

NORMAS DE SEGURIDAD EN EL LABORATORIO

- 1. Seguir estrictamente las indicaciones dadas por el profesor, prestando especial atención a aquellos puntos peligrosos o conflictivos.**
- 2. Seguir las Normas de Seguridad generales indicadas en el manual de Normas Básicas de Seguridad de Laboratorios.**
- 3. Seguir las indicaciones de autoprotección indicadas por el responsable del laboratorio.**
4. No utilizar las campanas de flujo laminar, si la luz ultravioleta de esterilización estuviera encendida.
5. Llevar siempre la bata puesta cuando se esté en el laboratorio.
6. Queda terminantemente prohibido comer, beber o fumar en el laboratorio.
7. Está prohibido probar u oler cualquier producto a usar en el laboratorio, pueden provocar irritaciones y quemaduras.
8. Nunca pipetear con la boca ningún producto, incluido el agua.
9. Si es necesario el uso de guantes, confirmar que no es alérgico al látex.

10. Siempre que se use cualquier producto, se volverá a dejar en su sitio convenientemente cerrado.
11. Mantener el laboratorio limpio y ordenado.
12. Lavarse las manos siempre antes de salir del laboratorio.
13. **Sé responsable.** Estás en un laboratorio con productos que manejados de forma incorrecta pueden ser peligrosos.
14. **Ante cualquier duda consulta con el profesor responsable.**

MATERIAL DE TAQUILLA

| MATERIAL | UNIDADES |
|---|------------|
| GRADILLA DE EPPENDORF | 1 |
| GRADILLA TUBOS 15 ML | 1 |
| TUBO 15 ML ESTÉRIL | 6 |
| CRISTALIZADOR | 1 |
| IMANES GRANDES | 2 |
| IMANES PEQUEÑOS | 4 |
| PINZAS CURVAS | 2 |
| PINZAS GRANDES | 1 |
| PINZAS RECTAS | 2 |
| MANGOS BISTURÍ #4 | 2 |
| CUCHILLAS BISTURÍ | 6 |
| TIJERAS | 1 |
| ESPÁTULA | 1 |
| JERINGUILLA 5 ML | 2 |
| FILTROS NYLON 0,2 μ M | 2 |
| PROPIPETA | 1 |
| PIPETAS PLÁSTICO ESTÉRIL 5mL y 10mL | 5 |
| EMBUDO VIDRIO | 2 |
| CHUPETES | 2 |
| AZULEJO | 2 |
| VASO DE PRECIPITADO 1000ML, 600 ML, 250ML, 100ML | 1, 1, 1, 1 |
| CAJA PUNTAS AZULES | 1 |
| CAJA PUNTAS AMARILLAS | 1 |
| MICROPIPETA P-1000 | 1 |
| MICROPIPETA P-200 | 1 |
| MICROPIPETA P-20 | 1 |

INTRODUCCIÓN

La biotecnología se define como toda aplicación tecnológica que utiliza sistemas biológicos y organismos vivos, o sus derivados, para la creación o modificación de productos o procesos de interés para el hombre. La Biotecnología Vegetal, según la OCDE, sería la «aplicación de la ciencia y la tecnología a las plantas, sus partes, productos y modelos, con el fin de alterar materiales vivos o inertes para el desarrollo de conocimiento, bienes y servicios». Para ello, la biotecnología vegetal se basa en diferentes ciencias como la fisiología vegetal, la genética, la microbiología, la química, las técnicas de cultivo *in vitro*, entre otras.

A principios del siglo xx se acuñó el término «totipotencia» para designar «la capacidad de las células vegetales de regenerar plantas enteras a partir de una o muy pocas células en cultivo *in vitro*» (Azcon-Bieto y Talón, 2008). Tanto las plantas enteras como partes de ellas (explantes) se pueden cultivar *in vitro* en condiciones estériles y en medios con los nutrientes y los balances de reguladores del crecimiento vegetal adecuados. El cultivo *in vitro* de células y tejidos vegetales es una herramienta fundamental de la biotecnología vegetal. Los medios de cultivo pueden ser líquidos o sólidos (con agar) e incluyen nutrientes minerales, fuente de carbono, vitaminas y reguladores del crecimiento vegetal (RCV) (Azcon-Bieto y Talón, 2008).

Un explante en un medio con un balance adecuado de RCV (normalmente se requieren auxinas) sufre ciertos cambios morfológicos y metabólicos que le llevan a alcanzar su estado meristemático (indiferenciado) mediante el proceso que se conoce como dediferenciación formando una masa de células indiferenciadas que se denomina callo.

Por otro lado, la rediferenciación de estas células indiferenciadas también se puede conseguir con el balance adecuado de RCV, lo cual hace posible regenerar plantas completas a partir de células en cultivo *in vitro*, normalmente se obtiene por organogénesis o embriogénesis somática. En el caso de la organogénesis, se induce la formación de tallos (balance auxinas/citoquininas bajo) y a continuación la formación de raíces (balance auxinas/citoquininas alto). En la embriogénesis somática, la formación de un embrión a partir de células somáticas permite la obtención de la planta completa simplemente dejando que el embrión somático obtenido siga su proceso de desarrollo que le llevará a dar la plántula.

La biotecnología vegetal abarca los procesos que implican el empleo de las plantas (enteras o en cultivo *in vitro*) como biofactorías para obtener moléculas de interés (propias de la planta o de otros organismos) así como todas las modificaciones génicas o metabólicas para conseguir mejoras de las plantas relacionadas con la adaptación al medio (estrés biótico y abiótico), calidad nutricional y productividad entre otros. Estos procesos pueden conseguirse a partir de distintas aproximaciones entre las que se pueden citar por ejemplo la transgénesis, inactivación de genes, elicitación de rutas metabólicas y defensivas, obtención de variedades mejoradas por cultivo *in vitro*, etc.

Así podríamos resumir las aplicaciones de la Biotecnología Vegetal:

- Mejora de la productividad de cultivares agronómicos de interés: mejorando su resistencia a estrés biótico (plagas, virus, patógenos); estrés abiótico (sequía, salinidad); tolerancia a herbicidas; interacción planta-suelo-microorganismos; absorción de nutrientes...
- Mejora nutritiva: enriquecimiento de vitaminas, eliminación de compuestos nocivos, mejores propiedades organolépticas, alimentos nutraceuticos.
- Mejora postcosecha: retraso en maduración de frutos, limitación de la presencia de hongos.
- Mejora de ornamentales: estructura, porte, color, olor, ausencia de fruto...
- Fitorremediación: eliminación de contaminantes presentes en suelos y/o aguas.
- Biocombustibles: cultivos bioenergéticos.
- Biofactorías (*Molecular farming*): biopolímeros, moléculas terapéuticas, plásticos biodegradables...
- Explotación de la diversidad natural, protección de la biodiversidad y sostenibilidad.
- Nuevas aplicaciones.

PRÁCTICA

INTRODUCCIÓN AL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL. REALIZACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO. ESTERILIZACIÓN DE SEMILLAS Y GERMINACIÓN *IN VITRO*

El cultivo *in vitro* es aquel realizado sobre un medio nutritivo, en condiciones controladas y de esterilidad (cultivo aséptico), y generalmente desarrollado a microescala. Puede ser de semillas, plantas, embriones, órganos, explantes (o porciones de tejidos de plantas), células, y protoplastos (células sin pared vegetal). Está basado en la totipotencia celular, es decir, en la capacidad de las células vegetales para poder desdiferenciarse y diferenciarse de nuevo para formar una planta. Este tipo de cultivo controlado hace factible la manipulación de las células individuales o tejidos desdiferenciados, paso fundamental para la regeneración de plantas seleccionadas y/o transformadas genéticamente.

El establecimiento de cultivos de tejidos vegetales desdiferenciados dependerá de los componentes del medio de cultivo, del tipo de explante original, y de los reguladores de crecimiento añadidos al cultivo (estos dos últimos factores serán estudiados más adelante). Todos los medios de cultivo poseen unos componentes básicos necesarios para el desarrollo vegetal: agua,

macronutrientes inorgánicos (el nitrógeno es el más importante componente dentro de este grupo), elementos traza o micronutrientes, y una fuente de carbono (sacarosa). La solución mineral más utilizada en el cultivo *in vitro* es la descrita por Murashige y Skoog en 1962, denominada globalmente como MS. Además, también se suele adicionar vitaminas al medio de cultivo. Estos compuestos se utilizan en cantidades muy pequeñas por lo que se almacenan disueltos y esterilizados (en autoclave) a una concentración que nos facilite su posterior adición al medio.

OBJETIVO

Iniciarse en la preparación de medios de cultivo, esterilización de semillas y germinación en condiciones *in vitro*. Se esterilizarán semillas de tomate y zanahoria y se prepararán los medios de germinación.



FIGURA 1.

Prácticas de Biotecnología Vegetal en la Facultad de Farmacia de la Universidad CEU San Pablo.

MATERIALES

MATERIAL VEGETAL

Semillas de tomate (*Solanum lycopersicum*).

MATERIALES Y EQUIPOS ESPECÍFICOS

1. Balanza.
2. pHmetro, soluciones para ajustar pH.
3. Agitador magnético, imanes.
4. Autoclave.
5. Campana de Flujo Laminar Horizontal.
6. Placas de Petri, esparadrapo de papel.
7. Papel de aluminio.
8. Vasos de precipitado y botellas de 1L Pinzas.
9. Lejía, Tween 20.
10. Agua destilada.
11. Tubos Falcon o Eppendorf.

MEDIO DE GERMINACIÓN MB

Solución mineral MS (Murashige y Skoog; 4,4 g/L) con vitaminas, sacarosa (20 g/L) y agar para cultivo de plantas (9 g/L).