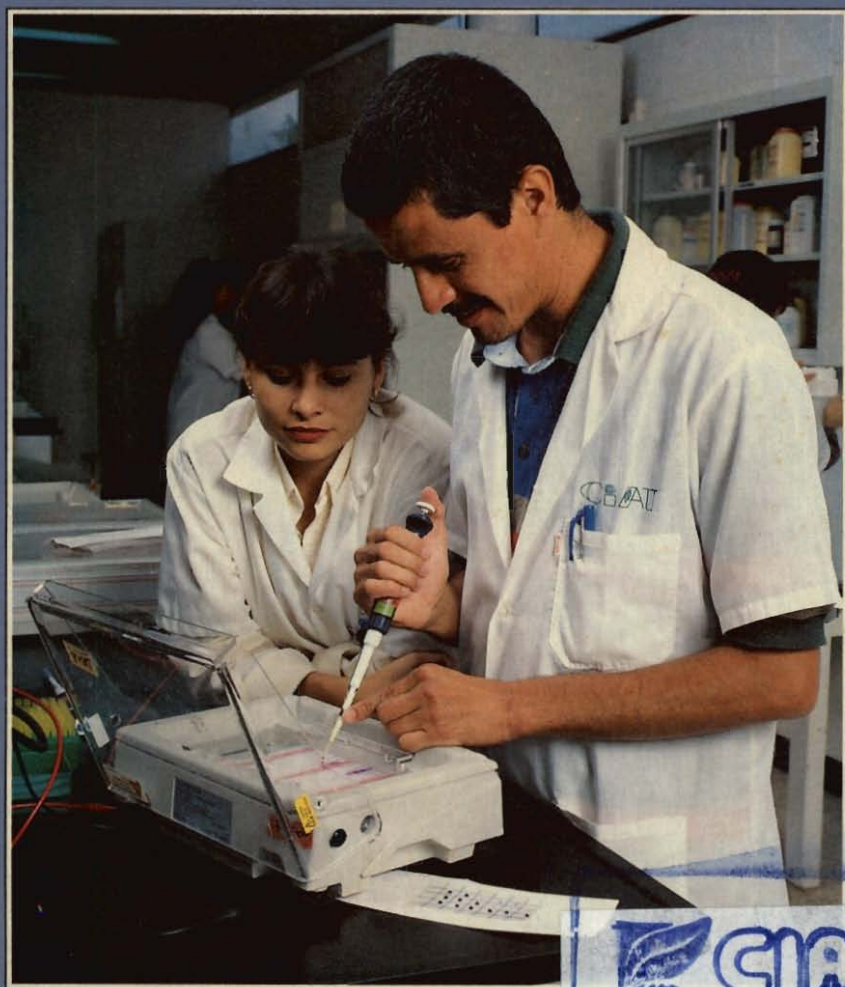


64989 esp.

INVESTIGACIÓN Y COOPERACIÓN
EN BIOTECNOLOGÍA EN EL CIAT

UNA INVITACIÓN



 **CIAT**
Centro Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture

 **CIAT**

COLECCION HISTORICA



ESTA ES UNA INVITACIÓN A LOS
INVESTIGADORES AGRÍCOLAS EN LOS
PAÍSES EN VÍAS DE DESARROLLO Y EN
LOS PAÍSES DESARROLLADOS.

Queremos colaborar con un mayor número de personas como usted con el fin de aplicar las poderosas herramientas de la biotecnología para preservar, estudiar y utilizar la agrobiodiversidad. Mediante el manejo efectivo de este recurso natural —cada vez más escaso— podremos enfrentar, juntos, los retos más urgentes de la agricultura de nuestros días.

UN ACTO DE EQUILIBRIO

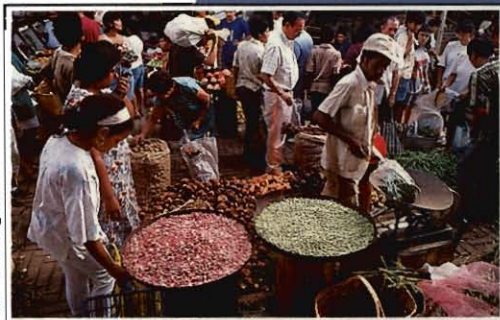
Durante los últimos 30 años más o menos, la única tarea urgente de los investigadores agrícolas en el trópico ha sido prestar ayuda a los agricultores para contribuir a la producción de alimentos en el mundo en desarrollo. Ahora, tenemos que trabajar con ellos para alcanzar un equilibrio entre tres objetivos competitivos:

1. Lograr y mantener la seguridad alimentaria.

En muchas partes del mundo en desarrollo, la seguridad alimentaria es —en el mejor de los casos— inestable. Para ayudar a abolir el hambre, los investigadores agrícolas deben atacar resueltamente los principales limitantes de producción y almacenamiento de alimentos.

2. Hacer que la agricultura sea más competitiva.

Apertura es la palabra favorita de las políticas económicas de muchos países en desarrollo. Los que más se benefician son aquellos países que logran habilitar mejor su agricultura para ser competitiva, vinculando la producción de los alimentos básicos con los nuevos mercados y explotando una amplia gama de diversidad genética para desarrollar nuevos productos. Una de las maneras en que los investigadores pueden ayudar es generando productos agrícolas cuya calidad satisfaga las demandas del mercado.



JUAN CARLOS QUINTANA

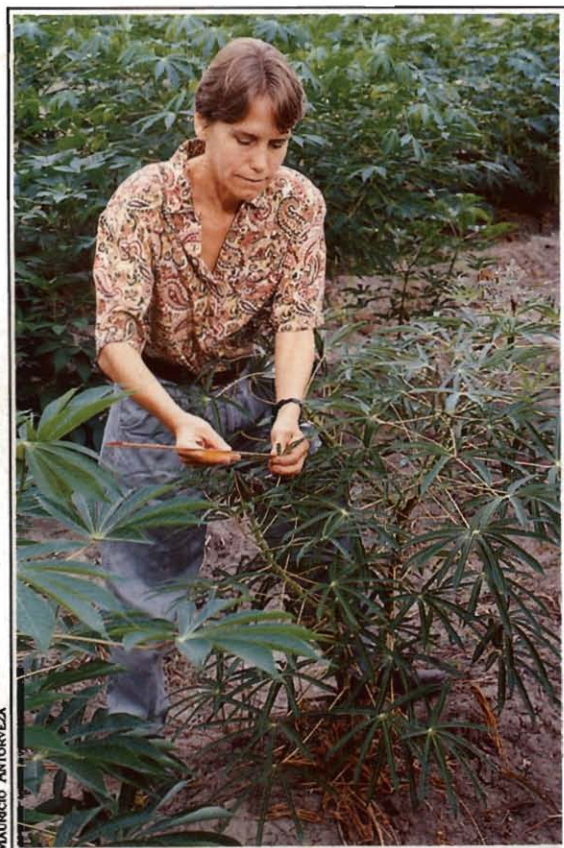
La biotecnología puede ayudar a mejorar la eficiencia, no sólo de las grandes agroindustrias, sino también de las operaciones en pequeña escala, tales como la extracción manual del almidón de yuca.



 **CIAT**
64989
COLECCION HISTORICA

LA INVESTIGACIÓN EN EL LABORATORIO Y EL TRABAJO DE CAMPO VAN DE LA MANO

Para los científicos del CIAT que aparecen en estas dos páginas, la construcción de un mapa genético molecular de la yuca —el primero en ser desarrollado en su totalidad en un centro internacional de investigación agrícola— es una tarea onerosa en el camino hacia el fitomejoramiento.



MAURICIO AVTORRIVEZA

"Para encontrar marcadores moleculares relacionados con características deseables, estamos estudiando las diferencias entre diversos genotipos de yuca dentro de un amplio rango de condiciones en el campo y en el laboratorio".

Equipo que construyó el mapa:
Martín Fregene,
Fernando Rodríguez,
Rocío Gómez,
Fernando Angel,
Merideth Bonierbale, y
Joe Tohme (no aparece en la foto).



MAURICIO AVTORRIVEZA

"La verdad es que yo ya había hecho esto antes. En la Universidad de Cornell desarrollé un mapa molecular de la papa, el cual ahora está siendo integrado a las prácticas de fitomejoramiento. Cambié de trabajo porque quería involucrarme de manera más directa en los asuntos alimentarios del mundo en desarrollo.

"El mapa debe explicar algunas de las complicaciones que enfrentamos en el mejoramiento de la yuca, y ayudarnos a encontrar maneras de solucionarlas. De hecho, ya estoy orientando mi programa de mejoramiento para hacer un mejor uso del mapa. El laboratorio y el trabajo de campo tienen que caminar de la mano".

Merideth Bonierbale,
Genetista, CIAT

UNA BIOTECNOLOGÍA DE DELANTALES EMBARRADOS

Para algunas personas, la biotecnología conlleva una imagen de ciencias puras, alejadas de la cotidianidad de la agricultura. Y —en algunos casos— esta imagen parece correcta.

Pero lo que estamos haciendo en el CIAT es una *biotecnología de delantales embarrados*. Eso quiere decir que integramos los métodos moleculares y celulares modernos con la investigación en el campo para lograr dos ventajas importantes:

1. Las nuevas técnicas pueden promover la eficiencia de los métodos convencionales y mejorar nuestras posibilidades de resolver aquellos problemas que de otra manera habrían sido difíciles o imposibles de superar.
2. Una relación estrecha con la investigación participativa, dirigida a los cultivos y sus parientes silvestres, asegura que lo que hacemos en el laboratorio sea relevante para los agricultores y los consumidores.

En los volantes adjuntos, titulados *Actualización de Proyectos* (ver el bolsillo), describimos la investigación que se está llevando a cabo en el CIAT sobre algunos temas seleccionados.



LUIS FERRANDO PINO

John Miles,
fitomejorador del CIAT,
analiza las infestaciones
del "salivazo" en la
gramínea *Brachiaria*.

"Hasta la fecha, una de las aplicaciones más importantes de la biotecnología a la agricultura ha resultado de la colaboración entre el CIAT y la Universidad de Purdue. Los científicos de todo el mundo están utilizando sus descubrimientos para generar variedades de arroz con una resistencia más durable al añublo".

Gary Toenniessen,
Director General
Adjunto,
Ciencias Agrícolas,
Fundación Rockefeller,
EE.UU.

"En el CIAT, la biotecnología parece estar estrechamente vinculada con otras actividades claves de la investigación, tales como el fitomejoramiento, la evaluación de recursos genéticos, y la fitopatología".

H.-J. Jacobsen,
Profesor,
Universidad de
Hannover, Alemania



3. *Reducir los riesgos ambientales y económicos de la agricultura.*

En una agricultura orientada hacia el mercado, existe una tendencia muy fuerte hacia el uso excesivo de pesticidas, lo cual aumenta los costos de producción, ocasiona daños ecológicos, y puede establecer barreras que impidan la comercialización. Una de las maneras en que la biotecnología puede combatir este problema es acelerando el desarrollo de variedades resistentes a las plagas y a las enfermedades, que eliminen o reduzcan la necesidad del control químico. Otra es promover las asociaciones naturales entre las plantas y los microorganismos benéficos para reducir las poblaciones de plagas y patógenos.

Para ayudar a los agricultores a mantener el equilibrio, no podemos limitarnos simplemente a dominar ciertas técnicas nuevas. Debemos aplicarlas con creatividad hacia fines prácticos, tales como la conservación de la diversidad genética (en los bancos de genes, en los campos de los agricultores y en la naturaleza) y la utilización de genes valiosos para el mejoramiento de las plantas.

Fernando
Correa,
fitopatólogo del
CIAT, examina
la reacción de
diversos
genotipos de
arroz a
un patógeno que
causa el añublo.



Mauricio Antorveza

“El mapa es como un rompecabezas con mil partes. En cada intento, tomamos un segmento o sonda del ADN y determinamos en qué lugar se ubica en el genoma de la planta”.

“Como nigeriano, me preocupan los problemas de abastecimiento de alimentos en Africa. Cuando estudiaba la primaria, comíamos yuca unas dos veces por semana. Durante el bachillerato, comíamos una vez al día. Cuando estaba en la Universidad, había familias que yo conocía que comían yuca dos veces al día. Si la producción se ve amenazada, muchas personas estarán en serias dificultades.

“Por tanto, tenemos que comenzar a buscar nuevas fuentes de resistencia a las enfermedades y a otros factores de estrés. Luego, tendremos que encontrar maneras eficientes de utilizar estratégicamente los genes de resistencia en el germoplasma que presenta buena adaptación. Este mapa nos ayudará a conducir el mejoramiento hacia objetivos específicos”.

Martin Fregene,
Genetista, CIAT

"Dentro de su esfuerzo de colaboración con los programas nacionales e internacionales de la región, el CIAT le ha brindado capacitación a los miembros de nuestra Red de Colaboración Técnica en Biotecnología Agrícola".

Juan Izquierdo, Oficial Regional de la Oficina de Producción Vegetal para América Latina, Organización para la Alimentación y la Agricultura (FAO), Chile

"Desde el inicio, el CIAT comprendió la importancia de políticas adecuadas para desarrollar las capacidades en biotecnología, y estimuló las pocas iniciativas (por ejemplo en bioseguridad) que han sido emprendidas en América Latina".

Walter Jaffé, Especialista en Generación y Transferencia de Tecnología, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), Costa Rica

"El CIAT puede desempeñar un papel importante en la investigación estratégica, al adaptar las nuevas tecnologías para enfrentar los problemas que los métodos actuales de investigación no pueden resolver o para mejorar la eficiencia de los métodos convencionales".

Javier Narváez Vásquez, Coordinador del Programa Nacional de Biotecnología Agrícola, Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA)



MAURICIO ANTORVEZA

Con el fin de analizar la diversidad genética a nivel molecular, los participantes en un curso de biotecnología para la conservación de la agrobiodiversidad aprenden a transferir ADN de un gel de electroforesis a una membrana de nilón.

UN LABORATORIO SIN PAREDES

Cuando el CIAT estableció la Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB) en 1985, buscamos una manera de integrar las nuevas técnicas a la investigación estratégica del Centro, el cual actualmente incluye un amplio rango de actividades en el desarrollo de germoplasma y en el manejo de los recursos naturales. Para lograr este propósito, nos cuenta William Roca, jefe de la UIB, que se organizó "un laboratorio sin paredes —un laboratorio abierto a las personas que pudieran ayudar a identificar los problemas y a desarrollar soluciones innovadoras".

Las principales funciones de la UIB son:

- Investigar el potencial de las nuevas técnicas, utilizando la información básica de los laboratorios avanzados (ver *La Caja de Herramientas de la Biotecnología*, en el bolsillo).
- Diseñar aplicaciones de la biotecnología para ser usadas por los fitomejoradores y otros investigadores agrícolas.

Desde 1989, los científicos del CIAT y sus colegas de otras instituciones han puesto en práctica las técnicas del cultivo de anteras en arroz, la conservación *in vitro* de la yuca, la "dactiloscopia" genética mediante isoenzimas, y el uso de mapas y marcadores genéticos moleculares. Ya están en camino más aplicaciones.



Un método sencillo de fitomejoramiento, efectivo en términos de costos, mediante el cultivo de anteras.

LUIS FERNANDO PINO



"Gracias al envío que ustedes nos hicieron de 16 clones in vitro de yuca, desarrollamos un cultivar de yuca de alto rendimiento, el Nan-Zhi 188, el cual se distribuyó rápidamente a los agricultores de las áreas rurales a un bajo precio, mediante el cultivo de tejidos".

*Kuo Chun-Yen,
Profesor, Instituto de Botánica del Sur de China*

"Mi relación con los especialistas en biotecnología es un matrimonio por conveniencia: yo los necesito a ellos y ellos me necesitan a mí".

*César Cardona,
Entomólogo, CIAT*

UNA PUERTA ABIERTA

Una de las consignas de la investigación y la cooperación en biotecnología del CIAT es mantener la puerta abierta. Mantenemos esa apertura para dar cabida a acuerdos flexibles sobre investigación y capacitación en un amplio rango de campos. Además, abrimos puertas de oportunidad para nuestros colegas, mediante:

- Las redes de investigación, las cuales proporcionan un marco de referencia para gran parte de nuestras actividades colaborativas.
- La capacitación y la programación de otras actividades dirigidas al fortalecimiento de la capacidad nacional de investigación.
- El apoyo a estudiantes y científicos que están realizando sus investigaciones de tesis de pregrado, maestría o doctorado.
- La participación activa en el debate sobre la bioseguridad, los derechos de propiedad intelectual y el intercambio de recursos genéticos.

(Para mayor información sobre estas actividades, consulte *Desarrollando Capacidades en Biotecnología*, en el bolsillo.)

Muchas instituciones de los países en desarrollo ya cuentan con un personal y una infraestructura excelentes para la investigación en biotecnología. Aún así, sigue siendo muy grande la brecha en tecnología genética entre estos países y el mundo industrializado.

Una buena manera de cerrar esta brecha es mediante la realización de proyectos colaborativos de investigación que ponen en contacto a los especialistas en biotecnología con los científicos de otras disciplinas. En años recientes, el CIAT ha realizado 10 proyectos de esta naturaleza con apoyo de diversos donantes. Hay abundancia de oportunidades para mayor cooperación.

Si no fuera así, no le estaríamos enviando esta invitación.

"Desde hace algún tiempo, el CIAT comprendió la necesidad de orientar la aplicación de la biotecnología hacia los clientes y los problemas; y, por lógica, el CIAT ha sido nuestro socio en el funcionamiento de la Red Internacional de Biotecnología en Yuca".

*Th. J. Wessels,
Jefe,
Cooperación para la Biotecnología y el Desarrollo, Dirección General de Cooperación Internacional (DGIS), Holanda*

"El intercambio de estudiantes de maestría y de posdoctorado entre el CIAT y la Universidad de Purdue ha sido una de las recompensas continuas de nuestra feliz y fructífera colaboración".

*Morris Levy,
Profesor,
Universidad de Purdue, EE.UU.*

MEJOR CONSERVACIÓN DE LOS RECURSOS GENÉTICOS DE YUCA

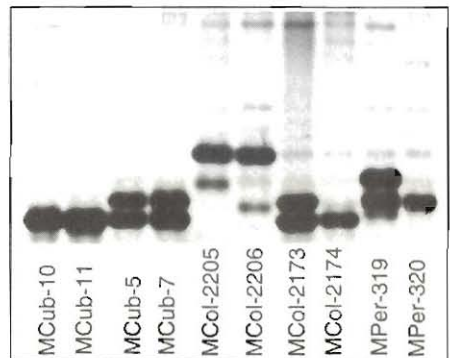
La colección de yuca que se mantiene en el CIAT contiene cerca de 6000 accesiones provenientes de los principales centros de diversidad de la especie en las Américas y de los centros secundarios de África, Asia y Oceanía. El Centro desarrolla una estrategia integrada para mejorar la conservación de estos recursos genéticos.

La identificación de los duplicados que existen en la colección es un componente de esa estrategia. La colección contiene clones locales (cada uno con nombre diferente) y muchos de éstos posiblemente constituyen el mismo genotipo. Para aumentar la eficiencia de conservación y de manejo del germoplasma es necesario identificar dichos duplicados.

El análisis de perfiles de isoenzimas (ver foto), junto con los descriptores morfológicos y agronómicos, indican que cerca del 20% de la colección son duplicados. A grupos de variedades ya examinadas respecto a su morfología y sus Isoenzimas, les hacemos la dactiloscopia del ADN para detectar diferencias genéticas de manera más precisa. Por ejemplo, en una muestra de 100 accesiones aparentemente similares, determinamos que 20 son genéticamente únicas —y las demás son material duplicado— utilizando como sonda el gen que codifica la proteína III del bacteriófago M13. Los marcadores RAPD confirman estos resultados.

Para la conservación efectiva de los recursos genéticos es necesario combinar la conservación *in situ* y *ex situ*. La conservación *in situ* se prefiere para las poblaciones de parientes silvestres de las especies cultivadas y para cultivares primitivos. La conservación *ex situ* complementa ese enfoque porque protege el germoplasma que se encuentra bajo amenaza de erosión genética o de otros peligros. Esta protección puede lograrse por diversos medios, que van desde la conservación de cultivares en el campo, hasta la conservación *in vitro*, el almacenamiento de ADN y la criopreservación.

En cooperación con el Instituto Internacional para los Recursos Fitogenéticos (IPGRI), el CIAT ha desarrollado un banco activo de germoplasma *in vitro* que contiene más de 5900 clones, los cuales representan más del 95% de la colección mundial de germoplasma de yuca (ver foto). La Unidad de Recursos Genéticos del Centro mantiene esos clones en condiciones de crecimiento lento (es decir, a temperatura reducida y en un medio especial). Aun así, las accesiones deben renovarse por periodos que van de 12 a 18 meses. El banco *in vitro* completo ocupa 35 m² de espacio de laboratorio, cerca de una milésima parte del área



Perfiles de la Isoenzima α , β -esterasa obtenida de accesiones de germoplasma de yuca. Son notorias las semejanzas y las diferencias entre los perfiles de cinco grupos que, de otra manera, son morfológicamente similares.



El banco activo de germoplasma de yuca in vitro que maneja el CIAT.



Criopreservación: el enfoque ideal para la conservación a largo plazo de los recursos genéticos de yuca.

necesaria para mantener esos mismos materiales en el campo. De esta colección activa hemos distribuido casi 2000 clones de yuca libres de patógenos a las Instituciones nacionales de investigación de 35 países de África, Asia y América Latina.

El enfoque ideal para la conservación a largo plazo es la criopreservación o ultracongelamiento (ver foto). Puesto que detiene las funciones celulares y la senescencia, este método permite preservar el genoma vegetal indefinidamente. El CIAT ha estado investigando la criopreservación de ápices caulinares de yuca desde 1989. En 1991 fue posible recuperar plantas de yuca completas de los ápices caulinares congelados en nitrógeno líquido (-196 °C). Introduciendo mejoras en la técnica, que consistían en cambios en los tratamientos de deshidratación del tejido, en la tasa de enfriamiento y en el medio de cultivo, se recuperaron sistemáticamente plantas de ápices caulinares congelados, con una tasa de éxito de más del 60%.

Estamos desarrollando ahora un protocolo sencillo para lograr una congelación más eficiente y menos costosa, que permitirá la conservación a largo plazo de la colección base de yuca en nitrógeno líquido.

Áreas de colaboración: La conservación in vitro de la yuca ocupa un lugar importante en la capacitación que el CIAT ofrece en el área de recursos genéticos. Figuró, por ejemplo, entre los principales temas de un curso titulado "Biotecnología para la Conservación de la Agrobiodiversidad", que se realizó en la sede del Centro en noviembre de 1994 y septiembre de 1995.

En 1989, el CIAT y el IPGRI se unieron para desarrollar un banco piloto de germoplasma para estudiar durante 3 años los requerimientos técnicos y logísticos de establecer y operar un banco in vitro. En colaboración con los programas nacionales, los dos centros están planeando un proyecto piloto similar para poner en funcionamiento un banco de germoplasma base empleando técnicas de criogenia.

CONTACTO EN CIAT: W. Roca, M. Bonierbale y C. Guevara



UN PRIMER CONTACTO CON LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE *PHASEOLUS*

Las 26,500 accesiones de *Phaseolus* mantenidas en la Unidad de Recursos Genéticos del CIAT contienen suficiente diversidad genética para tener ocupados a los investigadores en frijol durante décadas. Ahora bien, puesto que la colección completa es muy grande y no se ha caracterizado completamente, se convierte en una herramienta difícil de manejar para quien estudia la estructura y la distribución de la diversidad genética de *Phaseolus* y para identificar genes valiosos.

Con el fin de ejecutar esas tareas en forma más efectiva, algunos investigadores del CIAT —entre ellos, los especialistas en genética de frijol, biotecnología y geografía agrícola— formaron recientemente dos colecciones núcleo de *Phaseolus*. La primera contiene 1420 accesiones y representa el frijol común cultivado (*Phaseolus vulgaris*), y la segunda, con 100 accesiones, contiene a *P. vulgaris* silvestre. Estas colecciones núcleo fueron concebidas para dar a los investigadores una idea preliminar de la diversidad existente y para servir de guía en estudios posteriores; no intentan reemplazar las colecciones completas o de reserva.

Las colecciones núcleo, no obstante, son útiles sólo en la medida en que representen con precisión la diversidad genética de las especies muestreadas. Para satisfacer este requisito, la composición de las colecciones núcleo se basó en una combinación de factores que se relacionaron con la evolución del frijol común y con los sistemas agroecológicos en los cuales éste se ha encontrado. Por ejemplo, al formar la colección de *P. vulgaris* cultivado, se incluyeron más accesiones de los centros primarios de diversidad que de los secundarios, y se dio más importancia a los tipos de semilla y a los hábitos de crecimiento primitivos que a los tipos comerciales modernos.

Para garantizar que la colección núcleo cubra el rango total de adaptación del cultivo, se desarrolló una clasificación agroecológica sencilla, que se basa en cuatro factores (como suelo y precipitación) e incluye un total de 54 sistemas agroecológicos diferentes. El sistema agroecológico al cual pertenece cada accesión se identificó utilizando las coordenadas cartográficas de los sitios de recolección de las líneas nativas de frijol.

En colaboración con los científicos de la Universidad de Wisconsin, E.U., se utilizaron marcadores RAPD para comprobar si la variabilidad genética de la colección núcleo de *P. vulgaris* cultivado en verdad representa la variabilidad de la colección de reserva.

Ahora se necesita evaluar las colecciones núcleo —por ejemplo, respecto al uso eficiente del fósforo— y utilizarlas seleccionando los genotipos deseables.

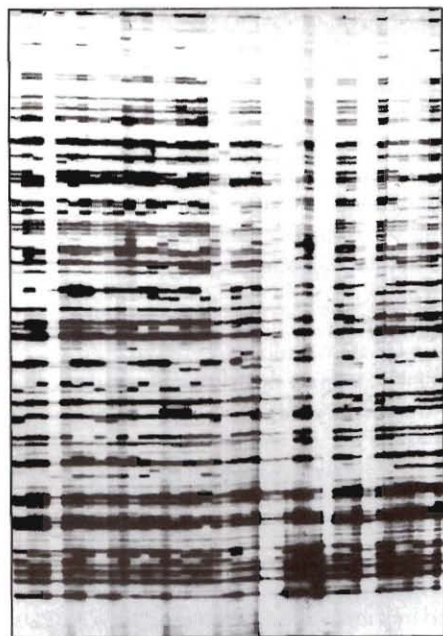
Además, la colección de accesiones silvestres se está caracterizando, utilizando faseolina y otras proteínas polimórficas de la semilla como indicadores bioquímicos de la diversidad genética; se usan también marcadores moleculares, como AFLPs y RAPDs (ver foto). Estas técnicas ayudan a estudiar la estructura genética del germoplasma silvestre, a determinar el grado de domesticación del frijol cultivado desde una fracción limitada de poblaciones silvestres (denominado el *efecto fundador*) y a detectar el flujo

de genes entre el germoplasma silvestre y el cultivado, y entre acervos de genes de frijol común de la Región Andina y de Mesoamérica.

Áreas de colaboración: Las colecciones núcleo y los procedimientos mediante los cuales éstas se forman se consideran oportunidades nuevas para activar la colaboración con bancos de germoplasma y programas de mejoramiento. Las colecciones proporcionarán un punto de partida común para hacer estudios y evaluaciones adicionales sobre la diversidad de *Phaseolus*.

La colaboración incluye la aplicación de procedimientos nuevos para formar colecciones núcleo de otras especies; esto ayudaría a los investigadores a estudiar un amplio espectro de agrobiodiversidad. Herramientas como los marcadores moleculares pueden magnificar la precisión de estos estudios y los conocimientos que de ellos obtenemos. Los sistemas de información geográfica (GIS, en inglés) pueden ayudarnos a describir y analizar la diversidad genética en su relación con las variables agroecológicas clave.

Este tipo de estudio mejorará nuestra comprensión de la relación que hay entre la diversidad genética a nivel molecular y la diversidad biológica de los agroecosistemas. También nos ayudará a desarrollar estrategias para que tanto la conservación *in situ* y *ex situ* como el uso dado al germoplasma sean más efectivos. Mediante este trabajo, el CIAT puede ayudar a los países en desarrollo a establecer trabajos en áreas clave considerados en la Convención sobre Diversidad Biológica.



Dactiloscopia usando AFLPs de diferentes accesiones de la colección núcleo de *P. vulgaris silvestre*.

CONTACTO EN CIAT: J. Tohme, S. Beebe y D. Debouck

Diciembre de 1994



EXPLORANDO LOS PARIENTES SILVESTRES DEL FRIJOL COMÚN

Se han identificado muchos genes útiles en las formas silvestres y en los parientes distantes de cultivos alimenticios básicos importantes, pero frecuentemente éstos están más allá del alcance del fitomejoramiento convencional. En el CIAT estamos explorando, mediante varios proyectos, nuevas maneras de facilitar la transferencia de esos genes al frijol común cultivado (*Phaseolus vulgaris*).

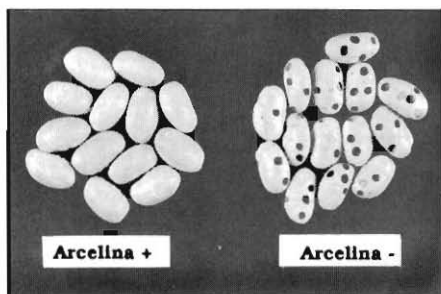
En las formas silvestres o primitivas de *P. vulgaris* existen algunas características importantes. Pero incorporarlas al frijol común domesticado puede resultar bastante complejo, aunque ambos sean sexualmente compatibles.

Tomemos, por ejemplo, el caso de la resistencia al gorgojo mexicano del frijol (*Zabrotes subfasciatus*) y al gorgojo común del frijol (*Acanthoscelides obtectus*), las dos principales plagas del frijol seco almacenado en África y América Latina. En la evaluación de miles de accesiones de *P. vulgaris* silvestre no fue posible identificar resistencia al gorgojo mexicano del frijol. Sin embargo, algunas accesiones de *P. vulgaris* silvestre fueron resistentes al gorgojo mexicano del frijol, otras al gorgojo común del frijol, y varias a ambas plagas.

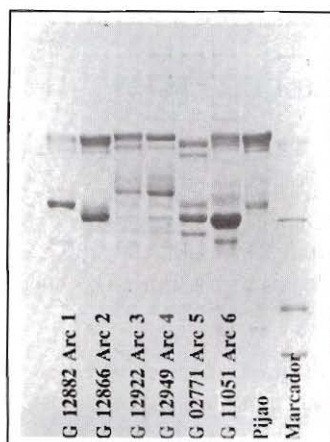
Estudios realizados en colaboración con la Universidad de Wisconsin señalaron que la causa de la resistencia al gorgojo mexicano del frijol era una proteína, la arcelina, que el insecto aparentemente tiene dificultad en digerir (ver fotos). El nombre de esta proteína deriva de un pueblo mexicano, Arcella, donde se recolectaron accesiones silvestres de frijol que contenían el gen de resistencia.

La biosíntesis de la arcelina que ocurre en los genotipos resistentes es una característica monogénica o de herencia simple; por tanto, los investigadores de frijol del CIAT pudieron incorporar la resistencia a *Z. subfasciatus* en líneas experimentales de frijol domesticado. Estas líneas se están evaluando actualmente en África y América Latina.

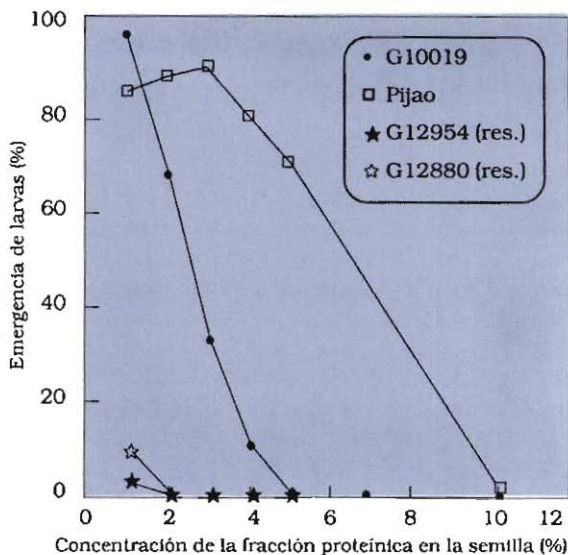
La única desilusión que nos ha causado la arcelina es que no tiene ningún efecto contra *A. obtectus*. Con el apoyo de la Administración General de Bélgica para la Cooperación en el Desarrollo (AGCD), estamos caracterizando los factores que determinan la resistencia a esa plaga en el germoplasma de *P. vulgaris* silvestre. Hasta ahora hemos identificado una fracción proteínica que inhibe el desarrollo larval del insecto en las accesiones resistentes del frijol silvestre (ver figura). Sabemos también que otra fracción contiene factores generales de resistencia que limitan el crecimiento del insecto.



Acción de *Z. subfasciatus* en accesiones de frijol que tienen el gen de la arcelina (resistentes) y accesiones sin él (susceptibles).



Un marcador bioquímico sirve para identificar el gen de la arcelina en accesiones de frijol. Cada uno de los seis materiales resistentes, designados por "G", lleva una variante diferente del gen de la arcelina.



Efecto de la fracción proteínica de acetona de 0-20% en la emergencia de las larvas de *A. obtectus*, empleando semilla artificial de frijol.

Estos resultados explican, en parte, el carácter genético cuantitativo o complejo de la resistencia a *A. obtectus*. Una vez que conozcamos exactamente la naturaleza de los factores de resistencia, esperamos desarrollar un método bioquímico o molecular que permita seleccionar eficientemente el germoplasma de frijol por resistencia duradera y multigénica a esta importante plaga.

Áreas de colaboración: El CIAT es un candidato lógico para caracterizar las proteínas que posiblemente sean responsables de la resistencia a *A. obtectus* en el frijol común silvestre. Si tenemos éxito, habremos creado un gran espacio para actividades de colaboración en la clonación de los genes asociados con esa resistencia y en su transferencia al frijol común.

Esa colaboración ya se lleva a cabo en la investigación sobre una variante específica del gen correspondiente a la arcelina. Con la financiación de AGCD, científicos de la Universidad de Ghent, en Bélgica, están clonando el gen de arcelina-5 con miras a su posterior transferencia al frijol común y otros cultivos que necesitan resistencia al gorgojo mexicano del frijol. El Centro Nacional de Recursos Genéticos (CENARGEN) del Brasil también investiga esta posibilidad.

El CIAT está investigando los recursos genéticos de otras especies de *Phaseolus*, como *P. lunatus* y *P. acutifolius*, para hallar fuentes adicionales de resistencia. Explora, igualmente, enfoques alternativos para desarrollar resistencia, entre otros, los factores antinutritivos como la avidina y la cistatina.

CONTACTO EN CIAT: J. Mayer y C. Cardona



CONOCER EL ENEMIGO: UNA ESTRATEGIA HACIA LA RESISTENCIA DURADERA AL AÑUBLO DEL ARROZ

El añublo del arroz o piricularia es la enfermedad más extendida en los países arroceros y la que más amenaza este alimento básico de 2500 millones de personas. En la búsqueda de una solución genética a este problema, los científicos del CIAT y sus colaboradores en la investigación han aprendido mucho acerca de la base genética de las interacciones entre la planta hospedante y su enemigo número uno.

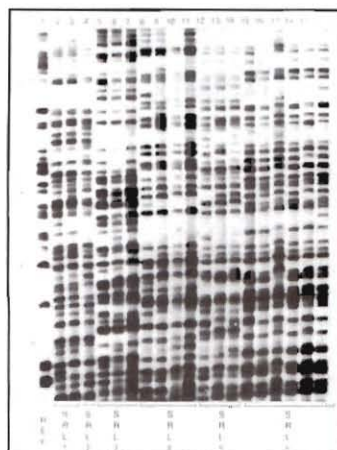
El patógeno del añublo (*Pyricularia grisea*) es un hongo que genera un gran número de razas o patotipos; esta diversidad extrema complica el desarrollo de cultivares resistentes de arroz. La mayoría de las variedades liberadas hasta el momento tienen genes simples de resistencia, que sólo son efectivos contra ciertos patotipos. Invariablemente, esta resistencia pierde su efectividad tan sólo 2 ó 3 años después, como resultado de los cambios en la frecuencia de los patotipos, de la inmigración de razas compatibles que ya existían o de la emergencia rápida de nuevas razas mediante mutación u otros mecanismos. Como no disponen de variedades con resistencia duradera al añublo, muchos agricultores dependen excesivamente de los fungicidas.

En 1989, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) liberó Oryzica Llanos 5. Esta variedad fue una línea experimental desarrollada por investigadores del CIAT en Santa Rosa, un sitio de alta concentración de numerosas razas del hongo causante del añublo en Colombia. Pasados 6 años de producción comercial de esta variedad, su resistencia (inmunidad) al añublo todavía se mantiene. Los científicos del Instituto Internacional de Investigación del Arroz (IRRI), en las Filipinas, informan que esta línea también ha mostrado resistencia en varios sitios invadidos por el añublo en Asia.

Para explicar la durabilidad de esta resistencia y facilitar el desarrollo de variedades similares, un grupo interdisciplinario del CIAT, en colaboración con colegas de la Universidad de Purdue, E.U., ha realizado estudios sobre la diversidad de la virulencia y ha caracterizado la estructura genética del patógeno, mediante la "dactiloscopia" genética, utilizando una sonda de ADN llamada MGR-586 (repeticiones del ADN de *Magnaporthe grisea*, que conforman una sonda molecular desarrollada por Dupont).

Los estudios sobre la estructura genética y la frecuencia de la virulencia del hongo indican que ciertas combinaciones de genes de virulencia están ausentes, o se presentan con baja frecuencia, cuando los genes de resistencia de la planta son específicos contra un linaje o una familia formada por varios patotipos.

Partiendo de estos resultados, los científicos del CIAT están aumentando la precisión de los trabajos de mejoramiento respecto a la resistencia duradera al añublo. La estrategia es hacer corresponder las combinaciones de genes de resistencia de la planta hospedante con la combinación de genes de virulencia que están ausentes o se presentan con baja frecuencia en la población de patógenos. Esto hace que los diversos linajes genéticos del patógeno sean incompatibles con la planta hospedante.



"Dactiloscopias" genéticas usando la sonda MGR-ADN de aislamientos del añublo de Santa Rosa, Colombia. Observe la semejanza de los patrones en los aislamientos dentro de los linajes genéticos y las evidentes diferencias entre los linajes 1 a 6.

Mediante el análisis masal de grupos de segregantes y el uso de marcadores RAPD se diferenciarán los genotipos de arroz susceptibles de los resistentes. Observe que el patrón de RAPDs para el progenitor susceptible es el mismo que el del grupo segregante susceptible 1.



Con financiación recibida de la Fundación Rockefeller, avanzamos rápidamente en la aplicación de los datos sobre linajes, derivados de la dactiloscopia MGR-ADN (ver foto). Estos, junto con los marcadores moleculares (RFLPs y RAPDs), permiten identificar los segmentos cromosómicos que portan la resistencia a los linajes del hongo encontrados en Colombia (ver foto). Esperamos tener, dentro de pocos años, marcadores que permitan identificar y acumular más eficientemente las combinaciones de genes de resistencia.

Áreas de colaboración: El IIRRI y el CIAT están promoviendo intensamente la colaboración internacional en el desarrollo del germoplasma de arroz con resistencia duradera al añublo, para que los países en desarrollo puedan disfrutar más fácilmente de los beneficios del germoplasma resistente, que se estiman en US\$210 millones anuales en sólo América Latina.

El IIRRI coordina la investigación en arroz a nivel mundial, mientras que el CIAT se concentra en América Latina. Junto con científicos de las universidades de Cornell y de Purdue, el personal de los dos centros internacionales ha adoptado una estrategia de mejoramiento conjunta. Nuestro trabajo en Colombia es esencial porque se realiza en un sitio (Santa Rosa) donde el hongo causante de la enfermedad es extremadamente variable.

Para que los institutos nacionales tuvieran mayor acceso a los nuevos avances y a la tecnología en el área, el CIAT realizó un taller sobre el añublo del arroz en octubre de 1994, con la colaboración del Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario (PROCISUR). El taller estuvo orientado al análisis de la diversidad patogénica, usando marcadores moleculares, y a los estudios sobre la diversidad de la virulencia. Participaron equipos multidisciplinarios de científicos (cada equipo conformado por un mejorador, un patólogo y un especialista en biotecnología) de cinco países del Cono Sur de América Latina.

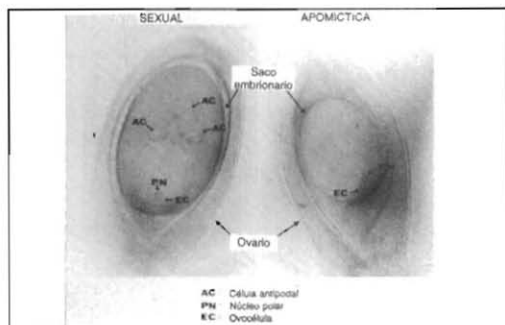
CONTACTO EN CIAT: F. Correa y J. Tohme

Diciembre de 1994

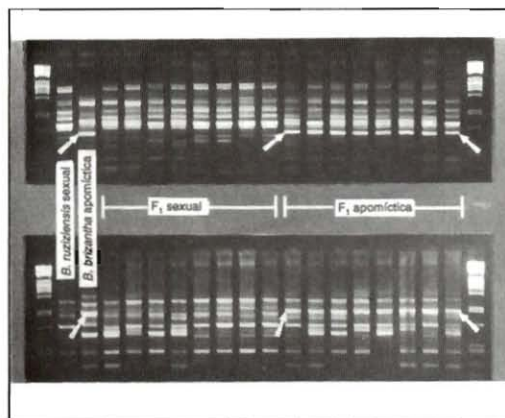


APOMIXIS EN EL GÉNERO *BRACHIARIA*: ¿UNA NUEVA ESPERANZA PARA LOS HÍBRIDOS?

Brachiaria y otras gramíneas forrajeras tropicales son algunas de las pocas especies económicamente importantes que pueden reproducirse mediante *apomixis*, es decir, a partir de semillas cuyo embrión se origina gracias a un proceso asexual (ver foto). Las plantas que crecen de esta semilla son genéticamente idénticas a su progenitor femenino y lo son también entre sí. Si se pudiera introducir la apomixis en cultivos



Estructura reproductiva de una planta sexual y de otra apomictica (vistas con un microscopio de contraste de Interferencia) obtenidas en un cruce entre un tetraploide sexual de *B. ruziziensis* y un tetraploide apomictico de *B. brizantha*.



Amplificación del ADN de dos marcadores RAPD ligados al gen de la apomixis en una población segregante de *Brachiaria*.

que generalmente se propagan en forma sexual, se conseguiría que los híbridos vigorosos se reprodujeran en forma idéntica de una generación a otra.

En el CIAT hemos identificado recientemente marcadores moleculares (RAPDs) ligados a un solo gen dominante que parece controlar la apomixis en *Brachiaria* (ver foto). Al permitir la rápida identificación de individuos apomicticos en la progenie de los cruzamientos hechos entre tipos apomicticos y sexuales, los marcadores deben ayudar a los mejoradores del CIAT y de Brasil a reunir los rasgos deseables de diferentes especies de *Brachiaria* en los cultivares híbridos y reproducirlos de manera uniforme e indefinida mediante la apomixis.

Aunque este trabajo no se continúe, la importancia de *Brachiaria* en América tropical justificaría el uso que se da a los marcadores moleculares para marcar los genes de la apomixis en estas especies. Sólo en Brasil se siembran más de 50 millones de hectáreas con pasturas de *Brachiaria*. Si se toma la región latinoamericana como un todo, estas especies forrajeras comerciales son las que más se cultivan.

Ahora bien, en vez de finalizar esta investigación con *Brachiaria*, ¿por qué no comenzarla desde ese punto? Si suponemos que se puede transferir un gen de la apomixis desde esta especie hasta otras, podríamos multiplicar los híbridos de manera uniforme, a bajo costo.

Los híbridos son la progenie vigorosa de los cruzamientos entre progenitores genéticamente diferentes. Pues bien, sólo la primera generación sexual de esta semilla posee el vigor del híbrido, y no tiene sentido que los agricultores adopten híbridos a menos que compren semilla nueva para cada siembra. En muchos países en desarrollo, los deficientes sistemas de distribución de semilla y la pobreza de las áreas rurales hacen prácticamente imposible la adquisición de semilla híbrida. Otro problema es la biología reproductiva de ciertas especies cultivadas que se autopolinizan: en ellas la producción de polen o su traslado al ovario es deficiente. Esto complica notablemente la producción masiva de semilla híbrida convencional.

Superar los obstáculos que se oponen al desarrollo de híbridos es una de las metas de las diversas instituciones que tratan de incorporar el gen de la apomixis en cereales importantes mediante la hibridación introgresiva. Con el tiempo, se podrían desarrollar cultivos apomicticos mediante la aplicación de nuevas técnicas de biotecnología que transfieran el gen de la apomixis entre especies genéticamente más distanciadas.

Una vez que los agricultores tengan su primera provisión de híbridos apomicticos podrán producir una generación tras otra de semilla híbrida.

Áreas de colaboración: El desarrollo de cultivos apomicticos mediante la ingeniería genética incluiría tres etapas principales: 1) hacer un mapa detallado de la región cromosómica de *Brachiaria* donde está ubicado el gen de la apomixis, utilizando marcadores moleculares; 2) aislar y clonar el gen de la apomixis; y 3) transformar genéticamente las especies de interés. Cada etapa representa un gran reto y requerirá de estrecha colaboración con laboratorios de investigación avanzada. El CIAT inició ya la primera etapa al identificar un marcador molecular ligado al gen de la apomixis; también ha avanzado en el desarrollo de un protocolo de transformación a partir de la regeneración de plantas de *Brachiaria* desde cultivos de tejido. Esta técnica nos permitirá evaluar la expresión del gen de la apomixis en los diferentes ambientes en que se cultiva *Brachiaria*.

CONTACTO EN CIAT: J. Miles y J. Tohme

Diciembre de 1994



DESARROLLANDO CAPACIDADES EN BIOTECNOLOGÍA

La biotecnología ofrece resultados tangibles en el CIAT. Desde 1988 hemos desarrollado varias aplicaciones prácticas que los científicos del Centro y de instituciones colaboradoras utilizan actualmente para conservar y mejorar la agrobiodiversidad y su uso en el mejoramiento de los cultivos.

Aplicación	Usuario del CIAT (programa/unidad)	Año
"Dactiloscopia" de isoenzimas	Yuca, Recursos Genéticos	1988
Proteínas (faseolina) como marcadores	Frijol, Recursos Genéticos	1989
Banco de genes in vitro	Yuca, Recursos Genéticos	1989
Intercambio de germoplasma in vitro	Yuca, Recursos Genéticos	1989
Mejoramiento mediante el cultivo de anteras	Arroz	1990
Técnicas de marcadores moleculares	Frijol, Yuca, Arroz, Forrajes Tropicales	En curso

Para que estas tecnologías sean más ampliamente disponibles en los países en desarrollo, el CIAT fomenta la cooperación en la investigación en biotecnología a través de redes de investigación y desarrollo, capacitación y otras actividades.

Redes

Para ayudar a establecer puentes que comuniquen las instituciones y para hallar aplicaciones biotecnológicas útiles, el CIAT promueve redes internacionales de investigación agrícola orientadas a los cultivos básicos. Estas redes proporcionan los medios para dar prioridad a temas de investigación en biotecnología y para atraer la atención de los donantes de fondos y de la comunidad científica mundial hacia tales temas.

El CIAT ha apoyado decididamente la Red Internacional de Biotecnología de Yuca (CBN) desde su establecimiento en 1988. Los objetivos principales de esta red son dos:



Propagación masiva de germoplasma de yuca del CIAT por medio del cultivo de tejidos en el Instituto de Botánica de China Meridional. Un científico chino indica aquí cómo se empaacan las plántulas en cajas de cartón para distribuir las en los sitios donde se ensaya el rendimiento en los campos de los agricultores (foto cortesía del Profesor Kuo Chun-Yen).

estimular la investigación avanzada sobre yuca y asegurar que este trabajo se base en las prioridades de los beneficiarios, especialmente de los consumidores y de los pequeños agricultores. Financiada por la Dirección General para la Cooperación Internacional (DGIS) de Holanda, la CBN se esfuerza por lograr esas metas fomentando el intercambio de información entre asociaciones de agricultores, ONGs, programas de investigación nacionales, otras redes, laboratorios de investigación avanzada, centros internacionales y entidades donantes.



Equipos multidisciplinarios de científicos de los cinco países del Cono Sur de América Latina hacen una separación de ADN mediante electroforesis en gels, en un curso sobre la aplicación de marcadores moleculares al estudio del añublo del arroz.

La Red organiza conferencias y talleres, proyectos de investigación colaborativa, y actividades de capacitación a corto plazo para científicos de países en desarrollo. La última conferencia que organizó la Red tuvo lugar en Bogor, Indonesia, en agosto de 1994, y a ella asistieron 150 científicos de 16 países en desarrollo y de 8 países desarrollados. Las Instituciones que integran la Red están comprometidas en 40 proyectos colaborativos de biotecnología, que representan un aumento considerable desde los 4 que había en 1988; con ellos se procura solucionar algunos problemas que plantean la producción y la utilización de la yuca.

Además, el CIAT participa activamente en la Red de Biotecnología de Arroz, que es apoyada por la Fundación Rockefeller. El Centro ha establecido también la Red de Investigación Avanzada en Biotecnología de Frijol *Phaseolus* (BARN). En un taller de esta Red, celebrado en el CIAT en 1993, 50 científicos de 16 países identificaron una gran variedad de temas que podrían servir como punto de partida para proyectos de investigación colaborativa. Este evento fue financiado por la Agencia Alemana para la Cooperación Técnica (GTZ).

Capacitación

Durante los últimos 5 años, más de 100 científicos se han capacitado en el Centro en diferentes aspectos de la biotecnología. Algunos recibieron capacitación directa en el trabajo y durante períodos variables de tiempo; otros hicieron en el CIAT investigaciones para su tesis, ya sea de posgrado o de pregrado; y otros participaron en cursos de capacitación diseñados para grupos.

En 1994, y con el apoyo de la Fundación Rockefeller, se inició una serie de cursos sobre mejoramiento del arroz mediante el cultivo de anteras. Los participantes fueron equipos integrados por un especialista en cultivo de tejidos y un mejorador de arroz de

la misma institución. Los equipos estudiaron la forma de incorporar el cultivo de anteras al mejoramiento de ese cultivo. En octubre de 1994, el CIAT y el Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario (PROCISUR) organizaron un curso similar para mejoradores, patólogos y biólogos moleculares de los países del Cono Sur de América Latina. En ese curso se trataron dos temas: el análisis de la diversidad patogénica con ayuda de marcadores moleculares, y la identificación y marcación de los genes de resistencia en la planta hospedante al añublo del arroz.

El CIAT está desarrollando también su capacidad de entrenar a científicos de América Latina y el Caribe en la aplicación de la biotecnología a los estudios de agrobiodiversidad. En noviembre de 1994, se ofreció el primer curso internacional sobre biotecnología para la conservación y el uso de la agrobiodiversidad, en colaboración con la Organización de Estados Americanos (OEA), el Instituto Colombiano de Crédito Educativo y Estudios Técnicos en el Exterior (ICETEX) y el Fondo Colombiano de Investigaciones Científicas y Proyectos Especiales "Francisco José de Caldas" (COLCIENCIAS). A este evento asistieron 17 científicos de universidades, institutos nacionales de investigación y entidades de protección ambiental de 10 países latinoamericanos.

Además de ofrecer capacitación, el CIAT proporciona excelentes estudiantes a otras instituciones. Nos sentimos especialmente orgullosos de que, durante los últimos años, más de 15 de nuestros asistentes de investigación colombianos han obtenido becas para seguir sus estudios en universidades como Cornell, Ohio State, Purdue y Yale en los Estados Unidos, y en la Universidad de Strasbourg, en Francia.

Otros temas sobre biotecnología

En 1991, el CIAT estableció el Comité de Bioseguridad Institucional para supervisar todas las investigaciones del Centro en que intervengan técnicas de ADN recombinante y para hacer un seguimiento a la liberación de organismos transgénicos y a las pruebas que se hagan con ellos. Además, se organizó un taller regional sobre la bioseguridad en América Latina, con la colaboración del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), que fue financiado por DGIS y el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA). Los que participaron en este evento hicieron un llamado a los países andinos para que formen grupos de colaboración que desarrollen normas de bioseguridad y contribuyan a que la liberación experimental de organismos transgénicos sea controlada adecuadamente.

El Centro contribuye también al debate sobre los derechos de propiedad intelectual (DPI) y sobre políticas sobre el movimiento internacional de los recursos fitogenéticos. Bajo nuestra actual política de DPI, los productos y los métodos biotecnológicos desarrollados en el Centro son de dominio público. Esta política permite también hacer alianzas estratégicas con instituciones de países desarrollados y en desarrollo para facilitar el acceso de estos últimos a la información y a la tecnología. Estamos estudiando los Convenios de Transferencia de Materiales (MTAs) relacionados con todos los intercambios de productos y metodologías de carácter biotecnológico para garantizar su disponibilidad a las instituciones nacionales de los países en desarrollo.

CONTACTO EN CIAT: W. Roca, J. Tohme y J. Mayer



interés, los promotores de genes, los intensificadores de expresión y los genes marcadores, entre otros (Figura 5). Todos estos elementos se necesitan para una expresión adecuada cuando el gen modificado que se construye regrese a la planta o se transfiera a otra especie mediante *transformación genética*.

En primer lugar, los genes que serán introducidos deben aislarse, clonarse y modificarse. Al mismo tiempo, debemos desarrollar un protocolo reproducible y eficiente para la regeneración de plantas utilizando técnicas de cultivo *in vitro*. En el CIAT hemos empleado con éxito dos tecnologías: la transformación genética por intermedio de *Agrobacterium* y la transformación genética por medio del bombardeo de partículas (Figura 6). Con la primera tecnología hemos producido

plantas transgénicas de la leguminosa forrajera tropical *Stylosanthes guianensis* y hemos logrado avances importantes en yuca. Con la segunda tecnología hemos generado plantas transgénicas de arroz (Figura 7).



Figura 6. Los investigadores del CIAT están utilizando la biolística para transformar *Brachiaria*, frijol común y arroz. Esta tecnología contempla el uso de un acelerador de partículas PDS He/100 movido por helio, que bombardea los tejidos regenerativos con microproyectiles recubiertos de ADN.

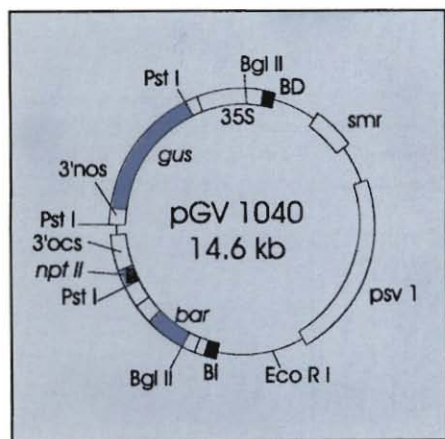


Figura 5. El plásmido pGV1040, un casete de transformación típica proporcionado por PGS de Bélgica. Es una de las construcciones genéticas utilizadas en el CIAT en la investigación sobre la transformación por intermedio de *Agrobacterium*. Entre sus bordes derecho e izquierdo (BD y BI), el plásmido contiene dos genes marcadores de selección: 1) el gen *bar* que codifica la resistencia a fosfotricina y 2) el gen *npt II* para resistencia a kanamicina. También posee un gen marcador reportero de la transformación, el gen *gus*, que codifica la enzima β -glucuronidasa.

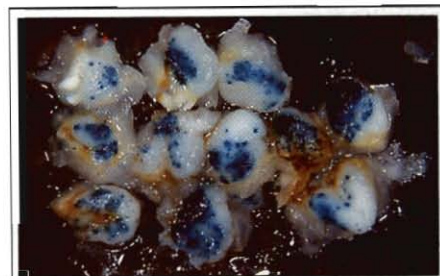


Figura 7. Arroz transgénico: arriba, el callo embriogénico derivado del embrión expresa el gen *gus*, como lo indican las manchas de color azul oscuro; abajo, las plántulas transgénicas (de la variedad de arroz CICA 8) regeneradas del callo expresan el gen *gus* en sus hojas y raíces.

Los análisis de RFLP, RAPD y AFLP pueden aplicarse también al ADN de plagas y patógenos de cultivos en un procedimiento llamado "*dactiloscopia*" del ADN. Dado que revela las diferencias, a nivel molecular, entre las razas de un patógeno altamente variable, este enfoque nos permite, por ejemplo, agrupar las razas en familias o linajes genéticamente diferentes. Esto, a su vez, debe ayudarnos a determinar relaciones genéticas y a desarrollar, con el tiempo, resistencia genética contra una enfermedad en forma más efectiva.

Los marcadores moleculares se emplean también efectivamente para facilitar el uso de germoplasma exótico en el mejoramiento de cultivos, para identificar la duplicidad en los bancos de germoplasma, para determinar las relaciones evolutivas entre las especies cultivadas y entre éstas y sus parientes silvestres, y para medir la diversidad genética.

Puntos de intervención genética

En la búsqueda de soluciones genéticas a problemas de producción y de utilización de plantas, no siempre es claro cómo o dónde podemos intervenir. Para utilizar el germoplasma eficientemente, debemos identificar los puntos de intervención genética mediante el esclarecimiento de los factores bioquímicos y de los mecanismos genéticos implicados en los caracteres fisiológicos y de calidad que tienen importancia (Figura 4) y en las interacciones que relacionan las plantas y los factores de estrés biótico. Luego podemos desarrollar ensayos bioquímicos y moleculares para detectar esos factores y, con el tiempo, aislar y clonar los genes responsables de éstos.

Ingeniería genética

Utilizando técnicas moleculares, podremos luego intentar modificar esos genes, ya sea para aumentar su expresión normal (sobreexpresión) o para inhibirla (regulación reductora). Esta tecnología emplea "casetes" de transformación, que constan de los siguientes elementos: la secuencia completa de codificación del gen estructural de

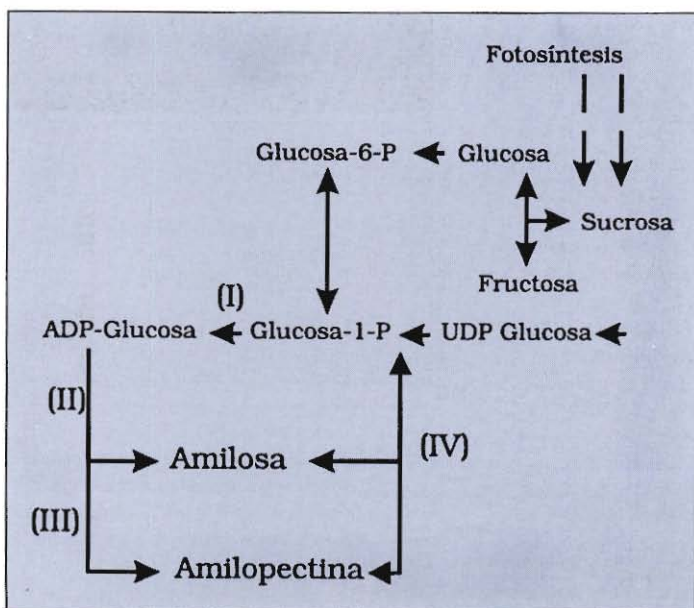


Figura 4. Cuatro puntos potenciales de intervención y manipulación genética en la biosíntesis del almidón de yuca: I, ADP-glucosa pirofosforilasa; II, Sintasa de almidón ligado al gránulo; III, Enzima de ramificación; y IV, Fosforilasa de almidón.

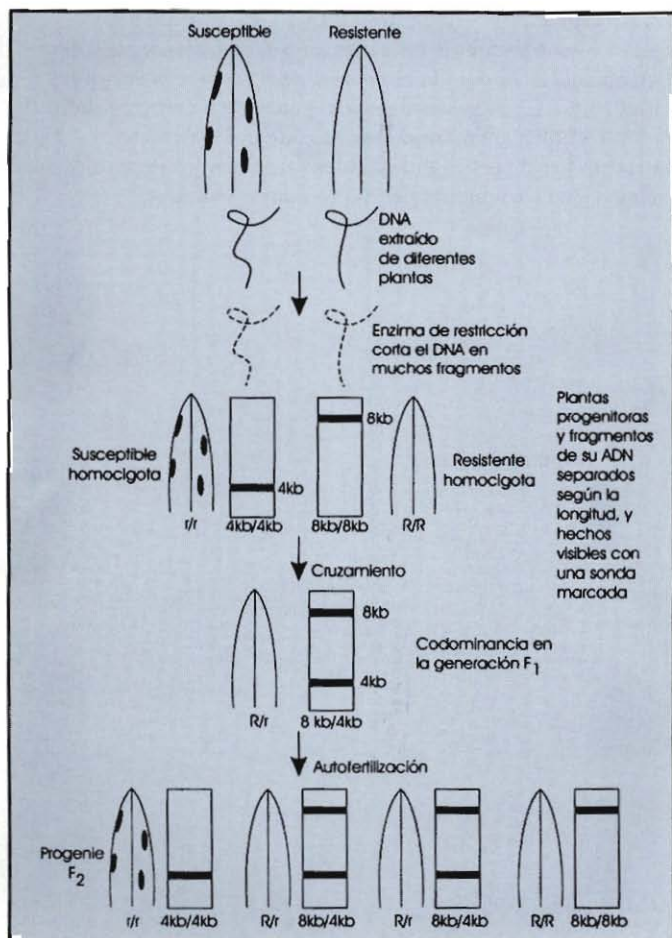


Figura 2. Diagrama que muestra la herencia de un marcador RFLP ligado con un gen de resistencia a una enfermedad. En este caso, la resistencia es dominante sobre la susceptibilidad. Puesto que el marcador tiene diferente tamaño en un progenitor resistente y en otro susceptible, se dice que es polimórfico. Tres de cada cuatro individuos F_2 de un cruzamiento entre estos progenitores muestran el fenotipo resistente. No obstante, tal como se aprecia en el patrón de bandas de RFLP, sólo uno lleva el genotipo (gen) de resistencia en condición homocigota.

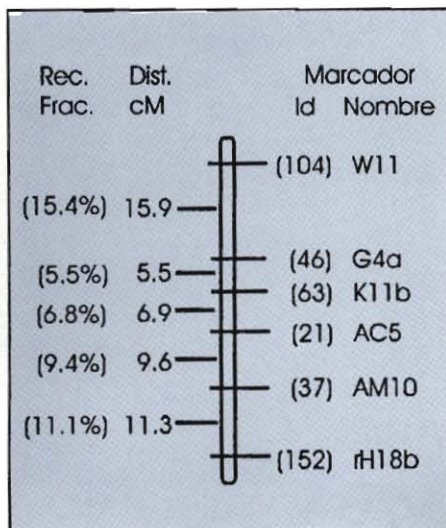


Figura 3. Un grupo de ligamiento del mapa molecular de la yuca. Se muestran el orden lineal y las distancias relativas entre los marcadores RFLP y los RAPD, determinados con el programa de computadora Mapmaker (con una confianza estadística de $LOD > 5.0$). Cada marcador mapeado es identificado por un número y un nombre (a la derecha). También se da la distancia entre los marcadores (a la izquierda), medida en centimorgans (cM), y el porcentaje correspondiente de recombinación.

Los genes que interesan al investigador se encuentran a menudo en parientes silvestres, en especies vegetales genéticamente más distantes o en microorganismos. Se abre así una perspectiva apasionante para la biotecnología: podremos enriquecer los acervos de genes introduciendo, en el genoma elegido, genes bien caracterizados tomados de fuentes antes inaccesibles, de manera que se evite el *arrastre de ligamientos*, es decir, la introducción de genes indeseables junto con los deseables; este efecto ocurre con frecuencia en los cruzamientos sexuales convencionales.

CONTACTO EN CIAT: W. Roca, J. Tohme y J. Mayer

Diciembre de 1994



Una nueva técnica molecular, desarrollada por investigadores de Holanda y denominada *polimorfismo de longitud de fragmentos de ADN amplificados* (AFLP, en inglés), combina características de las tecnologías de RFLPs y de RAPDs. La principal ventaja de los AFLPs es que se puede analizar un número mucho mayor de fragmentos de ADN en una sola corrida de electroforesis; por tanto, permite distinguir más precisamente los genotipos a nivel molecular.

Construcción de mapas genómicos moleculares

La nueva tecnología de ADN recombinante ha facilitado notablemente el desarrollo de los mapas genéticos. Anteriormente, los investigadores podían detectar sólo algunos eventos de recombinación genética mediante la observación de los marcadores fenotípicos de las plantas. Con los *marcadores moleculares*, las diferencias genéticas se pueden detectar de manera más completa y sencilla.

Por ejemplo, un mapa genómico de RFLPs puede desarrollarse mediante la utilización de numerosos marcadores que determinan la posición de fragmentos específicos en los cromosomas que se encuentran relacionados los unos con los otros. Esto se realiza mediante el *análisis de ligamientos*, en que se acepta que los marcadores que segregan juntos después de la meiosis están "ligados".

El número de esos marcadores es ilimitado; por tanto, es posible saturar literalmente el genoma vegetal y obtener así información acerca de todas las regiones de cada cromosoma de una especie vegetal. Los marcadores ligados a genes específicos nos permiten seguir la transferencia de estos genes marcados de una generación a otra, ya que ambos co-segregan a la progenie después de la meiosis (Figura 2).

Las principales ventajas de los marcadores moleculares son: pueden detectarse en cualquier estado del desarrollo de la planta y en cualquier tejido; el ambiente no los afecta; y son genéticamente codominantes (el caso de los RFLPs). En consecuencia, constituyen el medio confiable y directo para localizar segmentos cromosómicos y los genes contenidos en ellos, y para hacerles seguimiento en el proceso de mejoramiento genético.

El CIAT está desarrollando en la actualidad dos mapas moleculares, uno para yuca y otro para frijol tepari. También estamos utilizando mapas moleculares de frijol común y de arroz que fueron desarrollados, respectivamente, en las universidades de Florida y de Cornell, E.U. Los mapas moleculares comprenden conjuntos de marcadores moleculares, denominados *grupos de ligamiento* (Figura 3). Normalmente, el número de estos grupos equivale al número cromosómico base de la especie ($n = x$).

Otros usos de los marcadores moleculares

Además de ayudar a hacer mapas de los genomas vegetales, los RFLPs y RAPDs son bastante promisorios para facilitar la selección de plantas respecto a caracteres importantes. Mediante un procedimiento denominado *análisis masal de segregantes*, evaluamos muchos RAPDs para identificar los más cercanos a los genes que nos interesan. Aunque su práctica está aún restringida, la *selección ayudada por marcadores moleculares* debe simplificar tareas específicas de fitomejoramiento porque reduciría la necesidad de hacer en el campo evaluaciones extensivas de una progenie segregante.

LA CAJA DE HERRAMIENTAS DE LA BIOTECNOLOGÍA

Desde que se estableció la Unidad de Investigación en Biotecnología, en 1985, el CIAT ha ampliado rápidamente su capacidad de aplicar nuevas tecnologías. Este Informe presenta una revisión de las técnicas que están actualmente en uso en el Centro.

Tecnologías de marcadores genéticos moleculares que se aplican en el CIAT

Una de estas técnicas comprende el *polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción del ADN* (RFLP, en inglés) que resultan de la digestión del ADN por *enzimas de restricción*. Una enzima de restricción que puede identificar una secuencia específica de nucleótidos o par de bases, corta el ADN dondequiera ocurra esa secuencia. Los fragmentos de ADN que resultan de esos cortes se separan en un gel de electroforesis, se transfieren a una membrana de nilón y se colocan en una solución de hibridación junto con una *sonda*. Esta es un fragmento de ADN clonado que fue generado mediante la duplicación del ADN en un organismo vector. La sonda puede ser radioactiva o estar marcada con un compuesto no radioactivo. En la solución de hibridación, la sonda se une a los fragmentos de ADN que tengan una secuencia complementaria. La posición de la sonda se determina mediante autorradiografía o tinción, en la que aparece como una banda oscura.

Los métodos más recientes para detectar diferencias genéticas a nivel molecular se basan en la *amplificación de ADN mediante la reacción en cadena de la polimerasa* (PCR, en inglés) (Figura 1). Mediante esta tecnología se sintetizan millones de copias de un fragmento dado de ADN, usando secuencias de ADN relativamente cortas llamadas *oligonucleótidos iniciadores*; éstos pueden corresponder a partes de genes conocidos o a posiciones específicas (*loci*) en un cromosoma, o pueden ser de origen desconocido. Un fragmento de ADN sintetizado con este último tipo de iniciador se denomina *ADN polimórfico amplificado al azar* (RAPD, en inglés).

Las dos cadenas del ADN del organismo objeto de estudio se abren por calentamiento. A medida que se enfría este ADN, los iniciadores de oligonucleótidos se ligan a ambos extremos de cada cadena. La enzima Taq polimerasa agrega nucleótidos hasta que se haya producido una nueva copia del modelo original. Se necesitan cerca de 30 ciclos para producir un millón de copias del fragmento original de ADN, lo cual se obtiene en pocas horas de amplificación usando aparatos llamados "termocicladores".



Figura 1. Un termociclador permite hacer millones de copias de ADN partiendo de una muestra pequeña del material mediante la metodología de PCR.

Se produce una cantidad tan grande de ADN que fácilmente se puede observar mediante electroforesis. Dos ventajas clave tiene esta tecnología: es altamente sensible a diferencias genéticas a nivel molecular y evita el uso de materiales radioactivos potencialmente peligrosos y de enzimas de restricción costosas. Los RAPDs se utilizan comúnmente en el CIAT para el mapeo de genomas, en la marcación de genes, y en la dactiloscopia genética.