tejidos vegetales en el siglo XX fueron los reguladores de crecimiento. El camino comenzó con la observación de Darwin (1880) acerca de la curvatura de las plantas hacia la luz.

En 1928 el holandés Frits Went, aisló una sustancia a la que llamó hormonas (*Wachstum*), más tarde Kögl en Dinamarca en 1934 aisló e identificó de la orina de las mujeres embarazadas el ácido indolacético (AIA) llamado inicialmente auxina y en 1935 la inglesa Keneth Vivian Thimann lo aisló desde el cultivo a gran escala de hongos *Rhizopususinus*, ella junto con un gran número de estudiantes que hacían parte de su equipo han trabajado en la estructura y función de las auxinas sintetizando por ejemplo: el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) (Vasil, 2008).

Las citoquininas fueron descubiertas durante el desarrollo de cultivos, adicionando extractos vegetales como agua de coco y la médula de tabaco, el primero que se recuerda fue sugerido inicialmente por Haberlandt (Vasil, 2008). Pero además se ensayó con el ADN de esperma de arenque, que se utilizó también para los experimentos de germinación de las semillas de orquídeas por el profesor John T. Curtis (Arditti, 1967). Esto condujo al aislamiento a partir de dicho ADN de la kinetina en 1955 por Carlos O. Miller quien trabajaba como estudiante de postdoctorado con Folke Skoog. A esta y otras moléculas similares se les llamó inicialmente quininas, pero luego se les cambió a citoquininas para diferenciarlas de un nombre similar usado en los sistemas de animales (Vasil, 2008). Luego de ello Skoog y Miller también demostraron la regulación hormonal basada en la relación auxina / citoquinina, algo muy importante para la comprensión de la morfogénesis, la micropropagación y regeneración de las plantas a partir de los tejidos obtenidos por cultivo *in vitro* (Vasil, 2008).

La formación de embriones somáticos en los cultivos de tejidos *in vitro* es una técnica muy utilizada hoy en día, por ejemplo para producir semillas artificiales. Esto ya había sido sugerido por Haberlandt en 1902, en su artículo acerca de la totipotencialidad celular. Los primeros embriones somáticos artificiales y experimentalmente se obtuvieron en 1958 por Jakob Reinert a partir de callos (Reinert, 1958 citado por Vasil, 2008) y por Frederick C Steward desde cultivos en suspensión de células de raíces de zanahoria (Steward y Pollard, 1958 citado por Vasil, 2008). Stewart sostenía que los embriones somáticos se formaban a partir de células individuales y solo en las plantas de la familia de las umbelíferas (la de la zanahoria), pero las investigaciones posteriores mostraron que cada embrión se forma a partir de un grupo de células proembrionarias y también mostraron que la embriogénesis somática se puede llevar a cabo en muchas especies vegetales, incluyendo la mayoría de las plantas de importancia económica y de algunas leñosas; igualmente es la técnica preferida en la regeneración de las plantas en cultivos transgénicos comerciales (Vasil, 2008).

## 1. La ingeniería genética en la historia de la biotecnología vegetal

La biotecnología vegetal en la actualidad usa básicamente dos técnicas complementarias, la ingeniería genética y el cultivo de tejidos vegetales in vitro. Mientras que la base teórica de todas sus aplicaciones es el conocimiento de la genética, sus leyes y la estructura del ADN, siendo esta estructura y su manipulación la que ha dado un cambio radical a la historia de la biotecnología de vanguardia. La historia del descubrimiento y formulación de la estructura de la “molécula de la vida”, es un ejemplo de como la historia de la Ciencia está plagada de hechos inherentes al trabajo científico, sin olvidar que quienes lo realizan son seres humanos con todas sus características intelectuales pero también emocionales. Características que debieran ser tenidas en cuenta también en su enseñanza.

La historia del descubrimiento del ADN empieza el siglo XIX con la teoría celular ya formulada, en 1868 el biólogo suizo Johann Friederich Miescher (1844-1895), encontró que el núcleo poseía dos sustancias ricas en fósforo una de carácter ácido que denominó nucleína (hoy ADN) y otra de carácter básico (hoy Histonas). Su profesor Ernst Felix Hoppe-eyler (1815-1895) detuvo su informe por dos años hasta 1871, para comprobar los experimentos de su joven (25 años) alumno (Ortiz, 2003).

Para los años 30 en el siglo XX ya la cristalografía era una ciencia avanzada, luego del descubrimiento de los rayos X, el interés por utilizarla en las sustancias biológicas era uno de los puentes que acercaban la física, la química y la biología. Igualmente ya había propuestas de la estructura del ADN como la de Pauling y Corey (Pauling y Corey, 1953 citado por Ortiz, 2003) también en 1953, ciertamente en competencia con la de Watson y Crick. El carácter de transmisión de información genética tampoco se tenía muy en cuenta para la época. Fue Oswald T. Avery en New York (Instituto Rockefeller) en 1944 quién junto con sus colegas Colin M. MacLeod y Maclyn McCarty (Vasil, 2008), comprobaron experimentalmente que era el ADN el “principio transformador”, descubierto accidentalmente por el inglés Frederick Griffith desde 1928, estudiando la cepa bacteriana que producía la neumonía. Esto fue verificado también por Alfred Hershey y Martha Chase en 1952 (Cerdá, 2011). A partir de ese momento entonces quedó establecido que el ADN era el encargado de transmitir la información genética.

Así que en 1953 el 25 de abril se publicó un documento histórico en la revista *Nature*, un artículo exactamente de una página donde se proponía una estructura de doble cadena helicoidal para el



---

ADN, escrito por los ingleses J.D. Watson y F.H.C. Crick y titulado: “*A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid*” (<http://dna50anys.uab.es/dna50anys/watsoncrick.pdf>). Este documento no solo es histórico sino también polémico por el uso indebido de una fotografía de rayos X de la bióloga (cristalógrafa) Rosalind Franklin compañera de M.H.F. Wilkins, quienes también trabajaban en la dilucidación de la estructura del ADN. Incidente que está marcado por la discriminación y el celo que se da normalmente en el trabajo científico. El reconocimiento por el importante descubrimiento vino con el premio nobel para Watson, Crick y Wilkins en 1962 (Ortiz, 2003).

Por los años cincuenta, mientras los investigadores de las plantas luchaban por obtener variedades libres de patógenos como los virus que afectaban a la papa y la Dalia en Francia, es así como ya se obtienen plantas libres de virus mediante la siembra de meristemos apicales (Morel y Martin, 1955 citado por Vasil, 2008). También otras técnicas para mejorar la productividad entre ellas la variación somaclonal, pero después de cuatro décadas los mejores resultados han surgido a través del método de la transformación genética que se caracteriza por la introducción de uno o varios genes en las células individuales, integrándose definitivamente al ADN y transmitiéndose a las células descendientes de la célula transformada y como genes mendelianos dominantes (Vasil, 2008). “Ese método existe desde el comienzo de los setenta, y se desarrolló con independencia de las necesidades prácticas (lo mismo le pasó al descubrimiento de la sexualidad en plantas); es lo que se conoce globalmente como Biotecnología, aunque con mucha frecuencia se utilizan expresiones como ingeniería genética, ADN recombinante, etc.” (Cubero, 2000). Para estas transformaciones se desarrollaron tres metodologías para introducir los genes foráneos dentro de las células vegetales: la introducción indirecta a través del vector bacteriano *Agrobacterium tumefaciens*; la introducción directa dentro de los protoplastos por descarga eléctrica o choque osmótico; y la introducción directa por bombardeo de las células de micropartículas a alta velocidad recubiertas del material genético (Vasil, 2008).

La bacteria *A. tumefaciens* fue identificada en 1907 como causante de la enfermedad agalla de la corona, la cual transforma las células del cuello del tallo de las plantas. Hecho que se pudo verificar molecularmente en la segunda mitad de la década de los 70, cuando se desarrollaron las tecnologías del ADN recombinante y el descubrimiento de las enzimas de restricción. Una pequeña parte de un plásmido inductor de tumores que trae la bacteria fue identificado como el responsable de la inducción de tumores y fue denominado T-ADN (Chilton et al., 1977 citado por Vasil, 2008), debido a que esta fracción de ADN del plásmido se transfirió e integra al genoma de la planta huésped, surgió la clave para que se pensara en usarlo como vector de transferencia de otros genes de interés. La técnica ya dominada fue presentada en 1983 por un grupo de investigadores dirigidos por Mary-Dell Chilton, Robb Fraley T. y Jeff Schell en un simposio llevado a cabo en Miami el cual es considerado por algunos como el nacimiento real de la biotecnología vegetal (Vasil, 2008).

---

La obtención de células vegetales aisladas y libres de su pared celular (protoplastos), se logró gracias a las enzimas hidrolizantes de la pared celular (celulasas), que luego fueron producidas en grandes cantidades desde Japón. Itaru Takebe cultivó protoplastos y luego logró regenerar las paredes celulares y regenerar las plantas completas de tabaco (Takebe et al., 1971 citado por Vasil, 2008). La falta de la pared celular facilita el envío del ADN dentro del protoplasto mediante descarga eléctrica o choque osmótico. Esta fue la primera forma de transformación de los cereales, que luego se vio que era más fácil llevarla a cabo mediante el vector de *Agrobacterium* (Vasil, 2008).

La introducción directa por bombardeo de las células con micropartículas a alta velocidad recubiertas del material genético, fue el trabajo del fitomejorador John Sanford y del ingeniero electricista Ed Wolf en la Universidad de Cornell en Estados Unidos, sus resultados fueron presentados en 1987 luego de bombardear con micropartículas de tungsteno recubiertas de ADN a las células epidérmicas de cebolla, para ello utilizaron una pistola normal, lo cual fue recibido con burla por la comunidad científica, pero la insistencia y el perfeccionamiento de la metodología se convirtió en un gran éxito para el año 2000. Por lo que hoy es junto con el método de *Agrobacterium* los más utilizados para la transformación de plantas (Vasil, 2008).

Sin embargo como se mencionó antes la biotecnología vegetal moderna es muy reciente, está centrada en los cultivos genéticamente modificados, llamados luego cultivos transgénicos y actualmente cultivos biotecnológicos (especialmente por sus promotores); donde el cultivo de tejidos vegetales “in vitro” juega un papel muy importante, como se ha visto, pues cada nuevo desarrollo de un cultivo biotecnológico se lleva a cabo en los laboratorios e invernaderos antes de producirlo comercialmente. El primer cultivo biotecnológico comercial se inició en 1996 en los Estados Unidos y otros 5 países ([http://www.infoagro.com/agricultura\\_ecologica/transgenicos.htm](http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/transgenicos.htm)), para el 2010 ya 29 países tenían sembrados cultivos biotecnológicos (transgénicos) en 148 millones de hectáreas, dentro de ellos está Colombia con más de 50000 hectáreas (en el puesto 18 por hectáreas cultivadas), sin embargo no es de los países que lideran la superficie sembrada con estos cultivos, ellos son: EE.UU. con 66.8 millones de hectáreas, Brasil con 25.4 millones y Argentina con 22.9 millones de hectáreas (<http://www.croplife.com/news/?storyid=3522&style=1>).

Colombia inició su participación en la siembra comercial de cultivos biotecnológicos en el 2002, con la siembra de clavel azul para la exportación. La aprobación en el año 2003 de algodón GM (genéticamente modificado) le dio inicio a cultivos más grandes y comerciales a nivel mundial. Con el esquema de siembras controladas se inició la siembra de maíz GM en el año 2007 y hacia el final del año 2009 se aprobó la siembra de rosas azules GM (James, 2010). En el año 2010 Colombia sembró 37657 hectáreas de algodón y 38896 hectáreas de maíz que son los dos cultivos de mayor número de hectáreas

---

sembradas en el país (<http://agrobio.org.co/fend/index.php?op=YXA9I2JXbDQmaW09I016UT0=>).

Estos cultivos prometen el aumento de la productividad de la agricultura de los países en vías de desarrollo, aporte significativo al problema de suministro mundial de alimento, mantenimiento de la biodiversidad y la protección del medio ambiente por el menor uso de pesticidas e insumos agrícolas; y son apoyados incluso por la Organización Mundial de la Salud (OMS) y la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO). Sin embargo tienen una fuerte oposición de los grupos ambientalistas y algunos países por ejemplo en la Unión Europea, por los posibles efectos especialmente sobre el medio ambiente. No hay estudios concluyentes tanto para los resultados prometidos por sus promotores, como tampoco para los efectos devastadores argumentados por el segundo grupo. Pero es de anotar que la mayor parte de los estudios y desarrollos de los cultivos biotecnológicos han sido realizados por empresas multinacionales a nivel mundial quienes los patentan y dominan los mercados globalizados lo que afecta realmente a los cultivadores tradicionales. Por lo que proyectos como los de acabar con el hambre mundial siguen sin solución debido a los intereses políticos y comerciales que se dan con el manejo de patentes en los productos biotecnológicos (Enserink, 2008).

## **1. Biotecnología**

De acuerdo con Fonseca (2009) la biotecnología es la manipulación de organismos vivos completos, sus partes, sus productos, sus procesos metabólicos, sus células o su material genético con el objetivo de producir bienes y servicios que son aprovechados por los seres humanos para mejorar su calidad de vida. Es así como el trasplante de un riñón de un donante a un paciente para su supervivencia, la producción de un suplemento proteico a base de caseína obtenida a partir de la leche, la producción de ácido cítrico por fermentación bacteriana; y la obtención de cultivos de soya a partir de semillas transgénicas de esta leguminosa, entre muchas otras actividades de las sociedades actuales son ejemplos de la biotecnología. La biotecnología tiene sus aplicaciones en los siguientes grandes campos: Medicina, industria, agricultura y la protección del medio ambiente.

Además, la biotecnología ha sido definida por la Organización para la Alimentación y la Agricultura de las Naciones Unidas (FAO, 2002) como "una serie de diferentes técnicas moleculares, tales como la manipulación y transferencia de genes, la especificación y clonación del ADN (ácido desoxirribonucleico) de plantas y animales." La ingeniería genética es una de las herramientas de la biotecnología, que ha sido descrita por la FAO como "la modificación de genotipo, y por lo tanto del fenotipo, por transgenes"(Rosenberg, 2007).

## **2. Biotecnología Vegetal**

La biotecnología vegetal es la encargada del mejoramiento y utilización de las plantas, sus partes, derivados y productos que el hombre ha usado y prevé utilizar en la producción de alimentos, medicamentos y materias primas que le permiten su supervivencia y su bienestar. Algunos de los objetivos buscados al utilizar la biotecnología vegetal son: el aumento del rendimiento de las cosechas, como consecuencia de la mejora en la capacidad productiva de las plantas; obtención de variedades resistentes a plagas y enfermedades determinadas por cambios medioambientales; aumento del valor nutritivo de los productos vegetales; crear variedades de plantas mejoradas y adaptadas a terrenos pobres y poco aptos para la agricultura tradicional; y también buscar especies silvestres que puedan ser transformadas y adaptadas para la obtención de productos útiles para el ser humano (Fonseca, 2009).

Según Mannion (1995) en la agricultura hay tres campos principales de aplicación de la biotecnología vegetal: el mejoramiento de los cultivos (fitomejoramiento), el control de plagas y enfermedades y el aumento de la disponibilidad de nutrientes.

### **3. Mejoramiento de las plantas**

El mejoramiento de las plantas buscando su productividad se ha desarrollado desde la aparición misma de la agricultura hace cerca de 10000 años. Los agricultores desde aquellos tiempos remotos, en sus prácticas agrícolas buscan para sus cultivos características deseables como: mayor cantidad de semillas o mayor tamaño, rápida germinación, resistencia a las enfermedades, resistencia a los ataques de insectos, resistencia a las heladas, etc. Los cruces entre plantas desde comienzos del siglo XX utilizando la genética Mendeliana abrieron la puerta a nuevas formas de mejoramiento, pasando por las mutaciones inducidas, hasta los años setentas y ochentas, donde aparece una nueva forma de buscar el mejoramiento usando la biotecnología vegetal basada en la ingeniería genética.

La ingeniería genética empieza con el estudio del genoma de la planta y de otros seres vivos, incluidos animales o microorganismos, para luego transferir genes de otras especies a la planta; de tal manera que su expresión resulte en rasgos o características deseables para la planta que está siendo objeto de aplicación de esta técnica.

#### **1. Mejoramiento Tradicional**

La selección simple también llamada selección masal, fue la aplicada desde comienzos de la historia de la agricultura, en la cual los agricultores seleccionaban sus propias semillas, al mismo tiempo eran mejoradores y consumidores. Esta técnica basada en la intuición y la experiencia personal es muy eficaz para el mejoramiento a largo plazo. Sin embargo con el crecimiento de la población y de las ciudades apareció una nueva clase, los consumidores.

A partir del siglo XVIII, la selección utilizó los conocimientos y métodos de la ciencia, en especial cabe mencionar el trabajo de Gregor Mendel, quien dio el fundamento genético para que se afinaran los procesos de selección científica mediante el cruzamiento artificial. Igualmente se estudiaron las necesidades nutricionales de las plantas y aparecieron las primeras empresas o casas de ventas de semillas. Esto generó que la agricultura se intensificara apareciendo el monocultivo, generando grandes excedentes de producción, la gran comercialización y en los dos últimos siglos el aumento generalizado de la población (como consecuencia también de los avances en medicina). De igual forma se aumentó el uso de fertilizantes, de aguas de riego y grandes extensiones de tierra para cultivar, lo que intensificó también la deforestación (Cubero, 2000).

## 2. Mejoramiento Genético

Al aplicar juiciosamente la genética mendeliana, se hace el mejoramiento genético obteniendo así variedades que aumentan la productividad de las plantas y mayor rentabilidad para el agricultor. Lo que se hacía antes en cientos y miles de años, ahora se logra en 15 o 30 años. Sin embargo a comienzos del siglo XX ya los genes buscados parecían estar agotados y se intentaron nuevas formas de alterar el material genético, como la mutagénesis artificial, para la cual se utilizan agentes mutagénicos físicos y químicos; además con sustancias químicas apropiadas se puede ampliar el número de cromosomas de la especie, proceso que se conoce como poliploidía (Cubero, 2000).

Sin embargo las técnicas de mutagénesis química o física, resultaron ser similares a las mutaciones naturales de las plantas en el sentido del número de mutaciones benéficas obtenidas, ya que prácticamente son el producto del azar, lo que igualmente requiere procesos de análisis y selección de los mutantes bastante tedioso y luego de ello un programa de prueba en campo para verificar las mutaciones logradas y su reproducibilidad en sucesivas generaciones. El tiempo ganado está en que se pueden hacer muchos ensayos de exposición a los agentes mutagénicos, ya que no son espontáneos como en la naturaleza. Los agentes físicos mutagénicos más utilizados son: Radiaciones ionizantes (rayos gama, rayos X, neutrones, radioisótopos) y las radiaciones no ionizantes (luz ultravioleta). Los agentes químicos utilizados para la inducción de mutaciones en las plantas son: Metanosulfonato de etilo, sulfato de dietilo, compuestos nitrosados, compuestos análogos a los nucleósidos y la azida sódica (Pedroza, 2008).

Actualmente la biotecnología vegetal está usando la tecnología de los cultivos transgénicos para el mejoramiento (soya, algodón, maíz y canola principalmente), pero aún no es bien vista por la falta de datos suficientes e históricos del impacto ambiental que puedan causar, sin embargo con la creciente demanda de alimento a nivel global como consecuencia del aumento poblacional, esta previsto que para mediados del siglo XXI sea la tecnología más utilizada en el fitomejoramiento. Por lo pronto se buscan nuevas formas de mejoramiento (Langridge y Tester, 2010) que no acudan a plantas transgénicas, por ejemplo; técnicas de selección asistidas por marcadores (MAS), selección asistida por marcadores recurrentes (MARS), y la selección genómica o de genoma completo (GWS)

Por otro lado el cultivo de tejidos vegetales "in vitro" ha mostrado que cuando se regeneran plantas completas a partir de tejido indiferenciado (callo) hay variación en la información genética de manera significativa comparado con las plantas madre, esto es lo que se denomina variación somaclonal, característica que se utiliza actualmente.

## 4. Cultivo de tejidos vegetales in vitro

Con el aumento poblacional y la necesidad urgente de producir mayor cantidad de alimentos, para mediados del siglo XX la agricultura ya era una empresa de tipo industrial, que requería uniformidad en sus productos y por lo tanto las técnicas de mejoramiento tendrían que ser más veloces para disminuir el tiempo de introducción de una nueva variedad en el mercado, como se vio en la historia de los cultivos de tejidos vegetales, estos ya se utilizaban para el mejoramiento y propagación de las plantas para la década del sesenta. La obtención de plantas libres de patógenos es una técnica del cultivo de tejidos vegetales in vitro que se usa normalmente en la agroindustria para la propagación masiva, el mejoramiento genético y la conservación de germoplasma. (Pedroza, 2008).

Un cultivo vegetal “in vitro” consiste en la utilización de una parte muy pequeña de la planta (planta madre) llamada *explante* que es colocada de manera aséptica dentro de un frasco de vidrio o plástico, que contiene un medio nutritivo semisólido o líquido para que las células vegetales vivan y se conviertan en un tejido vegetal específico o se regenere la planta completa en condiciones de luminosidad, humedad y temperatura controladas. Ello basado en el concepto de *totipotencialidad* de las células vegetales, que consiste en que una célula vegetal tiene la información genética y la capacidad de regenerar la planta completa, si se le dan las condiciones apropiadas. Con esta forma de multiplicación vegetativa (reproducción asexual) se pueden obtener un gran número de plantas a partir de un solo explante en tiempos relativamente cortos y de muy buena calidad (Caro et al., 2004).

Figura 2-1. Fotografía de plántula de *Hylocereus triangularis*(pitaya) obtenida in vitro mediante la técnica de rescate de embriones



Como se observa uno de los objetivos de los cultivos de tejidos vegetales “in vitro” es obtener un alto grado de uniformidad en las plantas, lo cual se logra siempre y cuando no ocurran ciertos cambios espontáneos en la micropropagación, como por ejemplo recalcitrancia, la hiperhídricidad y la variación somaclonal (Cassells & Curry, 2001 citados por Patiño, 2010). Aunque esta última puede ser indeseable en algunos casos, como cuando se requiere mantener la identidad clonal del material propagado, también tiene implicaciones importantes para los programas y estrategias de fitomejoramiento (Patiño, 2010).

Algunas ventajas según Caro et al. (2004), de los cultivos de tejidos vegetales frente a la propagación vegetal tradicional son:

1. Obtención de un gran número de plantas de calidad mejorada a partir de un solo explante (material vegetal pequeño) disminuyendo costos de propagación.
2. El espacio para la propagación y crecimiento de las plantas puede ser pequeño.
3. Obtención de plantas libres de patógenos.
4. Permite la hibridación de especies vegetales que de forma tradicional es imposible de lograr (fusión de protoplastos).

Según Calva y Pérez (2005) luego de la teoría de la totipotencialidad de las células vegetales y el cultivo sucesivo de las células “in vitro”, dos descubrimientos en el siglo XX fueron los que facilitaron el desarrollo de los cultivos de tejidos vegetales: la identificación de las auxinas como reguladores naturales del crecimiento de las plantas y la influencia en el crecimiento vegetal de las vitaminas del complejo B.

Para el desarrollo práctico de los cultivos de células vegetales “in vitro” se establecen cinco etapas que son: La selección del explante, el establecimiento del medio de cultivo, el desarrollo del tejido, el enraizamiento y acondicionamiento y por último la adaptación de las plántulas. Cada una de las etapas será crítica de acuerdo con los objetivos planteados (Perea y Tirado, 2011).

Según las necesidades u objetivos de la aplicación de los cultivos de tejidos vegetales se distinguen algunas técnicas específicas que se desarrollan en los laboratorios. Una clasificación (Caro et al., 2004) de las mismas puede ser dada de la siguiente manera:

5. Propagación clonal (micropropagación)
6. Cultivo de meristemos
7. Conservación de germoplasma
8. Producción de plantas haploides
9. Rescate de embriones
10. Variación somaclonal (selección “in vitro”)
11. Mutagénesis
12. Hibridación somática



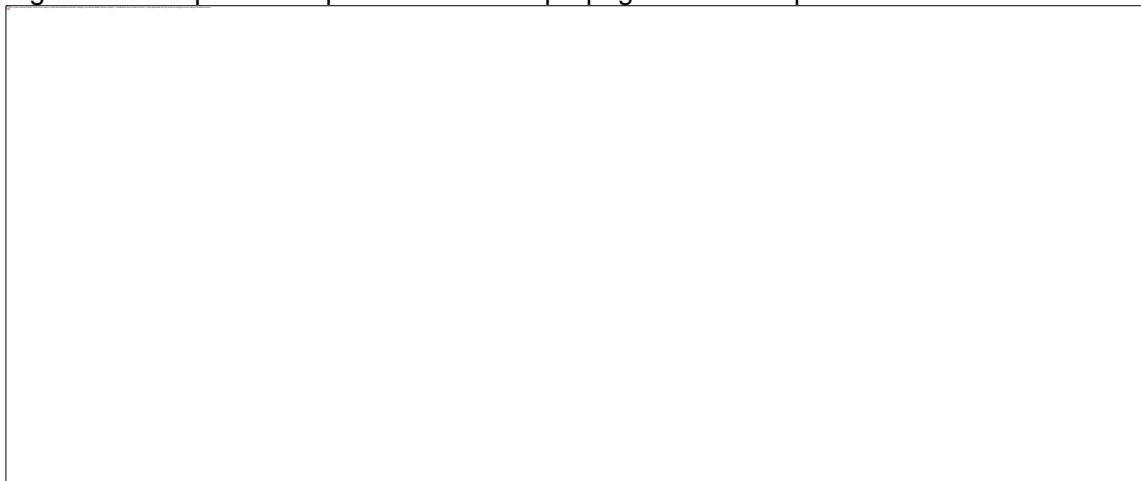
13. Ingeniería genética
14. Metabolitos secundarios

## 1. Micropropagación

La obtención de gran cantidad de plantas genéticamente idénticas a partir de pequeños segmentos (explantes) de una planta donante, es una de las técnicas del trabajo con cultivos de tejidos vegetales más utilizada en los procesos de propagación. La respuesta sin embargo depende de factores tales como: Tipo de explante, estado fisiológico del mismo, composición del medio de cultivo y las características de la especie.

Hay dos vías por las cuales se puede lograr la propagación clonal "in vitro"; La primera es a partir de la regeneración de la planta a partir de meristemas existentes en el explante, como en la siembra de explantes con entrenudos largos y cortos, donde se busca la proliferación de brotes por ramificación axilar, el crecimiento de los mismos y su posterior enraizamiento y adaptación a "ex vitro"; para entrenudos largos la proliferación se favorece induciendo la dominancia apical mediante la acción de auxinas, mientras que si son entrenudos cortos se favorece con la adición de citoquininas. La segunda es mediante la morfogénesis de *novo* de forma directa o indirecta (con tejido caloso intermedio) que incluye el proceso de organogénesis a partir de meristemas adventicios inducidos y la embriogénesis somática (Pedroza, 2008).

Figura 2-2. Esquema del proceso de micropropagación de las plantas "in vitro"



El proceso de micropropagación también se le denomina propagación clonal, por lo que es importante determinar qué es lo que se entiende por “clon” en el contexto de los cultivos de tejidos vegetales “in vitro”. Según Kricorian, en Roca y Mroginski (1993); “oficialmente clon es un conjunto de individuos genéticamente uniforme (pueden ser de naturaleza quimérica), originalmente derivados de un solo individuo mediante propagación asexual: estacas, divisiones, injertos o apomixis obligada. Los individuos propagados a partir de la mutación perceptible de una yema forman un cultivar diferente de la planta progenitora”.

Sin embargo, en la micropropagación o propagación clonal no se garantiza que los nuevos individuos sean exactamente idénticos genéticamente (Perea y Tirado, 2011), pues como se ha mencionado hay cambios en el material genético durante la regeneración de las plantas, es lo que se ha llamado la variación somaclonal que de todas formas tiene utilidad en la búsqueda de nuevas variedades en el mejoramiento como se vio antes. Igualmente el término quimérica se refiere a una planta que contiene grupos de células diferentes genéticamente, es decir el conjunto de células no es homogéneo.

Para estos autores las ventajas de la micropropagación frente a la propagación tradicional son:

15. Es más rápida para aquellas plantas que se reproducen normalmente por semillas con un periodo de dormancia prolongado.
16. La fase juvenil de algunas plantas con semillas que igualmente requiere tiempos prolongados, no se presenta en algunos cultivos obtenidos por micropropagación.

Otras ventajas mencionadas por Álvarez (2011) son:

17. Alta calidad en las plantas producidas
18. Establecimiento de clones selectos o variedades, que se pueden propagar vegetativamente (“in vitro”)
19. Las plantas obtenidas crecen uniformemente
20. Su calidad permite establecer productos comerciales, como por ejemplo las orquídeas

La propagación masiva de plantas presenta desventajas como las mencionadas por Pedroza (2008), algunas de ellas son:

21. Debilidad genética en algunos sistemas de propagación “in vitro”
22. Características indeseables en el material adaptado, como excesiva proliferación de ramas laterales
23. En plantas leñosas las raíces formadas “in vitro” no son funcionales, por lo que es necesario un enraizamiento adaptado al suelo
24. Los procedimientos “in vitro” requieren mano de obra calificada, lo que redundo en precios relativamente altos para las plantas micropropagadas

El proceso de micropropagación de las plantas consta de varias etapas (Werbroug y Debergh, 1994. Citado por Simón y Moysset, 2006) dentro de las cuales se establecen protocolos de trabajo "in vitro" y "ex vitro", de acuerdo con la especie que se está propagando.

**Etapas 0** ó preparativa; en la cual se selecciona el material vegetal de donde se extraerá el explante, dicho material se debe cultivar cuidadosamente, mediante las técnicas tradicionales para obtener plantas sanas y en estado fisiológico óptimo para ser propagado en forma "in vitro".

**Etapas 1** ó Inicial; en ella se da la iniciación y el establecimiento del cultivo "in vitro", seleccionando los explantes, desinfectándolos y cultivándolos asépticamente en el medio de cultivo de iniciación, bajo determinadas condiciones ambientales para obtener un cultivo viable.

**Etapas 2** ó multiplicación; En la mayoría de los casos el medio de cultivo en esta etapa contiene las citoquininas, que son los reguladores de crecimiento que inducen al explante a la producción de brotes o vástagos, o también una relación de auxinas-citoquininas que dependiendo de la especie cumplen con el mismo objetivo. En general una relación baja de auxinas-citoquininas, favorece la formación de los brotes y una alta relación de auxinas-citoquininas favorece la formación de raíces. Dependiendo de la especie que se esté micropropagando, se forman en el término de 4 a 8 semanas numerosos brotes por cada explante, los cuales pueden ser separados o extraídos y sembrados en medio fresco donde se puede reiniciar un nuevo ciclo de multiplicación. De esta forma se obtendrían en corto tiempo un gran número de brotes para obtener igual número de plantas, sin embargo el ciclo no se repite después tres veces (tercera generación), pues los efectos de la variación somaclonal afectarían la producción de plantas uniformes, que en principio es lo que se busca.

**Etapas 3** ó enraizamiento; en la que los brotes axilares y adventicios, que generaran las nuevas plántulas, requieren un aumento en la relación auxinas-citoquininas para que formen raíces, esta operación en algunos casos se lleva a cabo "ex vitro" con medio sin agente gelatinizante.

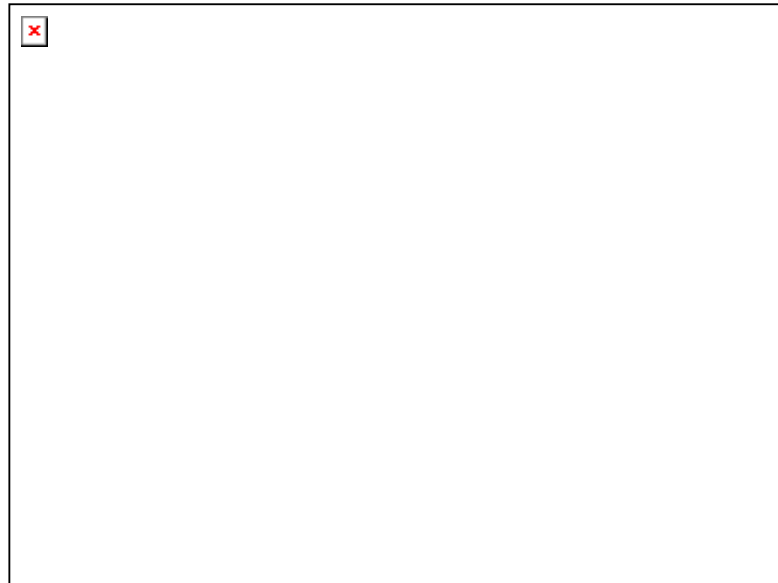
**Etapas 4** ó aclimatación; En la que las nuevas plantitas se adaptan al medio "ex vitro" (invernadero) y en un ambiente cambiante pero controlado, en ella se endurecen los tejidos y la planta se vuelve cada vez más autótrofa.

## **1. Cultivo de meristemos**

Los meristemos son conjuntos de células indiferenciadas que se están reproduciendo continuamente por mitosis y permiten que la planta crezca en tamaño ya sea hacia

arriba (ápice caulinar) o hacia abajo (ápice radicular) o en grosor. Por ser un tejido nuevo en la planta no alcanzan a desarrollar haces vasculares o de conducción, lo que impide que patógenos como los virus, viroides y otros patógenos vasculares como por ejemplo *Fusarium sp.*, no alcancen estas células, lo que garantiza que si se utilizan como explantes para cultivo "in vitro" se obtengan tejidos o plántulas sanas. Cultivando meristemos se puede investigar la influencia de los factores ambientales y necesidades del proceso de diferenciación, esto es, que a partir de una célula que contiene toda la información genética se obtenga un organismo complejo como lo es la planta misma (Caroet al., 2004).

Figura 2-3. Fotografía de callos y brotes de *Dianthus caryophyllus*(clavel), obtenidos mediante la siembra de meristemos



Los virus son causantes de grandes pérdidas en cultivos de importancia económica como el crisantemo (*Chrysanthemum morifolium* Ramat) de los cultivos de flores tipo exportación. Debido a que en el estado vegetativo de esta planta no se presentan síntomas de enfermedades virales, la propagación por métodos tradicionales es causa de la diseminación de la enfermedad en estos cultivos. Se comercializan más cultivares de crisantemo que de cualquier otra planta en floricultura. Japón produce más de dos mil millones y Estados Unidos más de trescientos millones de esquejes al año (Barbaet al., 2001).

El cultivo "in vitro" de meristemos apicales, la termoterapia, la quimioterapia, la electroterapia, la microinjertación y la ingeniería genética, son los métodos estudiados hasta ahora para la obtención de plantas libres de patógenos (especialmente virus, micoplasmas, bacterias y hongos), en algunas ocasiones también se combinan algunos

de estos métodos. En general y de manera convencional el cultivo de meristemos apicales es el más utilizado para el logro de estos fines. Para ello se debe hacer de manera aséptica la extracción del domo apical del tejido meristemático, cuya altura oscila entre 0,1 y 0,5 mm, debido a esto la pericia y el uso de un microscopio estereoscopio es de gran ayuda; de la misma forma es necesario hacer un estudio previo de la morfología de los ápices caulinares de la especie que se está trabajando, pues varían de forma y ubicación en las plantas superiores (Pedroza, 2008).

Esta técnica ha sido desarrollada gracias a que se ha comprobado que la distribución de las partículas virales no es uniforme dentro de la planta y hay un menor número de ellas en los meristemos apicales (Franco, 2002 citado por Pedroza, 2008). Las razones por las que ello sucede no son aun muy claras sin embargo se dan las siguientes o una de ellas como las responsables: La velocidad de reproducción de las células del tejido meristemático hace que haya una gran actividad metabólica lo que no le da tiempo a los virus para que se apoderen de la maquinaria biosintética del hospedante; en esta zona no hay células diferenciadas por lo que los tejidos vasculares aun no se han formado y los virus o patógenos deben moverse de célula en célula a través de los plasmodesmos, proceso que es lento y difícil para ellos; y la alta concentración de auxinas que se halla en estos tejidos de crecimiento a diferencia de otras zonas de la planta, algunos autores han propuesto que inhiben la multiplicación de los virus (Pedroza, 2008).

## 2. Conservación de germoplasma

En la actualidad la conservación "in situ" no es suficiente para preservar las especies de plantas en peligro de extinción; por otro lado el mantenimiento de plantas "ex situ" utiliza estrategias como los bancos de semillas y los jardines botánicos. Sin embargo un significativo número de especies no se adapta a esas condiciones, de ahí que la micropropagación y demás técnicas "in vitro" son una herramienta importante para poder conservar este tipo de biodiversidad (Rogers, 2003 citado por Reed et al., 2004). Conservar las especies y poblaciones de plantas en peligro de extinción es importante por el gran deterioro forestal de los últimos años, donde especies endémicas que cubrían el 15.7 % de la superficie terrestre hoy solo cubren el 2.3%. Dentro de ellas aparecen cerca de 8000 especies en peligro de extinción que figuran en la primera Lista Roja de plantas amenazadas de la Unión Internacional para la Conservación de la Naturaleza (IUCN, 1998).

La preocupación por la conservación de la biodiversidad y la riqueza genética ha surgido internacionalmente, debido principalmente al impacto de la sobrepoblación y la necesidades de terrenos y alimentos, lo que influye de igual manera en el futuro de la agricultura, esto ha promovido la creación de bancos de germoplasma, tales como bancos de semillas, bancos de cultivos "in vitro", colecciones de plantas (en campo,

viveros y jardines botánicos). En los países en vías de desarrollo ha ido aumentando el número de ellos con capacidad de preservar el material vegetal a largo plazo. Las estrategias de conservación dependen de la especie vegetal, ciclo de vida, métodos de reproducción y tamaño de los individuos. Dentro de ellas los cultivos “in vitro” ofrecen la capacidad de mantener por periodos prolongados y a bajas temperaturas material vegetal, como plántulas, tejidos somáticos, órganos y células; conservando gran cantidad de germoplasma en espacio reducido y con una importante disminución de costos de mantenimiento (Pedroza, 2008).

Colombia no es ajena a estas preocupaciones de conservación ya que se considera el segundo país con el mayor número de especies de plantas superiores, siendo el más rico en orquídeas y palmas. Por lo anterior Colombia está en el grupo de países mega diversos, ya que tiene entre el 10 y el 15% de la diversidad terrestre mundial con tan solo un 0.77% de la superficie continental del planeta. Para este país la biodiversidad es de importancia estratégica como banco genético de la nación, es base para el desarrollo científico y tecnológico y fundamento para la instauración de nuevos modelos de desarrollo (Orozco y Garcés, 2007).

Según Ligareto et al. (2010) En Colombia hay 18 entidades que manejan bancos de germoplasma, de las cuales 6 son de carácter privado 11 son públicas y una de carácter mixto (ICA-CORPOICA), esta última trabaja especies agrícolas en general y maneja cerca del 70% de la conservación de plantas “ex situ”, las privadas manejan especies de acuerdo a las materias primas acordes con su negocio, las públicas generalmente son más de tipo académico e investigativo (tabla 2-1).

Tabla 2-1. Entidades colombianas que manejan bancos de germoplasma vegetal, bajo condiciones “ex situ”

<b>Entidad</b>	<b>Grupo Especies</b>	<b>Organización</b>
Cartón de Colombia	Forestales	privada
Cenicafé	Café	Privada
Cenicaña	Caña de azúcar	Privada
Coltabaco	Tabaco	Privada
Conif	Maderables	Privada
CVS	Forestales	Público
ICA-Corpoica	Vegetales, animales y microorganismos	Mixto

---

Sinchi	Amazónicas	Público
Unipalma	Palma africana	Privado
Universidad de Antioquia	Ornamentales	Público
Universidad de Caldas	Frutales	Público
UN de Colombia, sede Bogotá	Papa y tubérculos andinos	Público
UN de Colombia, sede Medellín	Frutales tropicales	Público
UN de Colombia, sede Palmira	Hortalizas	Público
Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia, UPTC.	Frutales, forestales y ornamentales	Público
Universidad de Córdoba	Hortalizas, ñame	Público
Secretaría de Agricultura del Valle	Chontaduro	Público
Universidad de Nariño	Uchuva	Público

*Fuentes:* Torres y Reyes, 1997, Lobo, 2003. Citados por Ligareto et al. (2010))

Sin embargo la utilización de los cultivos “in vitro” en la recuperación de especies en vías de extinción en Colombia está aun en etapas de investigación, pues es necesario estudiar las condiciones de los ecosistemas de donde ellas son nativas, como por ejemplo las especies que habitan los páramos o zonas altas de los Andes, como se encontró en el establecimiento de un protocolo de micropropagación de *Puya santossi* donde procesos morfogenéticos fueron inhibidos por grupos de algas que realizan simbiosis con esta planta, a pesar de lo cual se logró establecer un protocolo a nivel de laboratorio (Pedroza y Bejarano, 2008).

## 1. Producción de plantas haploides

Las plantas haploides son aquellas que contienen la mitad de los cromosomas que identifican a la especie como tal. Esta técnica es utilizada por los fitomejoradores para obtener líneas homocigóticas sin pasar por el proceso de endogamia normal; además disminuye el tiempo en un porcentaje considerable para la obtención de una nueva variedad comercial, como en el caso del arroz, cebada y leguminosas (Perea, 2003).

Para obtener las plantas haploides “in vitro” se parte de la hibridación interespecífica o intergenérica y del cultivo de los gametos masculinos o femeninos o de las estructuras que los contienen; sin embargo es más común el cultivo de anteras o polen. Este proceso se llama androgénesis y origina embriones y plantas siguiendo la vía esporofítica es decir formando esporofitos haploides. Mediante esta técnica se siembran anteras inmaduras, es decir que contienen polen en un estado temprano de desarrollo (por ejemplo polen uninucleado temprano, medio ó tardío, dependiendo de la especie) y se forman entonces ya sea embriones o callo que igualmente se convierte en embriones, luego estos son transferidos a medios de cultivo para regeneración donde se forman las plantas (Mroginskiy Roca, 1993).

Para el éxito en la siembra de anteras es necesario hacer una buena selección del material de donde se van a extraer las anteras, las plantas madre deben tener las mejores características fisiológicas, determinar medios específicos de acuerdo a la especie tanto para la siembra como para la regeneración de las plantas; el control de temperatura entre 2-4°C con pretratamientos en frío y entre 25-28°C para la etapa de incubación (Perea y Tirado, 2011). Para cereales y solanáceas, la temperatura adecuada es en promedio 25°C y en la oscuridad (Caro et al., 2004).

## 2. **Rescate de embriones**

Los embriones vegetales pueden ser de dos clases; embriones zigóticos y embriones somáticos; los primeros son de origen sexual producto de la polinización y fecundación del óvulo por parte del núcleo germinativo del polen para formar el cigoto, es decir hay conjugación o intercambio de material genético. El embrión somático en cambio es producto de células somáticas diploides y diferenciadas o haploides como en el caso de los gametos (cultivo de anteras). El rescate y cultivo de embriones zigóticos es una herramienta muy valiosa en la agricultura y consiste en la extracción del embrión inmaduro desde la semilla para que germine y crezca en un medio de cultivo específico dando origen a una nueva planta (Caro et al., 2004).

Esta técnica es útil para embriones inviables es decir presentan abortos o de semillas recalcitrantes que presentan largos periodos de dormancia antes de que germinen, para rescatar embriones híbridos producidos por cruzamientos interespecíficos y también para el estudio de necesidades nutricionales durante el desarrollo embrionario (Perea y Tirado, 2011).

## 3. **Variación somaclonal (selección in vitro)**

Como se ha mencionado antes el cultivo de tejidos vegetales “in vitro” tiene asociados cambios genéticos durante el proceso del cultivo, causados por el estrés a que es



sometido el explante, llamados variación epigenética transitoria y cambios o mutaciones genéticas al azar. Esta característica de los cultivos “in vitro” se ha tomado como una herramienta de reproducción y mejoramiento de plantas, ya que se pueden seleccionar los mutantes con características deseadas para el agricultor y el mercado y multiplicarlas hasta obtener una nueva variedad (Larkin y Scowcroft, 1981 citado por Patiño, 2010).

La variación somaclonal no es deseable cuando se hace micropropagación, pues allí lo que se busca es la uniformidad de las plántulas obtenidas, para lo cual se deben usar explantes que tengan una organización previa, para ello se siembran meristemos, yemas, nudos, etc. Sin embargo cuando se trata de buscar nuevas variedades con rasgos deseables la variación somaclonal puede ser estimulada y aprovechada como una herramienta útil en la selección de mutantes que hagan parte de un programa de fitomejoramiento. En este procedimiento la presión de selección se aplica a un gran número de células evitando la selección de plantas individuales en pruebas de campo convencionales, de ahí que esta técnica de selección artificial también pueda ser llamada selección “in vitro” (Patiño, 2010)

Los mecanismos de la variación somaclonal deben ser entendidos en los cultivos “in vitro”, no solamente para aumentar la variabilidad de las plantas en los programas de mejoramiento, sino también para mantener la uniformidad del material vegetal en la micropropagación, la conservación de germoplasma “in vitro” y para controlar el o los mecanismos que dirigen esa misma variación (Mroginski y Roca, 1993).

A nivel molecular algunas causas a las que se les atribuye la variación somaclonal son: mutaciones puntuales, rearreglos y recombinaciones cromosómicas, metilación del ADN, alteración en el número de copias de segmentos de ADN, yocurrencia de elementos transponibles (Jain, 2001 citado por Patiño, 2010).

#### 4. **Mutagénesis**

Las mutaciones son los cambios o alteraciones del material genético dentro de las células de un ser vivo, que se expresan en su fenotipo y son heredadas a su descendencia. Estas mutaciones son de tres tipos: las primeras se presentan cuando ha habido un cambio químico dentro del gen, esto es, ha habido una alteración en la secuencia y se conoce como mutación genética o de punto; las segundas son las producidas por translocaciones, inversiones superiores y duplicaciones entre otras de los cromosomas esto es alteraciones cromosómicas; y las terceras son las que implican cambios en el número de cromosomas es decir la poliploidía. Las mutaciones pueden ser espontáneas o inducidas (artificiales), estas últimas son las más frecuentes pues los fitomejoradores las usan como fuentes en la búsqueda de mejores variedades. En la selección de los mutantes favorables es necesario superar dos problemas por un lado los cambios perjudiciales superan a los favorables y por otro la mayoría de los mutantes son recesivos (Pedroza, 2008). Los procedimientos artificiales para inducir las mutaciones

utilizan agentes físicos y químicos; el cultivo “in vitro” bajo condiciones especiales es otra manera de generar mutantes (variación somaclonal).

Los agentes físicos utilizados son las radiaciones ionizantes y no ionizantes, ellas poseen diferente poder de ionización y de penetración dentro del tejido vegetal. Las radiaciones ionizantes son los rayos X, rayos gamma, los neutrones, los protones y los rayos alfa; mientras que los rayos ultravioleta son no ionizantes. Según Hopp et al. (2010), las radiaciones al atravesar los tejidos y células producen radicales inestables y electrones libres, que desencadenan reacciones químicas con las moléculas de la célula como el ADN, donde ocurren cambios como la deaminación de bases y producción de 8-hidroxiadenina y de varios glicoles de timina, oxidación de los grupos alcohol de la desoxirribosa y roturas de las uniones carbono-carbono. Esto produce en las moléculas celulares más daños que beneficios, un alto grado de letalidad celular y esterilidad de las plantas obtenidas en la primera generación del tratamiento, lo que limita grandemente el número de mutantes en la segunda generación, donde se expresarán los cambios obtenidos. La luz ultravioleta por ser no ionizante posee bajo poder de penetración por lo que es utilizada para materiales delgados, como granos de polen y cultivos celulares o de tejidos. Los efectos típicos de las radiaciones son las deleciones y las translocaciones en los cromosomas (aberraciones), que han sido utilizadas para ubicar genes sobre los cromosomas.

Los agentes mutagénicos de tipo químico a diferencia de las radiaciones son más específicos, dando como resultado por ejemplo sustituciones del tipo transición (ácido nitroso) o mutaciones de desfase de lectura (acridinas). Se utilizan sustancias alquilantes que introducen grupos alquilo a las macromoléculas, dentro de ellas están el etil metano sulfonato (EMS) y el metil metanosulfonato (MMS), los dialquil sulfatos, como el dimetilsulfato (DMS) y el dietilsulfato (DES); y los compuestos nitrosos, como la N-metil-N-nitroso-urea (MNU ó MNH) y la N-etil-N-nitroso-urea (ENU). Un mutágeno muy eficiente en algunas plantas cultivadas, como cebada, arveja, trigo y arroz, es la azida sódica (Hopp et al., 2010).

La utilización de los cultivos “in vitro” para llevar a cabo los procesos de mutagénesis tiene la ventaja de facilitar la selección de mutantes desde un gran número de células que hayan sido mutagenizadas. Estas mutaciones pueden ser inducidas en tejidos meristemáticos, en tejidos diferenciados que son cultivados en medios inductores de organogénesis directa o en células en suspensión en medios inductores de organogénesis indirecta (Pedroza, 2008).

Actualmente se está trabajando en una técnica llamada TILLING (*Targeting Induced Local Lesions in Genomes*), que fue desarrollada inicialmente en *Arabidopsis thaliana*, luego también se utilizó en maíz, soya, papa, trigo, tomate, lechuga y girasol. Se usa para determinar la función de un gen o secuencia incógnita y por ello se le reconoce como una técnica de genética inversa, permite analizar muestras de muchos individuos que han sido previamente mutagenizados, aunque para poder utilizarla se necesita

conocer previamente la secuencia del gen o del segmento genómico que se desea analizar, sin embargo no es necesario conocer el genoma completo (Hopp et al., 2010).

### **1. Hibridación somática**

Una manera de manipular genéticamente las plantas es la unión o fusión de células somáticas sin pared celular, esto es lo que se ha llamado fusión de protoplastos y es una de las técnicas que se llevan a cabo mediante cultivos “in vitro” de células en suspensión, degradación enzimática de la pared celular y cultivo de los protoplastos obtenidos para que se fusionen, ya sean de la misma especie o de especies diferentes. Cuando se da este último se le llama hibridación somática. Además de esta el cultivo de protoplastos “es un sistema ideal para la investigación en procesos de transporte y división celular, morfogénesis, mutagénesis, selección, transformación genética. En fitopatología se utilizan para estudiar la etiología de los virus, su absorción, procesos infectivos y replicación” (Perea y Tirado, 2011).

Según Pedroza, hay dos formas de llevar a cabo el proceso de fusión de protoplastos, la fusión espontánea y la fusión inducida. En el primer caso los plasmodesmos de células vecinas del mismo tejido juegan un papel muy importante en el proceso entonces, la fusión produce homocariontes, es decir protoplastos con más de un núcleo de la misma especie, por lo tanto no hay hibridación somática. En segundo caso el proceso se induce con agentes físicos o químicos, físicamente se lleva a cabo mediante electroporación o electrofusión, químicamente se induce utilizando principalmente soluciones de polietilenglicol (PEG). En este caso si las especies son iguales se producen homocariontes, y heterocariontes si los protoplastos son de especies diferentes, en ambos casos los núcleos se mantienen separados y en algunas ocasiones se fusionan, obteniéndose así híbridos somáticos (Pedroza, 2008).

Los híbridos somáticos así obtenidos pasan por pruebas de evaluación que involucran un análisis morfológico, un análisis isoenzimático, un análisis cromosómico y también un análisis de ADN nuclear. La caracterización de los híbridos somáticos es necesario llevarla a cabo, debido a que en la fusión de protoplastos el comportamiento del genoma de mitocondrias y cloroplastos es independiente del genoma nuclear, esto implica que el producto final es una mezcla de células híbridas con células no híbridas, dentro de las híbridas a su vez células con características citoplasmáticas diferentes y al no contar con buenos mecanismos de diferenciación y separación el procedimiento no tendría ninguna utilidad en el mejoramiento genético de las células, pues en algunos casos lo que se busca es regenerar las células híbridas en plantas completas. Se han propuesto dos formas de selección de los protoplastos híbridos somáticos, una selección mecánica directa y una selección de complementación. En el primer procedimiento se utilizan micropipetas y se seleccionan por coloración, la cual es diferente de los protoplastos antes de la hibridación; en el segundo caso se utilizan medios de cultivo selectivos (como mutantes auxotróficos) combinada con marcadores genéticos donde solo se desarrollan los híbridos formados (Szabados, en Mroginski y Roca, 1993).

## 1. Ingeniería genética

La transferencia de un gen o genes de manera controlada al genoma de una planta, desde otra especie vegetal alejada evolutivamente o también desde cualquier otro organismo vivo diferente, desde los virus y bacterias hasta los animales, es la tecnología que se ha denominado ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante. Los organismos modificados de esta manera son conocidos como Organismos Genéticamente Modificados (OGMs), que en el caso particular de las plantas, se llaman “Plantas Transgénicas” (Díaz et al., 2010). Es un procedimiento que no involucra el intercambio de material genético como se lleva a cabo en el caso de la fecundación, igualmente se diferencia de la hibridación somática en que el material genético introducido es un fragmento conocido y controlado de ADN (Pedroza 2008).

El dominio de las técnicas de cultivos vegetales “in vitro” y sus condiciones medioambientales controladas, han servido para el gran conocimiento actual de los procesos fisiológicos y de biología y genética molecular de las plantas, por lo que a su vez son la plataforma o base sobre la cual también se han desarrollado las plantas transgénicas y en general del mejoramiento genético (Calderón, Roca y Jaynes en Mroginski y Roca, 1993). Luego de la obtención de las células transgénicas, se regeneran las plantas completas aprovechando la totipotencialidad celular, evitando los subcultivos para disminuir los efectos de la variación somaclonal, para ello también se utilizan células con genotipos conocidos lo mismo que sus respuestas en el cultivo “in vitro”, pues lo que se busca es el efecto del gen o genes que han sido introducidos (Díaz et al, 2010).

En la agricultura esta tecnología se aplica para la obtención de plantas con resistencias a factores ambientales de tipo biótico, como virus, bacterias y hongos; a factores abióticos adversos, como salinidad, sequías, etc.; y con tolerancia a los herbicidas. También se busca mejorar la productividad, el valor nutritivo y la capacidad de almacenamiento de sus frutos o partes que sirvan de alimento a los seres humanos y animales. En el campo de la investigación permite el estudio de la estructura y función de genes específicos, muy importante en el campo actual de la genómica (Díaz et al., 2010).

Los fragmentos de ADN (genes) son introducidos dentro de las células hospederas mediante vectores biológicos como plásmidos bacteriales o mediante procedimientos físicos como la transformación de protoplastos mediada por polietilenglicol (PEG), la electroporación, microinyección y el bombardeo de micropartículas (pistola genética) (Pedroza, 2008). Los transgenes deben ser preparados antes de ser unidos al vector, están compuestos por una secuencia codificadora y secuencias reguladoras, estas últimas deben ser las correspondientes a células vegetales, de ellas la más importante es

la del promotor que depende de la especie y función del gen y una secuencia de terminación, la variación de los promotores o la adición de secuencias extra hace incluso intensificar la expresión del gen transferido (Díaz et al., 2010).

La transformación mediante el vector biológico más importante es aquella mediada por *Agrobacterium*, este es un género de bacterias que viven naturalmente en el suelo y son capaces de colonizar las células de las plantas, existen cuatro especies dos de las cuales se conocen muy bien *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*, ambas infectan las heridas de una gran variedad de dicotiledóneas atacando las células individuales y provocando la proliferación de las mismas, la primera causa la enfermedad denominada agalla de la corona (tumor en la base del tallo) y la segunda la enfermedad de “raíz en cabellera” que es la inducción a la formación de muchas raíces (Pedroza, 2008).

El vector más utilizado y con protocolos establecidos para más de 600 especies vegetales es el de *A. tumefaciens*, la mayoría de ellas dicotiledóneas y gimnospermas, muy rara vez monocotiledóneas (Díaz et al., 2010). *A. tumefaciens* posee un megaplásmido o una estructura circular de ADN dentro del citoplasma bacteriano pero fuera del cromosoma principal, dicho plásmido se denomina pTi (plásmido inductor de tumores), el pTi contiene a su vez genes con toda la información para transferir parte de su ADN, esta región del plásmido se denominan T-DNA (por “transfer DNA”), es lo que se transfiere a las células hospederas y codifica para síntesis de opinas, proteínas utilizadas como fuente para el metabolismo del carbono y del nitrógeno en la bacteria. El método básico entonces consiste en eliminar los genes del T-DNA y en su lugar colocar los transgenes de interés. Luego de esto se debe hacer el cocultivo entre los explantes vegetales y las cepas bacterianas transformadas, transferir después de un tiempo determinado a medios de selección y de regeneración, para regenerar las plántulas transgénicas (Instituto de Estudios Ambientales IDEA, 2001).

Figura 2-4. Estructura del T-DNA según Díaz et al. (2010)

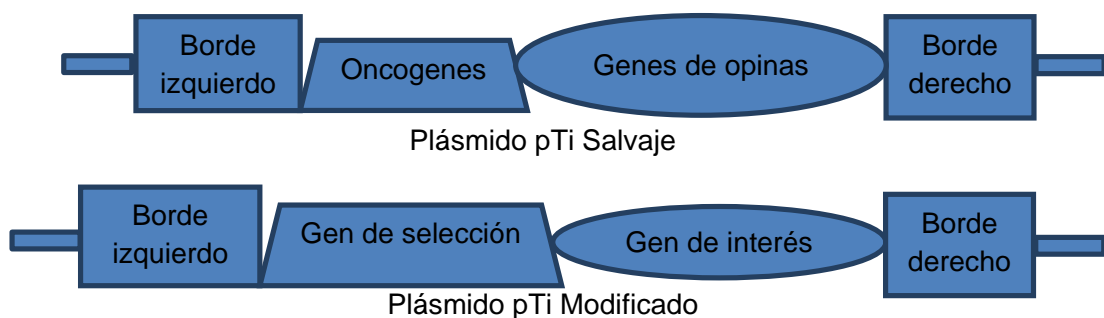


Figura 2-5. Diagrama que representa la transformación genética de las plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens*



La transformación de protoplastos mediada por el PEG fue el primer método y es el más usado para transferencia directa de ADN foráneo dentro de las plantas. El PEG altera la polaridad de la membrana plasmática induciendo la formación de poros a través de los cuales se introduce el material genético extra que se encuentra dentro del cultivo de protoplastos en suspensión. De la misma forma se utiliza el procedimiento de electroporación donde la formación de los poros se logra sometiendo los protoplastos a un campo eléctrico. En estas dos técnicas y la de microinyección el cultivo “in vitro” de protoplastos es de suma importancia, su dominio y complejidad está disponible solo en algunas especies de genotipos modelo, de la misma forma que la regeneración de plántulas a partir de los mismos (Pedroza, 2008).

La microinyección es la técnica más precisa y directa de los procedimientos físicos de transformación genética, en ella se descarga los fragmentos moleculares o macromoléculas dentro del citoplasma celular o directamente dentro del núcleo. Con este mecanismo se han logrado transformar protoplastos de alfalfa y tabaco. Algunas ventajas que se tienen a través de este proceso son: La versatilidad, ya que se puede utilizar para introducir dentro del protoplasto otras estructuras como plastidios, mitocondrias y cromosomas; la cantidad de ADN puede ser regulada, se pueden seleccionar las células que se van a transformar ya que se tiene el control visual, se podría transformar cualquier especie, la alta frecuencia de transformación comparada con otros métodos (Pedraza, 2008). Pero también la microinyección presenta desventajas críticas, como la dificultad de trabajar a nivel microscópico con capilares de inyección y micromanipulador, la

limitación a una sola célula por cada microinyección y la dificultad para obtención y cultivo de protoplastos de un gran número de especies (Díaz et al., 2010).

La técnica del bombardeo de micropartículas o “pistola genética” ha venido siendo perfeccionada de tal forma que es la más utilizada para la introducción directa del ADN. Utiliza partículas de oro o tungsteno por ser inertes químicamente, recubiertas con el material genético que se va a introducir en las células, estos microproyectiles cuyos tamaños oscilan entre 0,5 y 3  $\mu\text{m}$ , son acelerados a gran velocidad mediante gas helio comprimido, de tal forma que son capaces de atravesar las paredes y membranas celulares sin causar daños significativos. Así material blanco de estos bombardeos puede ser cualquier tipo de explante vegetal, desde células o protoplastos hasta plántulas completas. Estos materiales se someten a tratamientos osmóticos pre y post bombardeo, para que las células sufran plasmólisis y así evitar que el impacto y la penetración les causen daño (Díaz et al., 2010)

La “biolística” como también se ha denominado el bombardeo de micropartículas ha sido una muy buena opción para la obtención de plantas transgénicas de soya, sorgo, papaya, esparrago, caña de azúcar entre otras. La ventaja más evidente de ella es la versatilidad para regular la aceleración de las partículas, lo que ha permitido evitar barreras no superadas por otros métodos, tales como el número de especies que se pueden trabajar superando a la técnica con *Agrobacterium* y el cultivo y regeneración de protoplastos en el caso de la microinyección o electroporación. Las dificultades que se han encontrado en esta práctica son la resistencia natural a la penetración de las partículas, por parte de algunas especies con estructuras especiales en sus paredes celulares endurecidas con lignina o superficies vellosas; y la principal desventaja es la baja frecuencia de transformación de las células, es decir el bajo número de células transformadas efectivamente comparado con el gran número de las mismas que es bombardeado (Díaz et al., 2010).

Dentro de la perspectiva de la ingeniería genética, quizá el gran reto es producir plantas mejoradas y de bajo impacto ambiental, de tal manera que contribuya con la solución al gran problema del suministro alimenticio a nivel mundial, pues lo previsto es un gran desequilibrio antes de mediados del presente siglo, con el ritmo de crecimiento poblacional actual. En los últimos años, además de los estudios para la obtención de plantas transgénicas, se está trabajando también en la obtención de plantas transplastómicas. En el primer caso el genoma vegetal se ha transformado solo a nivel nuclear, mientras que en el segundo caso, se ha transformado también el genoma mitocondrial y el genoma de los plástidos (plastoma). Las plantas transplastómicas tendrían ventajas mucho mayores en cuanto a rendimientos con respecto a las transgénicas (Díaz et al., 2010).

## 2. Metabolitos secundarios

El uso de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales “in vitro” para la producción de metabolitos secundarios, es una de las aplicaciones que ha generado una gran expectativa, pero que aun requiere mucho trabajo de diseño y control así como disminución de costos para poder competir con las biotecnologías de fermentación con microorganismos o la síntesis química de los productos deseados. Sin embargo la producción del pigmento shikonina a partir de las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*, mediante el uso de cultivo de células en suspensión a escala industrial, realizado por la empresa petroquímica Mitsui en el Japón y su venta a 4000 dólares por kilogramo el producto (Loyola et al., en Mroginski y Roca, 1993), ha generado muchas expectativas; ese pigmento es un antimicrobiano empleado en la industria de cosméticos (Lucas y Valle, 2010) y nos muestra el potencial que tiene los cultivos vegetales de este tipo para la producción de estas sustancias de baja concentración en plantas normales y que tienen múltiples aplicaciones.

Los metabolitos secundarios son sustancias producidas por las plantas y cuya función es indispensable para su relación con el medio ambiente donde se desarrollan, pero no son primordiales para su supervivencia, crecimiento y reproducción; de la que se encargan los procesos metabólicos que producen los metabolitos primarios (aminoácidos, carbohidratos, ácidos grasos, etc.). Dentro de sus funciones específicas están la defensa contra predadores y patógenos, alelopatía o efectos sobre otras plantas vecinas, atracción de polinizadores y dispersadores de semillas. Específicamente cada una de estas sustancias es característica de alguna especie en particular o grupo de ellas pertenecientes a un grupo filogenético particular. Suelen producirse en estructuras o tejidos especializado dentro de la planta aunque no es una generalidad (Díaz et al., 2010). Casi siempre una alta concentración de nitratos, potasio, amonio y fosfatos (macronutrientes) hacen que el metabolismo de la planta se dirija hacia el crecimiento rápido, mientras que una baja concentración de los mismos lo desacelera y favorece la acumulación de metabolitos secundarios (Loyola et al. En Mroginski y Roca, 1993).

Según sus rutas metabólicas se pueden clasificar en tres grupos: terpenos que son compuestos lipídicos derivados del isopentenil difosfato (IPP), fenilpropanoides que son compuestos fenólicos derivados de la vía del shikimato o del malonato; y alcaloides que son compuestos nitrogenados derivados de aminoácidos (Díaz et al., 2010). Algunos ejemplos de ellos citados por Pedroza (2008) son, el ácido abscísico (un sesquiterpeno) que es una importante hormona vegetal y también un agente alelopático; glucósidos cianogénicos; flavonoides; alcaloides (cafeína, cocaína, quinina, etc.).

La mayoría de los ensayos para la producción de metabolitos secundarios mediante la utilización de los cultivos “in vitro”, han tenido rendimientos más bajos que los dados por las plantas normales; de la misma forma, en casos donde hay mayor rendimiento que ellas, los subcultivos sucesivos hacen que el sistema se vuelva inestable genéticamente y pierda el incremento ganado en el rendimiento del producto deseado (Pedroza, 2008). En gran volumen también se presentan problemas que dificultan el escalamiento del cultivo de células en suspensión, entre ellos están el lento crecimiento de la biomasa,



fuerte tendencia a la agregación celular, acumulación intracelular de los productos y poca resistencia a la agitación mecánica. Las estrategias para resolver estas dificultades están dirigidas a la optimización de los medios de cultivo, inmovilización de células en matrices inertes, permeabilización y diseño de biorreactores especiales (Loyola et al. En Mroginski y Roca, 1993).

En cuanto al aumento en el rendimiento de la producción de metabolitos secundarios, se han trabajado metodologías como la fusión somática, la biotransformación de precursores y la modificación genética seleccionando líneas sobreproductoras (Pedroza, 2008). Esta última ha ganado espacio gracias a los avances de la genética y la biología molecular, mediante la estrategia de utilizar los factores de transcripción en la manipulación genética del metabolismo secundario. Así se conocería cuáles de ellos regulan una determinada vía metabólica y por lo tanto se puede inducir la expresión de toda la vía metabólica en su conjunto por sobreexpresión de los genes que codifican dichos factores. No obstante las vías metabólicas deben existir en la planta o de lo contrario es necesario crearlas mediante la ingeniería genética (Díaz et al., 2010).

## **2. El laboratorio de cultivo de tejidos vegetales “in vitro”**

### **1. Distribución del laboratorio**

Los laboratorios para el cultivo de tejidos vegetales “in vitro”, están especialmente diseñados y acondicionados para cumplir con las etapas de la micropropagación, deben poseer áreas para lograr llevar los explantes asépticamente a los medios de cultivo, preparados con las características que exijan los protocolos y de acuerdo con los objetivos buscados. El espacio requerido también depende de si es de tipo investigativo o comercial, por ejemplo para un pequeño laboratorio que solo desee dedicarse a la micropropagación debe disponer mínimo de tres zonas bien definidas, como son: Cuarto de preparación de medios de cultivo, cuarto de siembra y cuarto de incubación (Barba et al., 2001). Algunas características o criterios que se deben tener en cuenta para el diseño y construcción de un laboratorio, deben incluir aspectos tales como, aislamiento, mínimo tráfico de personal, mecanismos de contención que eviten la contaminación de cuartos contiguos, sistema de control de temperatura, servicio continuo de agua limpia, un fregadero y desagües adecuados, servicio eléctrico adecuado y continuo, una buena ventilación con sistemas de filtro de aire y una excelente iluminación ya sea natural o artificial (Bridgen y Bartok, 1987). Sin embargo un laboratorio que pretenda ofrecer más productos y servicios para competir ya sea en el comercio o la investigación posee otras áreas con sus especificaciones y funciones determinadas como las mencionadas por Mroginski y Roca (1993), algunas de ellas pueden estar en la misma sala o en salas independientes y son las siguientes: Área de preparación, área de lavado y esterilización,

---

área de transferencia, área de incubación, área de observación y examen, área de crecimiento, área de cuarentena, área de control fitosanitario y área de oficina. Las primeras son básicas y las tres últimas son opcionales dependiendo de la envergadura del laboratorio.

### **1. Área de lavado y esterilización**

Pueden ser dos áreas separadas, sin embargo en la primera debe estar todo lo relacionado con las sustancias o detergentes para el lavado del material de vidrio y del material vegetal que ingresa al laboratorio. Contar con un fregadero y su respectivo desagüe, conexiones de agua fría y caliente, hornos de secado y también puede tenerse allí lavadores y secadores de pipetas. Otros elementos indispensables en esta área son los guardianes y recipientes para desperdicios debidamente marcados para desechos biológicos y no peligrosos. El área de esterilización debe tener básicamente un sistema ya sea por calor húmedo, como un autoclave; o por calor seco, como un horno; con la capacidad adecuada de acuerdo con el flujo de material de vidrio o metal trabajado; también es conveniente un gabinete o espacio para depositar temporalmente el material recién esterilizado (Bridgen y Bartok, 1987).

### **2. Área de preparación de medios**

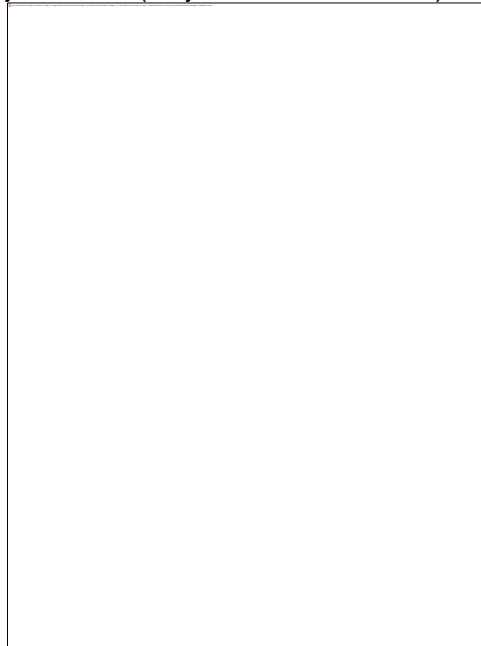
En esta área debe contar con un buen suministro de agua destilada y esterilizada, por lo que debe disponer de un destilador y desionizador de agua; igualmente debe tener un gabinete con material de vidrio aforado y volumétrico, un gabinete con sustancias químicas con grado analítico debidamente rotuladas, recipientes de vidrio esterilizados para servir los medios, balanzas grameras, una balanza analítica, mesas de trabajo adecuadas, planchas de calentamiento con agitación, refrigerador, incubadora, micropipetas y un pH metro entre otros elementos.

### **3. Área de transferencia**

Es el sitio donde los explantes luego del proceso de lavado y desinfección son sembrados o inoculados dentro del medio de cultivo que también viene esterilizado. Aquí es donde se debe garantizar una atmósfera lo más estéril posible por lo que el equipo más importante es una cabina de flujo laminar, que contiene un filtro especial llamado

filtro HEPA. Igualmente debe ser un espacio cerrado sin corrientes de aire, para aumentar la duración del filtro y disminuir la contaminación con partículas como esporas de hongos o bacterias. La esterilización del aire también se puede lograr mediante el uso de lámparas de luz ultravioleta que se deben prender por tiempos de 15 minutos mínimo, sin la presencia de los operarios del laboratorio, por supuesto es un proceso más costoso (Barba et al., 2001). Igualmente aquí se puede utilizar un bactoincinerador a cambio de los mecheros de alcohol que se usan normalmente para esterilizar pinzas y bisturíes.

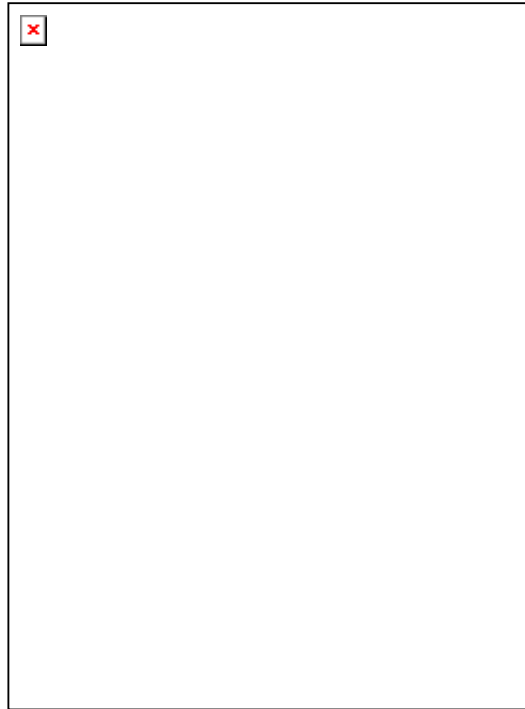
Figura 2-6. Cámara de flujo laminar (Flujo de aire horizontal)



#### 4. Área de incubación

Aquí debe haber estantes de metal o madera donde se van a colocar los frascos con el explante que salen del cuarto de siembra (área de transferencia). En ella se debe garantizar un control de temperatura que se puede graduar entre 20 y 30°C, una iluminación controlada y graduable 1000 a 5000 lux, que permita fijar el fotoperiodo y ofrezca una humedad relativa del 70 u 80%. Un buen sistema de aire acondicionado es de utilidad en este espacio. Por otra parte debe tener un sistema para mantener cultivos en agitación y una zona de oscuridad para aquellos que la necesiten para su incubación.

Figura 2-7. Fotografía de frascos inoculados en el cuarto de incubación y crecimiento



## 5. Área de observación y examen

Es un espacio para la observación del material en incubación y en crecimiento, que permita retirar o aislar el material contaminado, o que presente alguna anomalía. Aquí es indispensable el uso de microscopios comunes o especiales y estereoscopios, estos son útiles también cuando se extraen y siembran meristemas en la zona de transferencia (Mroginski y Roca, 1993).

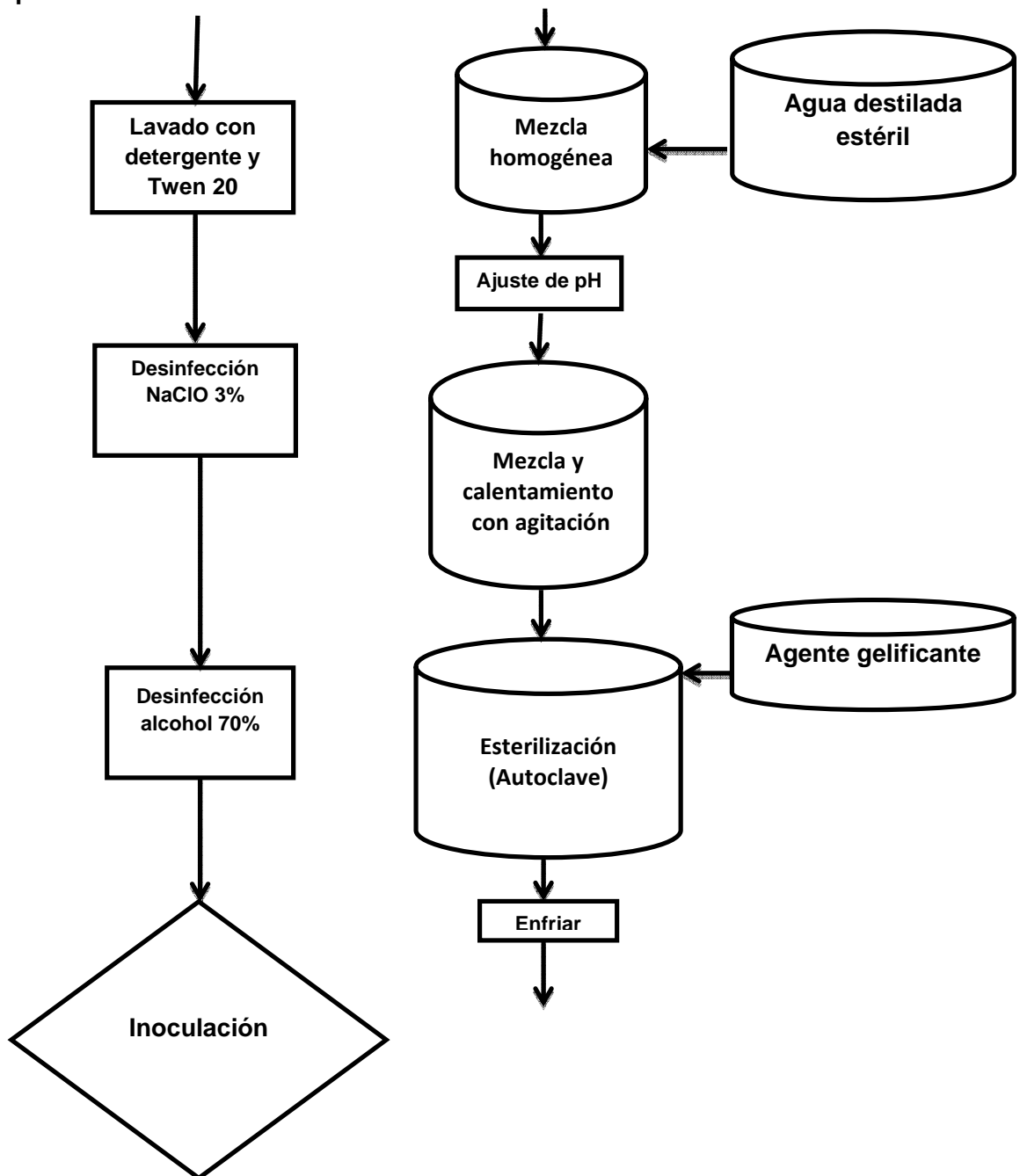
## 2. Proceso de trabajo en el laboratorio

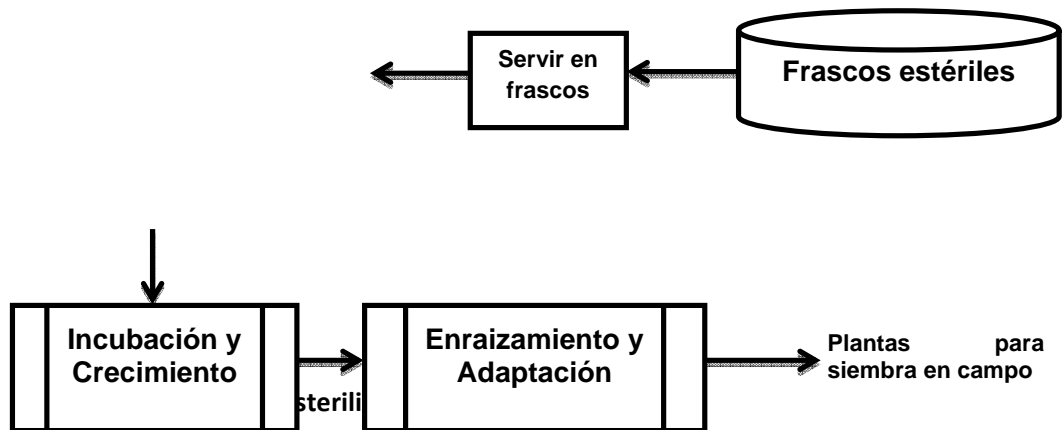
En términos generales el procedimiento para la obtención de plántulas utilizando las herramientas de los cultivos de tejidos vegetales, consiste en una serie de pasos dados por protocolos establecidos previamente mediante la investigación. De acuerdo con el tipo de material vegetal que se va a trabajar empieza con la selección del explante y termina con el tejido establecido "in vitro" o con la plántula adaptada si fuera el objetivo.

Hay unas operaciones o procedimientos básicos que merecen un especial cuidado para lograr buenos resultados en el proceso total, ellos son: La esterilización y asepsia, la preparación del medio de cultivo, la siembra e incubación del material y el proceso de adaptación en invernadero. El diagrama de flujo de la figura 2-8 representa los procedimientos básicos llevados a cabo en el laboratorio.

Figura 2-8. Diagrama de flujo del proceso de trabajo en el laboratorio de cultivo de tejidos "in vitro"

**Explantos Soluciones Stock**





Las fuentes de contaminación más comunes en el trabajo de cultivo de tejidos vegetales son: El material vegetal (explante), el operario, el medio de cultivo los equipos, el material de vidrio y el aire. Los procedimientos que se llevan a cabo para la eliminación de los microorganismos desde las superficies de los materiales inertes o explantes es lo que se conoce como asepsia. Esta se puede lograr mediante tratamientos físicos o químicos; en el primer caso se utiliza normalmente vapor de agua sobrecalentado, calor de llama o luz ultravioleta; en el segundo caso se utilizan soluciones de alcohol etílico, hipoclorito de sodio, sustancias bactericidas o fungicidas (sulfato de gentamicina, penicilina y sulfato de estreptomycin) entre otras (Mroginski y Roca, 1993).

La asepsia del medio de cultivo, el instrumental del laboratorio, los elementos de vidrio, el papel aluminio, y otros elementos inertes que soporten el calentamiento; se logra mediante el uso del autoclave, teniendo en cuenta que el tiempo depende de la cantidad de material que se va a trabajar, esto es crítico para el medio de cultivo pues las sustancias químicas se pueden descomponer. Se deben seguir los protocolos de uso del mismo y con las medidas de protección contra altas presiones y materiales calientes para evitar accidentes. Las condiciones de esterilización en autoclave dependen de la capacidad y la cantidad de material que se esterilice, pero en muchos casos son 15 psi (libras por pulgada cuadrada) y 120°C entre 15 y 20 minutos. Los frascos con medios contaminados se deben esterilizar primero antes de disponer del material en su interior, nunca se deben mezclar en el autoclave con otros elementos o materiales de trabajo. Igualmente se debe recordar que el material volumétrico de vidrio no debe ser calentado o secado con calor (Caro et al., 2004).

La asepsia de los explantes que se van a trabajar se puede lograr mediante la desinfección con sustancias químicas, teniendo en cuenta que el material debió ser seleccionado de tal forma que internamente no traiga microorganismos patógenos. El procedimiento es necesario llevarlo a cabo con cuidado para no maltratar o dañar el explante. No hay un tratamiento único recomendado pero hay uno que se utiliza habitualmente. Luego de un lavado previo con agua corriente y detergente entre 5 y 15

minutos, se pasa a la cabina de flujo laminar y se hace una desinfección doble, primero con etanol al 70% en volumen entre 20 y 60 segundos, y luego con hipoclorito de sodio del 1-3% durante un tiempo que puede oscilar entre 3 y 30 minutos; luego de aplicar cada uno de los desinfectantes siempre se debe enjuagar por lo menos tres veces con agua destilada estéril. Es también común adicionar al desinfectante un tensoactivo como el Twen 20 en concentraciones entre 0,01 al 0,1%. Las sustancias termolábiles se deben desinfectar utilizando filtros microbiológicos (Mroginski et al., 2010).

La asepsia del operario se garantiza con la disciplina y el seguimiento de protocolos durante su trabajo en el laboratorio, para ello debe seguir las recomendaciones básicas especialmente para operar la cámara de flujo laminar, tales como el uso de los implementos personales de protección desechables o esterilizados (bata, cofia, tapabocas, polainas, etc.), antes de empezar la siembra debe alistar todo los materiales asépticos necesarios dentro de la cámara de flujo laminar, y antes de iniciar la inoculación se debe bañar las manos inclusive hasta los codos con abundante agua y jabón desinfectante, evitar retirarse de la cámara antes de terminar el procedimiento completo y evitar que se abra o cierre la puerta mientras está en este proceso (Caro et al., 2004).

## 2. Preparación del medio de cultivo

La composición del medio de cultivo garantiza que se le suministren los nutrientes al tejido vegetal "in vitro", debe ser muy parecido a las condiciones nutricionales que ofrece el suelo a las plantas en su estado natural. Los componentes principales del medio son: macronutrientes, micronutrientes, vitaminas, aminoácidos, azúcares, agentes gelificantes y hormonas o reguladores de crecimiento (Perea y Tirado, 2011). No existe un medio universal para todos los propósitos ni para todas las especies que se trabajan in vitro, sin embargo se puede utilizar el medio básico o de Murashige y Skoog (M&S) si las plantas no son sensibles a altas concentraciones salinas, en caso contrario se pueden usar el medio Heller o el medio Knop (Caro et al., 2004). Actualmente se encuentran más de 60 medios comerciales que se venden listos para micropropagación y la literatura menciona alrededor de 2000 formulaciones diferentes (Mroginski et al., 2010). En la tabla 2-2 se muestran tres medios de los más utilizados en la actualidad.

Tabla 2-2. Medios básicos usados actualmente

Compuestos químicos	Murashige y Skoog (M&S), (1962) mg·L <sup>-1</sup>	Gamborg (B5), (1968) mg·L <sup>-1</sup>	Chu C. C. et al. (N6), (1975) mg·L <sup>-1</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.650	-----	-----
KNO <sub>3</sub>	1.900	2.500	2.830

---

$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	-----	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	166
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-----	134	463
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	185
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-----	150	-----
KI	0,83	0,75	0,80
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	-----	10,00	-----
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6,20	3,00	1,60
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,30	-----	4,40
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,60	2,00	1,50
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	-----
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	-----
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27,80	27,80	27,85
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37,30	37,30	37,25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	-----
Glicina	2,00	-----	2,00
Tiamina-HCl	0,10	10,00	1,00
Piridoxina-HCl	0,50	1,00	0,50
Ácido Nicotínico	0,50	1,00	0,50
Mioinositol	100,00	100,00	-----
Sacarosa	30.000,00	20.000,00	50.000,00
PH	5,7	5,5	5,8

**M&S** = Medio de Murashige y Skoog (Physiol. Plant. 15: 473 - 97.1962)



**B5** = Medio de Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (Exp. Cell. Res. 50: 151 - 158. 1968)

**N6** = Medio de Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., y Chu, C. (Sci. Sinica 18: 659- 668. 1975)

Los elementos indispensables para el normal desarrollo de las plantas "in vitro" son 16, aunque con la demostración de que algunas plantas también requieren níquel serán 17 (Kirkby y Römheld. 2007), ahí están incluidos el carbono, el oxígeno y el hidrógeno, estos junto con el nitrógeno forman parte de los compuestos orgánicos más comunes, como son los carbohidratos, lípidos, proteínas, ácidos nucleicos, metabolitos secundarios, etc. Los macro nutrientes son los elementos químicos que se encuentran en concentraciones mayores a  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  en el medio de cultivo, ordenados por los niveles encontrados en los tejidos de la planta son: Nitrógeno, potasio, calcio, magnesio, fósforo y azufre. Mientras que los micronutrientes en el mismo orden son Cloro, boro, hierro, Manganeso, zinc, cobre, molibdeno y níquel. Las funciones más importantes de los micronutrientes se relacionan en la tabla 2-3 (Epstein y Bloom, 2004). Los macronutrientes y los micronutrientes son suministrados por las sales, que en agua liberan los iones respectivos tales como nitratos, fosfatos, cloruros, sulfatos, amonio, etc.

Tabla 2-3. Funciones principales de los micronutrientes (Epstein y Bloom, 2004)

Micronutrientes	Función
Fe, Mn, Cu, Ni	Constituyente de enzimas(metaloproteínas)
Mn, Zn	Activación de enzimas
Fe, Cu, Mn, (Cl)	Involucrados en el transporte de electrones en la fotosíntesis
Mn, Zn, Mo	Involucrados en la tolerancia al estrés
Cu, Mn, Zn, B	Involucrados en el crecimiento reproductivo (inducción a la floración, polinización, establecimiento de fruto)
B, Zn	Constituyente de paredes y membrana celulares

La vitamina más utilizada en el cultivo de tejidos es la tiamina o vitamina B1, ya que hace parte de la coenzima tiamina pirofosfato, la que en el ciclo de Krebs ayuda a convertir el ácido pirúvico en acetil CoA (Perea y Tirado, 2011). Igualmente el aminoácido más utilizado es la glicina, pero algunas veces se agrega también L-tirosina, asparagina y cisteína, en bajas proporciones ya que pueden inhibir el crecimiento. La fuente de carbono más utilizada es la sacarosa pero se pueden usar otros azúcares como la glucosa. En el caso de los medios de cultivo semisólidos se debe usar un agente gelificante, el más utilizado es agar (entre 0,6 y 1%) aunque también puede remplazarse

por “Agargel” (0,40-0,60%), “Transfergel” (2,0-2,60%), “Phytigel” (0,25- 0,40%), agarosa(0,80-0,90%) y “Gelrite” (0,10-0,20%)(Mroginski et al., 2010).

Figura 2-9. Fotografía del calentamiento del medio junto con el agente gelificante



El control de los cultivos de tejidos vegetales se logra mediante las hormonas o reguladores de crecimiento, hay tres grupos de ellos que son bien conocidos: Auxinas, citoquininas y giberelinas (Perea, 2003). Las auxinas son un grupo muy grande de compuestos que se encuentran en forma natural dentro de las plantas, el más sobresaliente de ellos es el ácido indol acético (AIA), que a su vez es el más utilizado en el cultivo de tejidos, otros ejemplos de ellas son: indol-3-acetonitrilo, etilindol-3-acetato, ácido indol-3-propiónico, etc. Pero en el laboratorio se utilizan auxinas que han sido sintetizadas artificialmente como ácido 2,4-diclorofenoxy acético (2,4D), ácido naftalen acético (ANA) y ácido indol butírico (AIB) (Krikorian, 1993 en Mroginski y Roca, 1993). Promueven el alargamiento y división celular, el crecimiento de secciones (de hojas, tallos y frutos), formación de raíces adventicias, dominancia apical, acción herbicida y la estimulación de la producción de etileno (Rivero, 2011).

Las citoquininas promueven la división celular y el desarrollo de órganos; pero detienen el proceso de senescencia e inhiben el crecimiento de raíces y la elongación de los tallos (Perea, 2003). También están involucradas en la formación de clorofila y el desarrollo de cloroplastos (Rivero, 2011). Las más utilizadas en el laboratorio son: Kinetina ( $N^6$ -

furfuriladenina) (KIN), N<sup>6</sup>-benciladenina (BA), thiadiazuron phenyl-3 (1,2,3 thidiazol-5 H) urea ((TDZ) y la N<sup>6</sup>(2-isopentil) adenina (2-iP) (Perea y Tirado, 2011).

Las giberelinas son un grupo de compuestos derivados del ácido giberélico (AG3), descubierto en el hongo *Giberella fujikuroi*, estimulan la elongación de los tallos y la germinación de algunas semillas, el desarrollo de yemas en latencia (Caro et al., 2004). Son termolábiles y deben esterilizarse por filtración (Krikorian, 1993 en Mroginski y Roca, 1993). Además de los anteriores reguladores de crecimiento también se usan Poliaminas, etileno y ácido abscísico.

A los medios básicos también es frecuente adicionarles otros compuestos, que cumplen funciones como por ejemplo antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona); también se adicionan ciertos componentes de composición química no bien definida como el agua de coco (5 a 15%), jugo de tomate y puré de banana (Mroginsky et al., 2010).

El procedimiento para preparar el medio de cultivo incluye la preparación de soluciones stock de cada uno de los componentes, o soluciones stock de macroelementos, de microelementos y de vitaminas y aminoácidos. Normalmente los stocks de las sales se preparan con una concentración de 50 veces o más veces la concentración final del medio; luego para un litro de medio de cultivo se divide 1000, entre el número de veces el aumento de la solución concentrada y así dará el volumen en mililitros que se deben tomar del stock. Se mezclan los volúmenes de stock, se les adiciona el azúcar (2-3%), los reguladores de crecimiento y sustancias adicionales, se afora al volumen de preparación y se ajusta el pH con soluciones de HCl o NaOH 0,1M. Luego se adiciona el agente gelificante (por ejemplo agar 0,6-1%), se calienta con agitación constante hasta ebullición y es servido inmediatamente en frascos o tubos, que son cubiertos con papel aluminio; los frascos conteniendo el medio son esterilizados en autoclave a 15 Psi (120°C) durante 15 minutos, luego se dejan enfriar y se guardan en un refrigerador. Así están listos para el proceso de inoculación o siembra.

Cabe anotar el cuidado que debe tenerse al preparar la solución que contiene el ion ferroso, que debe prepararse junto con el EDTA, para evitar que se transforme en ion férrico, forma en la cual no lo asimila la planta; hay que pesar las cantidades respectivas y disolver en agua, cuyo volumen sea un poco más de la mitad del volumen final, llevar a ebullición y dejar desarrollar color; cuando haya enfriado se afora al volumen que se está preparando. El stock debe ser guardado en la oscuridad o frascos oscuros. Igualmente recordar que los componentes termolábiles deben ser purificados por filtración, con materiales estériles dentro de la cámara de flujo laminar. El agua para la preparación del medio de cultivo debe ser doblemente destilada o destilada y esterilizada (Abdelnour y Escalant, 1994).

### 3. Siembra o inoculación

Los explantes lavados y desinfectados se deben colocar en una caja de Petri con un papel absorbente para retirar el exceso de humedad. La siembra se realiza utilizando pinzas y bisturí cuando es necesario, estos implementos son colocados dentro de un frasco con alcohol, se escurren bien y se flamean antes de entrar en contacto con el explante; se hacen los últimos cortes o arreglos del material vegetal, se toma el frasco con el medio estéril se flamea en la parte externa cerca de la boca, se destapa y se coloca el explante dentro usando las pinzas, se flamea nuevamente el borde y se tapa en el menor tiempo posible. Los explantes deben ser colocados sobre el medio (semisólido) con la polaridad natural que traían en la planta de donde fueron tomados. Por último se marcan y se llevan al área de incubación y posteriormente al de crecimiento (Caro et al., 2004).

Figura 2-10. Fotografía de la inoculación del explante en el medio de cultivo



#### 4. Enraizamiento y aclimatación

Debido al minucioso control y cuidados que se deben tener en cuenta en estas etapas, un buen número de laboratorios que se dedican a producir plantas “in vitro” no las realizan, se deja para que otra empresa se especialice en ello, esto sumado a los costos de este proceso pues se estima que pueden oscilar entre el 15-75% del costo total de la micropropagación (López, 2004) y al alto número de pérdidas durante la aclimatación (Estopà, 2005). Durante el desarrollo de los brotes o plántulas “in vitro” no se forman raíces o aquellas que se forman no son funcionales “ex vitro”, por lo que es necesario

---

llevar a cabo el proceso de enraizamiento, este se puede realizar tanto *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso se utilizan sustratos solidificados con agar y con la solución de nutrientes disminuida a la  $\frac{1}{2}$  o  $\frac{1}{4}$  de la concentración normal y el azúcar en 1-2%. También se puede usar perlita o vermiculita humedecidas con la solución nutritiva, aquí hay riesgo de que se forme callo en la base de los vástagos y en muchos casos las raíces formadas son engrosadas y no poseen pelos radiculares. Para evitar esto se pueden colocar los vástagos en soluciones con alta concentración de auxinas, especialmente IBA, luego se transfieren a medio basal sin reguladores de crecimiento para permitir la formación de raíces. En el segundo caso el enraizamiento simultáneamente con la aclimatación se hace con sustratos obtenidos con mezclas de tierra o arena u otros materiales debidamente desinfectados, pero aquí se debe hacer en un invernadero o cámara de crecimiento, adecuados para evitar la infección por patógenos y la desecación por la elevada transpiración (Mroginski et al., 2010).

El proceso de aclimatación es un proceso igualmente estresante para la planta como en la iniciación del cultivo *in vitro*, ya que en este estado heterótrofo o semiautótrofo genera anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas, que es necesario corregir durante esta transición para que pueda ser transferida al medio externo. Lo anterior hace que el control sobre los parámetros ambientales como humedad, temperatura y luz, sea indispensable. La razón es que las plántulas obtenidas "*in vitro*" no tienen aun desarrollada su cutícula y su aparato estomático tiene poca funcionalidad, lo que lleva a un alto grado de transpiración y muerte por deshidratación. Por ello es necesario un equipamiento de aclimatación muy sofisticado, que pueden ser túneles de polietileno equipados con sistemas de humidificación, climatización automatizada y mallas de sombreado si la luz es natural. Igual cuidado se debe tener con los sustratos que pueden ser arena, perlita, turba, vermiculita, o mezclas de ellos y que deben ser esterilizados previamente. El suministro de fertilizantes ricos en fósforo y potasio ya sea en el sustrato o en el riego favorece el desarrollo de las raíces y la rusticación de las plantas. También si es necesario se debe prever el uso de antibióticos, fungicidas e insecticidas para el control fitosanitario (Mroginski et al., 2010).





## **25. Enseñanza de la biotecnología vegetal en la educación media**

### **1. Porque enseñar biotecnología**

Lo anterior plantea nuevos retos a los docentes de la educación básica y media en cuanto a su formación, su desempeño profesional y a los resultados esperados por la Sociedad y el Estado. La biotecnología como una actividad de aplicación e investigación de las ciencias naturales y matemáticas, es una buena excusa para enfrentar estos nuevos proyectos en cuanto a organización y metodologías de trabajo que motiven a los estudiantes a interesarse por ellas conociendo sus aplicaciones y desarrollos actuales que influyen directamente en la opinión y calidad de vida de todas las personas. Una de esas estrategias es el trabajo en equipo e interdisciplinario.

La enseñanza de la biotecnología en la educación media no es muy común ni formal en los currículos actuales de la educación media, sin embargo hay experiencias pioneras en ello (Melo et al., 2001), en la mayoría de los casos en los cuales se ha trabajado se ha realizado como una estrategia pedagógica para mejorar la enseñanza de las ciencias naturales (Valbuena, 1998), insertando temáticas específicas en estos cursos y en diferentes grados de la educación básica y media (Reick et al., 1996; Quintanilla et al., 2010). Estas aplicaciones se han efectuado teniendo en cuenta los avances que ha tenido la biotecnología actual, lo llamativa y necesaria que es la información para la opinión pública y para los ciudadanos en general; pues cada día son mayores los productos que se ofrecen en el mercado y cada día son mayores las controversias y opiniones que se generan especialmente en lo relacionado con la salud y el impacto ambiental.

Actualmente la pedagogía da una gran valoración a la formación integral de los niños y jóvenes, en contraposición a modelos que formen o eduquen fragmentariamente, esto es donde el conocimiento sea dividido por partes y dosificado a los estudiantes, sin que en muchos casos haya conexión de esas partes, lo que no da significación y trascendencia para la vida futura del joven como ciudadano. Las ciencias naturales no son la excepción ya que normalmente en la educación básica y media hay una fuerte división a la hora de enseñarlas especialmente en biología, física y química. Esta tendencia está relacionada con la propia historia de la ciencia especialmente desde el renacimiento, pues fue allí donde nació la ciencia moderna subdividiéndose luego en las ciencias que conocemos actualmente, sin embargo en su evolución estas ciencias se han ido entrelazando unas con otras debido a la confluencia de las mismas en la solución de muchos problemas modernos, de ahí que hoy se hable de bioquímica, fisicoquímica, etc., pero esto aún no ha llegado a las instituciones de educación básica y media.

La biotecnología es un campo de las ciencias aplicadas, en el que se presentan muchos problemas a solucionar, pero que dependen básicamente de conocimientos en biología, química, bioquímica y física, sin embargo además de ellas hay cuestiones que resolver cuando los productos biotecnológicos son llevados al consumo, especialmente desde el



punto de vista ético y social; ello quiere decir que también atañe a las ciencias sociales. De tal forma que las propuestas existentes en cuanto a la enseñanza en la educación básica y media, parten del uso de la biotecnología como un factor integrador en la enseñanza de las ciencias naturales y su interrelación con otros campos del conocimiento. Igualmente soporta el enfoque de la relación entre los conocimientos científicos, los avances tecnológicos y el desarrollo social (ciencia, tecnología y sociedad; CTS) (Bernal et al. 2003).

El gran auge de la biotecnología se ha dado gracias al cúmulo de conocimientos que se han generado a partir de la dilucidación de la estructura del ADN a mediados del siglo pasado y el posterior desarrollo de la ingeniería genética y sumado a ello igualmente el veloz desarrollo de la tecnología de la computación y la informática. Las tecnologías que involucran a los animales y los medicamentos o terapias para el mejoramiento de la salud humana (biotecnología animal) fueron las que más polémica generaron hacia finales del siglo XX, sin embargo la biotecnología vegetal tampoco ha sido ajena a ello ya que sus avances y aplicaciones tienen que ver con el gran aumento de la agroindustria especialmente en los países desarrollados y en países llamados emergentes (Brasil y Argentina en Latinoamérica por ejemplo). Hoy en día circulan y se comercializan gran cantidad de productos de origen vegetal que han sido obtenidos a partir de plantas transformadas genéticamente (plantas transgénicas) (Pedroza, 2008). Colombia no es ajena a la discusión ni al comercio en este campo debido a su gran potencial en biodiversidad, sin embargo la información al grueso de la población no es la mejor, solamente las personas con mayores niveles educativos son las que tienen estos conocimientos y las temáticas se quedan entonces en los círculos académicos e investigativos (Memorias, 2001).

Muchos de esos productos de origen vegetal se utilizan especialmente para alimentación animal, pero ya se encuentra un buen número que son utilizados en alimentos procesados o directamente para la población humana, otros se están trabajando para la producción de biocombustibles (Carioca et al., 2009). Ello genera una serie de reflexiones y críticas de parte de sectores de la comunidad, especialmente en lo que atañe al impacto ambiental, a lo que el público en general cada vez tiende a involucrarse más debido a las decisiones de tipo político y económico que los gobiernos deben tomar, así que se requiere que la información que maneja el grueso de la población sea lo más cercana a la realidad, para que cada persona tome las decisiones apropiadas y participe activamente en el tema, pues ellas afectan a toda la humanidad. Un ejemplo de lo anterior es el uso de los alimentos transgénicos, muchos de ellos son derivados o provienen de plantas transgénicas. En los Estados Unidos se podría decir que los alimentos procesados contienen por lo menos algún componente vegetal que fue diseñado genéticamente (Colwell, 2002).

Por otro lado las tecnologías anteriormente mencionadas y el desarrollo de la actual agricultura, tienen un fuerte asidero en el desarrollo y dominio de las técnicas de cultivo de tejidos vegetales "in vitro", desarrolladas en la segunda mitad del siglo XX. Con estas

técnicas dependiendo de los objetivos se pueden obtener agregados de células vegetales indiferenciadas llamadas *callos* o estructuras como tallos, órganos, raíces, bulbos u otros. Con estas metodologías se puede mejorar la agricultura tradicional suministrando plántulas libres de patógenos, desarrollando variedades mejoradas de plantas, manteniendo reservas o bancos de germoplasma, etc. En Colombia las técnicas de cultivo “in vitro” son aplicadas en la investigación y producción de material para cultivos de importancia económica tales como flores (Angarita et al. 1999), frutales, caña de azúcar, yuca, banano y plátano (Perea, 2003) entre otros.

## 2. Algunas propuestas existentes

En general preocupa a las naciones el gran avance de las nuevas tecnologías entre ellas la biotecnología, que tiene un alto grado de prevención y genera controversia entre las personas por los riesgos que potencialmente podrían tener, pero que sin embargo se valoran los beneficios que ofrece. Es así como por ejemplo en Europa hay una iniciativa para introducirla en la educación secundaria, llamada “European Initiative for biotechnology (Education” Braun y Moses, 2004). En Australia hace parte de materias electivas que son evaluadas en las pruebas estatales; en un estudio realizado allí para ver las dificultades en la enseñanza de la biotecnología, se encontró que existían dificultades como la falta de experiencia y especialización de los maestros y lo difícil de las temáticas para los estudiantes (Steele y Aubusson, 2004).

En otros países igualmente existen propuestas para la enseñanza de la biotecnología, utilizando varios tópicos para ello, pero especialmente los que tienen que ver con la biología molecular y la ingeniería genética. Entre ellos tenemos un modelo propuesto por Rengifo et al. (2009) para enseñar el cultivo de la lombriz roja californiana (*Eisenia foetida*), mediante una analogía con una fábrica de harina, se busca que los niños de cuarto año de bachillerato, aprendan los procesos que ocurren en este organismo. Altiparmak y Yazici (2010) en Turquía, desarrollaron una investigación con niños del mismo nivel, donde buscaban comparar una metodología activa denominada “aprendizaje colaborativo”, con la enseñanza tradicional para aprender biotecnología en tópicos como estructura y función del ADN, mecanismos de replicación, dogma central, síntesis de proteínas, etc. La experiencia era trabajar en el diseño de modelos moleculares para entender estos conceptos, utilizando para ello materiales de bajo costo y reciclados.

Como lo señala Roa (2010), en Colombia no hay políticas claras acerca de como introducir la biotecnología en el currículo de educación básica y media. Sin embargo existen algunas propuestas de trabajo para llevar estos conocimientos y algunas prácticas a los niños y jóvenes dentro de su formación en estos niveles (Valbuena, 1998; García y Roa, 2009). Proyectos en curso de implementación como área o signatura en los currículos se puede decir que ninguno, lo que hay son tópicos o temáticas incluidas en los programas de ciencias naturales. Estas iniciativas como las desarrolladas en el Instituto Pedagógico Nacional, de la Universidad Pedagógica Nacional, que entre otras temáticas ha trabajado el cultivo de tejidos vegetales “in vitro” mediante la metodología

de proyectos, nacen de centros de interés donde se inscriben los estudiantes de grados 10° y 11° (Melo et al., 2001). En la Universidad Nacional de Colombia dentro del Instituto de Biotecnología (IBUN), existe un grupo de investigadores que dentro de sus objetivos buscan adaptar e implementar un modelo pedagógico, que incorpore elementos de biotecnología en los currículos de ciencias naturales de las instituciones educativas de educación básica, media y superior. Dentro de estos elementos también se incluyen el cultivo de tejidos vegetales "in vitro". El modelo propuesto aquí tiene bases en el constructivismo y en el aprendizaje significativo Bio-educación (2007).

### **3. Modelo para enseñar biotecnología vegetal**

Por ser una aplicación de las Ciencias, la enseñanza de la biotecnología debe tener en cuenta la epistemología de la Ciencia, esto es la imagen de la misma y el trabajo científico, los procesos de aprendizaje y la naturaleza de las actividades de enseñanza. Debido a la percepción muchas veces polémica de la biotecnología, se deben tener en cuenta las consideraciones señaladas por Cordón (2008) (con base en Gil, 1986; Hodson, 1986 y otros), para enseñar la imagen de la ciencia y del trabajo científico, ellas son:

26. Los profesores deberían presentar las teorías como procesos creativos; mientras que los científicos además perciben la realidad circunstancialmente de acuerdo con su compromiso teórico.
27. Las observaciones pueden fallar, pues dependen de las teorías y estas no son necesariamente producto de procesos inductivos de observación
28. No hay un solo método para el estudio de la ciencia y los que se utilizan evolucionan con ella.
29. El conocimiento científico no expresa la realidad absoluta, se va construyendo poco a poco buscando acercarse a ella.
30. El trabajo y la producción científica no es neutral; se acomoda a los contextos culturales, sociales y económicos donde se desarrolla.

De la misma forma las teorías de enseñanza aprendizaje de las ciencias que deberían ser tenidas en cuenta para la enseñanza aprendizaje de la biotecnología según Cordón (2008) están resumidas en dos grupos:

En el primer grupo están el conductismo y la enseñanza por transmisión/recepción; que es la que utilizan la mayoría de los maestros en la enseñanza de las Ciencias, es decir la que podría denominarse también enseñanza tradicional. En ella el conocimiento es una copia exacta de la realidad, luego el trabajo del científico es extraerlo a través de la observación de la naturaleza.

El segundo grupo lo constituyen las teorías cognitivas, que tienen en cuenta los contenidos procedimentales, los procesos mentales del aprendiz, los ambientes de aprendizaje, la interacción social entre otros factores. Piaget con la psicología evolutiva contribuyó a varias de ellas, por ejemplo el aprendizaje por descubrimiento y el constructivismo. Dentro del constructivismo variaciones como los mediadores instrumentales y las interacciones sociales; y el aprendizaje significativo.

Casi todas las propuestas metodológicas actuales buscan implementar la práctica de las teorías cognitivas, buscando romper la hegemonía de la enseñanza tradicional y hacer más llamativo el estudio de las ciencias para los niños y jóvenes. La biotecnología es una buena oportunidad para ello, ya que podría adaptarse más a las teorías de tipo cognitivo, por su naturaleza de ser una ciencia aplicada de carácter interdisciplinar y está enmarcada dentro de lo que hoy en día se trabaja como el pensamiento complejo.

Se trata de diseñar un modelo para la enseñanza de la biotecnología vegetal, específicamente el cultivo de tejidos vegetales “in vitro”, para jóvenes de los grados 10° y 11° en la IED Manuelita Sáenz, de la localidad cuarta (San Cristóbal) en la ciudad de Bogotá. La educación media en esta institución tiene un convenio con el Centro de Biotecnología Agropecuaria de Mosquera, del Servicio Nacional de aprendizaje (SENA) para formar jóvenes en media técnica, de tal manera que obtengan el título “*Técnico en producción biotecnológica de material vegetal*”. Esto dentro de un gran proyecto de articulación de la educación media con la educación superior de la Secretaría de educación. Para ello la formación se lleva a cabo en las instalaciones del colegio con docentes del mismo y asesorados con instructores del SENA.

Por lo anterior, es necesario implementar una forma de trabajo diferente a la clase tradicional en el aula, ya que aquí además de los fundamentos teóricos pertinentes de las ciencias se debe enseñar contenidos procedimentales, aquellos definidos por Cordón (2008) como “las habilidades, destrezas y estrategias, cognitivas, manipulativas, comunicativas y de investigación, de mayor o menor complejidad, que los alumnos deben utilizar para construir el conocimiento o dar solución a un problema”. Es decir se puede utilizar la metodología de la resolución de problemas o el trabajo por proyectos. Esto es involucrar el aprendizaje cooperativo con un enfoque interdisciplinario, donde los estudiantes sientan motivación por el alcance de metas y logros durante su formación. Igualmente esta forma de enseñanza-aprendizaje es acorde con los objetivos y filosofía de PEI institucional en cuanto a la educación media técnica que incluye la formación para el trabajo, o sea es un acercamiento del estudiante con la realidad del mundo productivo (Cardona, 2002).

El modelo debe buscar cumplir con las características que identifican un proyecto de aprendizaje, como estar centrado en el estudiante, definido en el tiempo, significativo, podría solucionar un problema del mundo real, objetivos acordes con el PEI, con objetivos específicos y pertinente en la formación de competencias laborales entre otras (Railsback, 2002). La evaluación es continua y sumativa con la presentación del producto final.

En el modelo propuesto los estudiantes han seleccionado la especialidad técnica voluntariamente, por lo que se presupone hace parte de sus intereses lo que facilita el trabajo por proyectos. Consiste en desarrollar cuatro competencias laborales específicas y básicas dentro del cultivo de tejidos vegetales “in vitro”. La primera se denomina “*Alistar material vegetal para propagación de vitro-plantas de acuerdo con los planes y protocolos establecidos*”, que tiene como objetivo primordial obtener plantas sanas de manera tradicional en la huerta, de las especies vegetales que se pretenden trabajar en los proyectos. La segunda se denomina “*Preparar medios de cultivo para propagación in vitro teniendo en cuenta los procedimientos técnicos*”, en la cual se deben utilizar los conocimientos y procedimientos físicoquímicos pertinentes, para preparar medios de cultivo de acuerdo a las necesidades del laboratorio y del proyecto. La tercera se denomina “*Sembrar el material vegetal in vitro de acuerdo con protocolos planteados*”, aquí el estudiante hace las inoculaciones del explante vegetal en el medio de cultivo teniendo en cuenta las condiciones de asepsia necesarias. La cuarta competencia es, “*Propagar plantas endurecidas teniendo en cuenta las condiciones requeridas para el proceso productivo y las recomendaciones técnicas*”, en la que se lleva a cabo la adaptación de las plántulas obtenidas “in vitro” al ambiente de invernadero.

Sin embargo no puede ser un problema de planteamiento abierto, ya que debe corresponder a las competencias mencionadas, por lo que se podría denominar *trabajo por proyectos dirigidos*. El modelo propuesto consiste de algunas etapas visibles dentro del proceso actual de trabajo en la IED Manuelita Sáenz y serían las siguientes: Sensibilización, Planeación colectiva, Planeación grupal, Desarrollo teórico práctico y evaluación.

*La Sensibilización:* Es el proceso inicial de motivación de los estudiantes, donde ellos deben sentir la necesidad de participar activamente proponiendo y escuchando propuestas, buscando consenso y pares con ideas similares. Aquí se hace la contextualización de la competencia dentro del cultivo de tejidos vegetales, las áreas involucradas en ella, los conceptos y conocimientos teóricos necesarios, las técnicas y posibles prácticas a trabajar y la forma de evaluar y los objetivos previstos. La manera de llevar a cabo esta etapa puede ser mediante mesas redondas, análisis de videos donde se muestren tópicos y conceptos a trabajar, experiencias similares en otros lugares, lecturas de documentos motivadores, etc. Las herramientas dependen también de la competencia a desarrollar. El papel del docente es de moderador y motivador para darle la suficiente confianza y seguridad al estudiante, sugerir páginas de consulta en internet, suministrar los documentos, guías, u otros materiales pertinentes para las sesiones.

*La Planeación colectiva:* Es la etapa en la cual se organiza el trabajo de todo el curso para el desarrollo de la competencia, luego debe producir un documento escrito que será compartido por todos los integrantes. En el mismo debe quedar planteado el problema colectivo que se pretende solucionar, los objetivos comunes acordados para todos, la organización de los subgrupos que serían los mismos que desarrollen el proyecto

productivo, los conceptos teóricos fundamentales, las posibles fuentes de información, un cronograma de acuerdo al tiempo previsto, los recursos disponibles, las prácticas o sesiones de laboratorio necesarias, el impacto ambiental y la forma de evaluación. Para el desarrollo de esta etapa podrían utilizar herramientas tales como lluvia de ideas, propuestas escritas individuales y de los subgrupos, observación y estudio de los recursos existentes, observación de las áreas de trabajo, análisis de proyectos similares, etc.; las actividades planteadas en lo posible se desarrollan en subgrupos con rotación de sus integrantes. En esta etapa el docente debe dirigir el diseño y planeación del proyecto explicando a los estudiantes claramente que es lo que se busca o pretende con el desarrollo del proyecto, es decir en que consiste la competencia. El proyecto productivo es un proyecto que los estudiantes deben desarrollar paralelamente durante el trabajo de las cuatro competencias planteadas (dos años), el cual deben sustentar al final y en el cual debe mostrarse un producto obtenido mediante las técnicas del cultivo de tejidos vegetales "in vitro", incluye también estudio de mercado, costos y comercialización.

*La Planeación grupal:* Es el espacio y el tiempo durante el cual los subgrupos diseñan y planean un subproyecto de acuerdo a la competencia que se está trabajando y que hace parte de su proyecto productivo. Se debe empezar con la organización libre de los subgrupos de trabajo, la planeación del subproyecto también debe llevar los puntos enumerados en la etapa anterior. En esta etapa la información es muy importante, ya que cada proyecto productivo debe estar planteado para una especie vegetal diferente por cada subgrupo, por lo que el docente debe ser un asesor y facilitar toda la información que pueda suministrar o sugerir la búsqueda y donde podría encontrarse.

*El desarrollo teórico práctico:* Es la etapa de ejecución del proyecto grupal y el de los subgrupos, en ella hay sesiones conjuntas de salón, de huerta, de invernadero o de laboratorio, o sesiones dedicadas a los subgrupos para que puedan trabajar en el desarrollo de sus subproyectos pero siempre supervisados por el docente. Las herramientas necesarias para llevar a cabo esta etapa son lectura y análisis de la información especializada, presentaciones o sustentaciones apoyadas por las TICs, seminarios especialmente para el desarrollo de conceptos básicos y pertinentes, asesorías grupales y colectivas para el diseño del trabajo de laboratorio y de campo, diseño de experimentos y prácticas de laboratorio, organización de cuadernos de campo o portafolios de evidencias. En esta etapa se da el trabajo "duro" del proyecto donde el docente debe tener una actitud de diálogo y asesoría permanente de los estudiantes, tanto grupal como individualmente, ya que las dificultades no son iguales para todos, especialmente en el laboratorio donde siempre debe estar presente, garantizando la seguridad y las buenas prácticas de laboratorio; por supuesto los estudiantes deben dedicar tiempo para la búsqueda, análisis y presentación de la información pertinente para los proyectos.

*La evaluación:* es el proceso que se da continuamente durante el desarrollo de todo el proyecto y al finalizar el mismo, sin embargo debe ser muy clara desde el principio tanto para los estudiantes como para el docente, se deben definir momentos de reflexión y

análisis de los procesos desarrollados. En esta propuesta se plantea el uso de portafolio de evidencias y cuaderno de campo. El portafolio de evidencias está conformado por los documentos o actividades puntuales que serán revisadas o calificadas, mientras que el cuaderno de campo es donde el estudiante, lleva anotadas sus observaciones, datos de laboratorio, cálculos, procedimientos, etc., del trabajo colectivo y del proyecto productivo. Además de la heteroevaluación se deben hacer sesiones de coevaluación y autoevaluación, para evaluar el desempeño colectivo y los aportes que cada integrante del curso ha hecho. Igualmente dentro de la evaluación se debe observar el desempeño en la práctica y los productos obtenidos.

## 31. Conclusiones y recomendaciones

### 1. Conclusiones

La biotecnología vegetal y dentro de ella el cultivo de tejidos vegetales “in vitro” es un conjunto de técnicas y procedimientos de laboratorio, para la propagación asexual de las plantas, que puede ser utilizado en procesos como la micropropagación para producir miles y miles de plantas genéticamente similares (clonadas), o por la ingeniería genética que puede diseñar y obtener plantas con características deseables mediante genes foráneos que han sido insertados en su ADN desde otras especies incluidos los animales y el hombre. Una gran ventaja de esta tecnología es su implementación en laboratorios, fuera de los campos de cultivo expuestos al ambiente, lo que permite el control de las condiciones ambientales de tal manera que el material vegetal obtenido es uniforme.

El número de habitantes del planeta demanda tal cantidad de alimentos que los sistemas de producción agrícola actuales no podrán abastecer en pocas décadas a toda la población, si el ritmo de crecimiento continúa como el actual. Es por ello que la biotecnología vegetal es muy importante, ya que gracias a ella se logra la gran producción actual, sin embargo hay personas que mueren de hambre en la tierra por carecer de alimentos. La biotecnología vegetal ha tenido un crecimiento importante en los últimos cien años y de la mano de ella igualmente lo ha hecho la agricultura. Dentro de las estrategias para poder superar el déficit alimentario que seguirá creciendo, están las tecnologías de la transformación genética, que combinada con los cultivos de tejidos vegetales son las más visibles y prometedoras por el momento. Además la ingeniería genética permitirá obtener muchos más productos que son utilizados por la industria, la salud y el medio ambiente.

Pero así como la biotecnología vegetal nos suministra beneficios también nos puede causar problemas, como el impacto en los ecosistemas o en la salud humana al consumir productos a partir de plantas transgénicas, debido a que no hay suficientes datos concluyentes de los efectos adversos que puedan ocasionar. Estos argumentos junto con el monopolio de esta tecnología por empresas multinacionales muy poderosas, ha causado fuertes debates y división de opiniones de si se debe o no se debe utilizar, lo que ha hecho que su imagen no sea la mejor entre la población. Por lo que los proyectos educativos que incluyan la biotecnología deben incluir estrategias que valoren lo positivo que obtenemos de ella y ser muy críticos con los efectos



---

adversos que pudiese ocasionar; esto significa que también deben incluirse programas de alfabetización en biotecnología.

Sin embargo los cultivos de tejidos vegetales como tal, no tienen las mismas implicaciones de los cultivos de plantas transgénicas, por el contrario ayudan bastante en el mejoramiento de las plantas de importancia económica, aun utilizando las metodologías tradicionales; por lo que estas temáticas y prácticas son muy apropiadas para acercarlas a los procesos de la educación básica y media, ofreciendo también la oportunidad de mostrar el sentido práctico de los conocimientos científicos. Los posibles riesgos para los niños y jóvenes en la enseñanza de estos tópicos tampoco son pocos, luego en cuestiones de bioseguridad en la educación también es viable.

La riqueza en biodiversidad que posee Colombia hace que sea uno de los países con gran potencial de desarrollos biotecnológicos, sin embargo su explotación comercial debe empezar por la conservación de nuestros ecosistemas, donde igualmente la biotecnología puede ser de mucha utilidad. Esto implica que la investigación debe ser más juiciosa y profunda. Los futuros profesionales e investigadores en este campo se podrían estar formando con más conciencia de nuestros recursos desde la educación básica y media. En este aspecto se puede afirmar que tampoco hay muchos proyectos para introducir la enseñanza de la biotecnología en la educación en esos niveles; algunos tópicos son incluidos en los programas de Ciencias Naturales, esto es en el nivel de educación básica secundaria.

El cultivo de tejidos vegetales “in vitro” ofrece un alto potencial pedagógico para su enseñanza en la educación media, ya que involucra conocimientos de diferentes áreas, procedimientos de laboratorio y de campo, que motivan a los estudiantes por su sentido práctico, y el carácter activo en su aprendizaje. Estas cualidades fueron aprovechadas para apoyarse en las teorías de enseñanza aprendizaje de tipo cognitivo, como el constructivismo y una de sus variaciones, el aprendizaje significativo, para proponer un modelo de enseñanza de la biotecnología vegetal para la educación media de la IED Manuelita Sáenz, y que facilitará el diseño y construcción de herramientas didácticas apropiadas que favorezcan la profundización de conocimiento científico y la formación del pensamiento complejo.

---

Un modelo de enseñanza de la biotecnología vegetal fue propuesto con base en el **trabajo por proyectos**, debido a que fomenta la participación activa del estudiante, al contrario de la clase tradicional de Ciencias; la supervisión del docente es indispensable en casi la totalidad del proceso, a pesar de que los riesgos que se manejan no son mínimos, pero si controlables y en especial en grupos cuyo interés es la biotecnología, como es el caso que aquí se propone, por lo que podría llamarse **trabajo por proyectos dirigidos**. Por esto el modelo tampoco es de proyecto absolutamente abierto, ya que se debe garantizar la formación en unas competencias previamente establecidas, manera dinámica y participativa.

El modelo propuesto para la enseñanza de la biotecnología vegetal en la educación media, facilitará la adquisición de conocimientos científicos de vanguardia y la formación de competencias laborales y de cultura para el trabajo, acercando los estudiantes a los problemas del mundo real y preparándolos para su desempeño en la educación superior, o en el campo laboral como alternativa ocupacional para jóvenes bachilleres que no tienen la posibilidad de ingresar inmediatamente a la universidad, sin que esto implique que no lo puedan hacer o que el modelo los esté preparando solamente como mano de obra calificada.

Para garantizar la efectividad del modelo en la enseñanza de la biotecnología vegetal el docente debe involucrarse de tal manera que su comprensión de los conceptos y procedimientos sea lo más clara posible, para poder explicar y llegar a los estudiantes con un lenguaje sencillo y sin sofisticaciones, es decir sin terminologías confusas para los jóvenes, para evitar que ellos se alejen o les causen aversión las temáticas trabajadas. Esto implica que en la metodología por proyectos el docente debe manejar mucha información especializada, que debe sintetizar y presentar a sus alumnos con un lenguaje adecuado para el grupo de trabajo, pero sin perder el rigor científico y tecnológico.

Se observa también que la biotecnología vegetal y específicamente el cultivo de tejidos vegetales "in vitro", puede ser implementado en las instituciones educativas de los niveles de básica y media apoyadas con la dotación de laboratorios con los equipos y materiales básicos, junto con la capacitación o formación de docentes a nivel de especialización o maestría. Sin embargo, esto depende de políticas y planes de desarrollo del sector educativo fomentadas por las instituciones gubernamentales.

## 2. Recomendaciones

La investigación para la enseñanza de la biotecnología vegetal en la educación básica y media es muy escasa, por lo que los profesores de Ciencias deberían evaluar la posibilidad de realizar investigación en el aula, para tener un banco de experiencias pedagógicas, que irán solucionando esta dificultad.

Las políticas educativas pueden involucrar estas temáticas para que sean incluidas formalmente dentro de los currículos escolares, junto con la capacitación de los docentes y la dotación básica de los laboratorios especializados. Para ello deben apoyarse en instituciones educativas donde ya se estén trabajando este tipo de proyectos como la IED Manuelita Sáenz, de la localidad de San Cristóbal de Bogotá y asesorarse de las instituciones de Educación superior, como la Universidad Nacional de Colombia y el SENA.

Desde las instituciones de educación superior se deberían producir documentos o textos especializados en biotecnología vegetal, dirigido a los estudiantes de la educación básica y media, lo que garantizaría la calidad y seriedad de la información y la facilidad de implementación por parte de los profesores de Ciencias Naturales de los colegios.

## Bibliografía

1. Abdelnour A. y Escalant J. *Conceptos básicos del cultivo de tejidos vegetales*. Centro agronómico tropical de investigación y enseñanza CATIE, Costa Rica, 1994
2. Álvarez, Martha. *Multiplicación de Plantas*. 1ª edición, Editorial Albatros SACI, Buenos Aires, Argentina, 2011
3. Angarita, A. et al. *Micropropagation of gerberas from floral buds*. Proceedings of the International Symposium on Cut Flowers in the Tropics. Bogotá, Colombia. 1997. Publicado en Acta Horticulturae No. 482. Leuven, Belgium. 1999
4. Arditti J. *Factors affecting the germination of orchid seeds*. Bot Rev 33:1–97(1967)
5. Arditti Joseph and Wing Yam Tim. *History of orchid propagation: a mirror of the history of biotechnology*. Plant Biotechnol Rep (2009) 3:1–56
6. Barba A., Luna B. y Romero J. *Micropropagación de plantas*. Editorial Trillas, México. 2001
7. Bernal G. Yahayra et al. *Bioética y Biotecnología en la perspectivaCTS*. Colección Bíos y Ethos, Ediciones el Bosque. Universidad El Bosque, Bogotá, 2003.  
[http://www.bioeticaunbosque.edu.co/publicaciones/biosyethos/Bios\\_Ethos\\_22.pdf](http://www.bioeticaunbosque.edu.co/publicaciones/biosyethos/Bios_Ethos_22.pdf). Consultada en Nov., 2011
8. Bridgen Mark P. and Bartok John W., Jr. *Designing a Plant Micropropagation Laboratory*. Originalmente publicado en las Actas de la Convención Internacional de la Sociedad de Propagadores, vol. 37 (1987), pp 462-467.<http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/facilities/microlab.html>. Consultada en diciembre de 2011
9. Calva C. Graciano y Pérez V. Josefina. *Cultivo de células y tejidos vegetales: Fuente de alimentos para el futuro*. Revista Digital Universitaria. Volumen 6 Número 11. noviembre 2005. <http://www.revista.unam.mx/vol.6/num11/art104a/art104a.htm> Consultada en Nov., 2011
10. Cardona, Guillermo. *Tendencias educativas para el siglo XXI educación virtual, online y @learning elementos para la discusión*. Edutec. Revista Electrónica de Tecnología Educativa. Núm. 15./mayo 02
11. Carioca a J.O.B., Hiluy Filho a J.J., Leal b M.R.L.V., Macambira c, F.S. *The hard choice for alternative biofuels to diesel in Brazil*. Biotechnology Advances. Volume 27, Issue 6, November-December 2009, Pages 1043-1050.  
<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975009001037>. Consultada en Nov., 2011
12. Caro Marina et al. *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Instituto de Biotecnología U.N. Grupo Biosec. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2004
13. Castillo Alicia. *Propagación de plantas por cultivo in vitro: una biotecnología que nos acompaña hace mucho tiempo*. MSc Investigadora, Unidad de Biotecnología, INIA Las Brujas [http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad\\_382.pdf](http://www.inia.org.uy/publicaciones/documentos/lb/ad/2004/ad_382.pdf). Consultada en Nov., 2011
14. Cerdá O. Enrique. *“La historia del DAN: Watson y Crick, ¿juego de niños?”* Sociedad Española de Genética. <http://www.segenetica.es/varios.php?request=11> Consultada en Nov. 2011
15. Colwell Rita R. *Fulfilling the promise of biotechnology*. Biotechnology Advances Volume 20, Issues 3-4, November 2002, Pages 215-228. US National Science Foundation, 4201 Wilson Boulevard, Suite 1205, Arlington, VA 22230, USA.

- <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0734975002000113>. Consultada en Nov., 2011
16. Cordón A. Rafael. *Enseñanza y aprendizaje de procedimientos científicos (contenidos procedimentales) en la educación secundaria obligatoria: Análisis de la situación, dificultades y perspectivas*. Universidad de Murcia. España, 2008
  17. Cubero José I. *Historia biotecnología vegetal*. I jornadas Sobre Productos Transgénicos en Agricultura. Departamento de Genética, Universidad de Córdoba España, 2000. En [www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/cubero.htm](http://www.ugr.es/~eianez/Biotecnologia/cubero.htm). Consultada en septiembre de 2011
  18. Díaz Marina et al. *Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal*. En Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Editado por Echenique Viviana et al. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 2010
  19. Enserink Martin. *Golden Rice Humanitarian Board*. Science Vol. 320 25 Abril 2008. Descargado de [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org) en Septiembre 8, 2011
  20. Epstein, B. and A.J. Bloom. *Mineral nutrition of plants: Principles and perspectives*. 2. Ed. Sunderland: Sinauer Associates. 2004
  21. Estopà M. *El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero*. Horticultura internacional, ISSN 1134-4881, Nº Extra 1, España. 2005
  22. Fonseca P. Tatiana. *La biotecnología y sus aplicaciones*. Editorial Voluntad. Bogotá, 2009
  23. Grupo Bio-educación. *La biotecnología: "Un juguete" preferido en la educación, una visión del grupo de investigación en bio-educación*. Revista Colombiana de Biotecnología, año IX, Número 002. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2007
  24. Hopp et al. *"Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING"*. En Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Editado por Echenique Viviana et al. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 2010
  25. <http://agrobio.org.co/fend/index.php?op=YXA9I2JXbDQmaW09I016UT0=>. Consultada en septiembre de 2011
  26. <http://dna50anys.uab.es/dna50anys/watsoncrick.pdf>, Consultada en septiembre de 2011
  27. <http://exa.unne.edu.ar/biologia/fisiologia.vegetal/CultivoTejidos.pdf>. Argentina. Consultada en noviembre de 2011.
  28. <http://webpages.ull.es/users/freal/BTema1.pdf>. Consultada en septiembre de 2011
  29. <http://www.croplife.com/news/?storyid=3522&style=1>. Consultada en septiembre de 2011
  30. [http://www.infoagro.com/agricultura\\_ecologica/transgenicos.htm](http://www.infoagro.com/agricultura_ecologica/transgenicos.htm). Consultada en septiembre de 2011
  31. Instituto de Estudios Ambientales IDEA. *Memorias Seminario "Cultivos Transgénicos: Implicaciones ambientales en Colombia"*. Universidad Nacional de Colombia, Bogotá. 2001
  32. James Clive. *Global status of commercialized biotech/GM crops: 2010*. ISAAA Brief 37. En <http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/default.asp>. Consultada en Nov. de 2011

33. Kirkby, E.A. and V. Römheld. *Micronutrients in plant physiology: functions, uptake and mobility*. Proceedings 543. The International Fertilizer Society, P. O. Box, York, YO32 5YS, United Kingdom, 2007
34. Langridge Peter and Tester Mark. *Breeding Technologies to Increase Crop Production in a Changing World*. Science, vol. 327 February, 2010. Downloaded from [www.sciencemag.org](http://www.sciencemag.org) on September 8, 2011
35. Ligarreto G., Lobo M. y Valencia R. *Estado del arte de los recursos genéticos vegetales en Colombia: Sistema de Bancos de Germoplasma*. Corpoica Cienc. Tecnol. Agropecu. (2010) 11(1), 85-94.
36. López C. *Enraizamiento y aclimatación de plantas obtenidas in vitro*. 2004. En <http://www.encuentros.uma.es/encuentros31/enraizamiento.html>. Consultada en Enero de 2012.
37. Lucas B. y Valle P. *Toxicología de alimentos*. Instituto Nacional de Salud Pública – Centro Nacional de Salud Ambiental. México, D.F. 2000
38. Mannion, A.M. *Agriculture, environment and biotechnology* Agriculture, Ecosystems and Environment. 53. 31-45, 1995
39. Melo, S. Constanza; Mondragón Cesar; Wilches Fabio; Valbuena Edgar; Bolaños Patricia; Celis Luis. *Desarrollo de Proyectos Escolares en Biotecnología. Propuesta de trabajo para la enseñanza aprendizaje de las ciencias naturales en el nivel de educación media*. Memorias XXXVI Congreso Nacional de Ciencias Biológicas. Cartagena Oct del 2001. [http://www.pedagogica.edu.co/storage/rce/articulos/pag185\\_190.pdf](http://www.pedagogica.edu.co/storage/rce/articulos/pag185_190.pdf). Consultada en Nov., 2011
40. Mroginski et al. *Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales*. En Biotecnología y mejoramiento vegetal II. Editado por Echenique Viviana et al. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Argentina, 2010
41. Mroginski L. y Roca W. *Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT. Cali, Colombia, 1993
42. Orozco y Garcés. *Algunas Consideraciones sobre cultivos*. 2007
43. Ortiz. H. Carlos. *“Encontramos el secreto de la vida”. 50 años del descubrimiento de la estructura del ADN*. Departamento de Patología, Centro Médico ABC. México, D.F. Anales médicos, Vol. 48, Núm. 3 Jul. - Sep. 2003 pp. 177 – 188
44. Patiño T. Carlos. *Variación somaclonal y selección in vitro con toxinas como herramienta en la búsqueda de resistencia a enfermedades en plantas: Revisión*. Revista de Investigación Agraria y Ambiental 2010: 7-1
45. Pedroza M. Jaime. *Aplicaciones del Cultivo de Tejidos Vegetales In Vitro*. Centro de Investigaciones y Desarrollo Científico CIDC. Universidad Distrital Francisco José de Caldas. Bogotá, 2008.
46. Pedroza, J. y Bejarano A. *Propagación vegetativa in vitro de Puya santosii*. Revista Colombiana de Biotecnología. Vol. X. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2008.
47. Perea Andrea y Tirado Margarita. *Cultivo de tejidos vegetales in vitro*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2011

48. Perea D. Margarita. *Biotecnología, Bananos y Plátanos*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2003
49. Perea Margarita. *Biotecnología Agrícola*. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, 2001
50. Quintanilla et al. *Unidades Didácticas en Biología y Educación Ambiental. Su contribución a la promoción de competencias de pensamiento científico*. Volumen 4. Impreso en Barrancabermeja – Santander (Colombia), 2010.
51. Railsback Jennifer. *Aprendizaje por proyectos*. Northwest Regional Educational Laboratory, 2002. (<http://www.nwrel.org/request/2002aug/projectbased.php>). Consultado en noviembre de 2011
52. Reed Barbara et al. *Biodiversity conservation and conservation biotechnology tools*. In *Vitro Cell.Dev.Biol.—Plant* (2011) 47:1–4
53. Reick Marla et all. *Evaluation of a Decision Case Approach to Food Biotechnology Education at the Secondary Level*. Department of Food Science and Nutrition, University of Minnesota, St. Paul, Minnesota 55108. *Journal of Nutrition Education*. Volume 28, Issue 1, January 1996, Pages 33-38. <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022318296700134>. Consultado en Nov., 2011
54. Rivero María Mercedes. *Curso Agrobiotecnología*. Departamento de Fisiología, Biología Molecular y Celular Facultad de Ciencias Exactas y Naturales Universidad de Buenos Aires, 2011
55. Roa A. Robinson. *Referentes de la biotecnología para la enseñanza de las Ciencias Naturales*. Biografía: Escritos sobre la Biología y su enseñanza. Vol. 3. 2007
56. Rosenberg Norman J. *A biomass future for the north american great plains*. Published by Springer, P.O. Box 17, 3300 AA Dordrecht, The Netherlands. 2007.
57. Simón M. Esther y Moysset A. Lluïsa. *Prácticas de crecimiento y desarrollo de vegetales*. Universidad de Barcelona. España, 2006
58. Valbuena U. Edgar. *Contribución al Desarrollo de la Biotecnología Desde la Educación en los Niveles de Básica y Media*. Revista de la Facultad de Ciencia y Tecnología (4). Universidad Pedagógica Nacional. Bogotá, 1998
59. Vasil Indra K. *A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops*. *Plant Cell Rep* (2008) 27:1423–1440