

**CIAT**

64786

COLECCION HISTORICA

BIOTECNOLOGIA: OPORTUNIDADES PARA LA INVESTIGACION  
AGRICOLA EN AMERICA LATINA\*

W. M. Roca  
CIAT, Cali, Colombia

CIAT  
BIBLIOTECA  
101358

INTRODUCCION

La biotecnología ha existido por mucho tiempo, ej: la producción de vinos, cervezas, solventes y drogas mediante la manipulación de microorganismos y productos vegetales. Lo que distingue a las tecnologías emergentes, o nueva biotecnología, es el uso de conocimientos del interior de las células para dirigir o manipular los productos de las células (1). Progresos en la biología celular y molecular han abierto posibilidades de aplicación, impredecibles hace una década, con relevancia para todas las actividades de la productividad; energía, industria, salud y alimentación. Tecnologías in vitro como el cultivo de células y tejidos, anticuerpos monoclonales y DNA recombinante ya empiezan a impactar en las actividades agrícolas. A pesar de que los procesos básicos de la replicación, transcripción y traslación de la información genética son comunes para todas las formas de vida, es necesario que las biotecnologías que se desarrollen sean relevantes para la agricultura de los países en desarrollo.

Numerosas oportunidades se relacionan directamente a las necesidades de los países en desarrollo, ej. modificación de plantas agrícolas para tolerar ambientes adversos, para aumentar la resistencia a las enfermedades, para fijar nitrógeno más eficientemente; aumentar el valor nutritivo de los productos agrícolas; realizar diagnóstico rápido de las enfermedades; producir compuestos útiles por bioconversión, etc. Sin embargo, el éxito dependerá de su utilización apropiada, a corto y largo plazo, para comprimir el tiempo, espacio y costos dentro de estrategias tradicionales de mejoramiento, teniendo que ser por necesidad un enfoque multidisciplinario. Los fitomejoradores y agrónomos deben ser los receptores finales de estas tecnologías, y la utilidad de sus productos

\* Documento preparado para su presentación en el Taller BID/CIMMYT de Instituciones de Investigación Agrícola de América Latina. CIMMYT, Mexico, Septiembre 1984.

deberá ser demostrada en el campo.

El propósito de este documento es discutir las oportunidades que ofrece la biotecnología para la investigación agrícola y su aplicación en los programas nacionales de investigación y los centros internacionales y regionales de investigación agrícola que existen en América Latina. La colaboración entre estas instituciones en la investigación y la transferencia de tecnología, permitirán hacer llegar los beneficios de la biotecnología a los grupos más necesitados. Se analizará brevemente el estado actual de las tecnologías más importantes, se presentará la situación actual en América Latina y se sugerirán posibles áreas de investigación, y estrategias para la colaboración dentro y fuera de la región.

#### ESTADO ACTUAL DE LA BIOTECNOLOGIA

Las biotecnologías con mayor potencial de aplicación en la agricultura son: cultivo de células y tejidos, DNA recombinante, anticuerpos monoclonales, bioconversión y producción de metabolitos útiles.

#### CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS

##### 1. Propagación clonal in vitro

El cultivo de tejidos constituye la ruta por la cual deben pasar todas las formas de manipulación genética en transición desde el laboratorio hasta el campo. Por lo tanto, la capacidad de regenerar plantas por medio del cultivo de células y tejidos es necesaria para la utilización de la mayoría de las biotecnologías en la agricultura.

La regeneración de plantas puede ocurrir por vías no adventicias, ej. proliferación de yemas axilares a partir del cultivo de meristemas o ápices caulinares; vías adventicias, ej. diferenciación de órganos directamente de porciones de la planta cultivada in vitro, o de masas celulares o callos inducidos a partir de segmentos de la planta; y vía embriogénesis de células somáticas, la cual consiste en la diferenciación de formas embrionales a partir de células individuales de porciones aisladas de la planta o de callos.

El número de especies propagables in vitro en 1968 fué aproximadamente de 30; más de 300 en 1978; y se espera un incremento de

10 veces para la próxima década (9). Existen esquemas para la propagación masiva in vitro. La embriogénesis somática ofrece gran potencial de propagación, además de la posibilidad de producir "semillas artificiales" encapsulando los embriones en geles. A pesar que la propagación in vitro de especies consideradas recalcitrantes está siendo desarrollada, ej. coníferas, mango, palmas, caucho, etc. el control de la regeneración de plantas económicamente importantes permanece como uno de los mayores limitantes para la utilización efectiva de la nueva biotecnología.

Eliminación de enfermedades. Clones libres de enfermedades han sido recuperados por medio del cultivo de tejidos de aproximadamente 55 especies cultivadas. La técnica es válida para todos los patógenos, pero es especialmente útil para la eliminación de virus y viroides de plantas que se propagan vegetativamente. El método más utilizado consiste en cultivar el meristema apical del vástago acompañado de 1-2 primordios. Con frecuencia se aplica la termoterapia, o quimioterapia, a las plantas infectadas o a los cultivos in vitro (12). Dado que no todas las plantas regeneradas in vitro necesariamente estarán libres de virus, el uso de técnicas virológicas para probar la ausencia del virus es importante. El cultivo de tejidos ha sido utilizado para rehabilitar variedades locales que habían perdido vigor y rendimiento, ej. papa, fresa, frutales, yuca, etc. El rendimiento de dos cvs. de yuca ha sido doblado y triplicado, respectivamente como resultado del cultivo de tejidos de plantas infectadas por un virus (12) y como se indica en el Cuadro 1, el rendimiento de la variedad "secundina" aumentó de 9 a 25 ton/ha, y se mantuvo estable al cabo de tres años; pero el rendimiento de un híbrido cayó en el tercer año de cultivo en la misma región. Interesantemente, aumentos de rendimiento de 30 y 50% en dos cvs de yuca, respectivamente han resultado de la propagación in vitro de plantas aparentemente sanas (12). Estos resultados demuestran el potencial de la propagación in vitro para la producción de "semilla" básica de cultivos con propagación vegetativa.

CUADRO 1. Rendimiento de la yuca (cv. Secundina) en la costa norte de Colombia después de la erradicación de un mosaico viral por cultivo de tejidos y comparación con el híbrido CM 342-170.\*

Clon	Ciclo	Raíces frescas (t/ha)	Almidón (t/ha)	Estacas (No./planta)
Secundina	1er. año	25.1 a	7.1 a	10 a
	2o. año	23.0 a	6.8 a	10 a
	3er. año	22.0 a	5.6 a	9 a
	Control**	8.9 b	2.1 b	3 b
CM 342-170	1er. año	34.8 a	7.9 a	14 b
	2o. año	36.2 a	8.4 a	10 ab
	3er. año	15.1 b	3.1 b	6 b

\* Adaptado de: Informe Anual CIAT, Patología Yuca, 1984.

\*\* Material de siembra convencional, sin cultivo de tejidos.

Conservación e intercambio de germoplasma. Los clones libres de enfermedades pueden ser usados para el intercambio de germoplasma mediante técnicas in vitro, minimizando así los riesgos de diseminación de plagas y enfermedades. Además, colecciones de germoplasma pueden ser conservadas in vitro, con reducción del costo de mantenimiento en el campo, así como del riesgo de pérdidas por plagas y enfermedades, cambios climáticos y problemas de suelos. Una forma de conservación in vitro simple consiste en minimizar la tasa de crecimiento de los cultivos mediante la temperatura o por modificación de la composición del medio de cultivo. Idealmente, aunque todavía a nivel experimental, la conservación en nitrógeno líquido debe proporcionar la máxima estabilidad de los materiales a largo plazo.

## 2. Cruzamientos amplios.

La excisión y cultivo de embriones inmaduros en medios definidos ha sido utilizada para obtener plántulas viables de cruzamientos interespecíficos o intergenéricos, los que de otra manera fracasarían debido a la muerte del embrión. Mediante el cultivo de embriones,

además de cultivos de óvulos y de ovarios, se han obtenido híbridos de más de 50 cruzamientos (10). Otras técnicas como la fertilización de óvulos in vitro y la implantación de embriones en endospermos normales también puede usarse para la obtención de híbridos.

La inducción de callo, usando el embrión híbrido, seguida de la regeneración de plantas puede ser una vía para la producción rápida de plantas híbridas; además el re-ordenamiento del material genético, que puede ocurrir en la fase de callo, provocará la eliminación de genes indeseables y contribuirá así a la estabilidad de los caracteres transferidos.

### 3. Haploidía

La incorporación de haploides en programas de mejoramiento es deseable para conseguir homocigosis rápida; incorporar y fijar rápidamente genes nuevos después de la recombinación sexual o después de la mutagénesis; aumentar la eficiencia de la selección; minimizar la retención de material genético deletéreo; además, la haploidía podría abrir la posibilidad de producir semilla híbrida F1 en especies de polinización cruzada y heterocigotas.

El método más común para producir haploides es el cultivo de anteras conteniendo polen inmaduro. La regeneración de plantas, vía embriogénesis o vía callo y organogénesis, depende del genotipo, el estado de desarrollo de los microsporas, el medio de cultivo y otros pre-tratamientos a las yemas o a las anteras. La formación de callo puede conducir a cambios en el número de cromosomas de las plantas regeneradas. El cultivo de anteras ha sido utilizado para producir haploides de aproximadamente 47 especies, ej. arroz, avena, cebada, trigo, centeno, maíz, triticale, arveja, papa, etc.

Otros sistemas de haploidía son: la eliminación de cromosomas que ocurre durante el cultivo in vitro de embriones híbridos interespecíficos, ej. cebada, con H. bulbosum; por partenogénesis, ej. después del cruzamiento de papa con S. phureja; uso de marcadores genéticos, ej. color de la semilla en maíz; inducción genética, ej. gen ig en maíz, y gen hap en cebada (9). En la práctica, haploides han sido incorporados en programas de mejoramiento de papa, trigo, Brassica y arroz.

En América Latina, el mejoramiento de arroz para condiciones de secano, suelos infértiles y altamente ácidos es un proceso que puede tomar 10 años. Líneas homocigotas producidas por cultivo de anteras de plantas híbridas F1 pueden ser evaluadas rápidamente por los fitomejoradores; esto reduciría el proceso de mejoramiento en 4-5 generaciones, con enorme ahorro de tierra, mano de obra e insumos. Material homocigota de arroz ha sido seleccionado por su alta tolerancia a toxicidad por aluminio, enanismo, precocidad y resistencia a insectos, y evaluaciones de estas líneas en los Llanos Orientales de Colombia, han corroborado esos atributos.

Un requisito para el uso del cultivo de anteras en programas de mejoramiento es la producción de un número alto de líneas. La regeneración depende en gran medida del genotipo, pero los híbridos casi invariablemente presentan tasas más altas que los padres. Los resultados con arroz indican que los tejidos de la antera no intervienen en la producción de callo, y que aproximadamente el 50% de las plantas regeneradas de los callos diploidizan espontáneamente, y por lo tanto son homocigotas. Una forma de aumentar la producción de callo es cultivar las anteras flotando en medio líquido (16). En esta forma, cada callo proveniente de una microspora puede ser aislado y cultivado como línea genéticamente distinta. Cada callo puede a su vez regenerar plantas fenotípicamente distintas. Esta variación, y aquella que puede ocurrir en callos obtenidos de líneas puras ha sido llamada variación gametoclinal (Fig. 1). El medio líquido ha aumentado la inducción de callos hasta 100 veces de lo que normalmente se obtiene en medio sólido.

#### 4. Variación somaclonal

Variación somaclonal es el incremento de la variabilidad genética en plantas regeneradas por cultivo de tejidos. En las plantas regeneradas se ha observado variaciones de caracteres monogénicos y poligénicos, así como cualitativos y cuantitativos, ej. avena, trigo, caña de azúcar, maíz, tomate, papa, arroz, alfalfa y tabaco. La variación fenotípica de los somaclones puede resultar de cambios epigenéticos o genéticos. La variación epigenética proviene de alteraciones en la expresión génica, la cual no se transmite sexualmente pero puede ser mantenida vegetativamente. La variación genética se

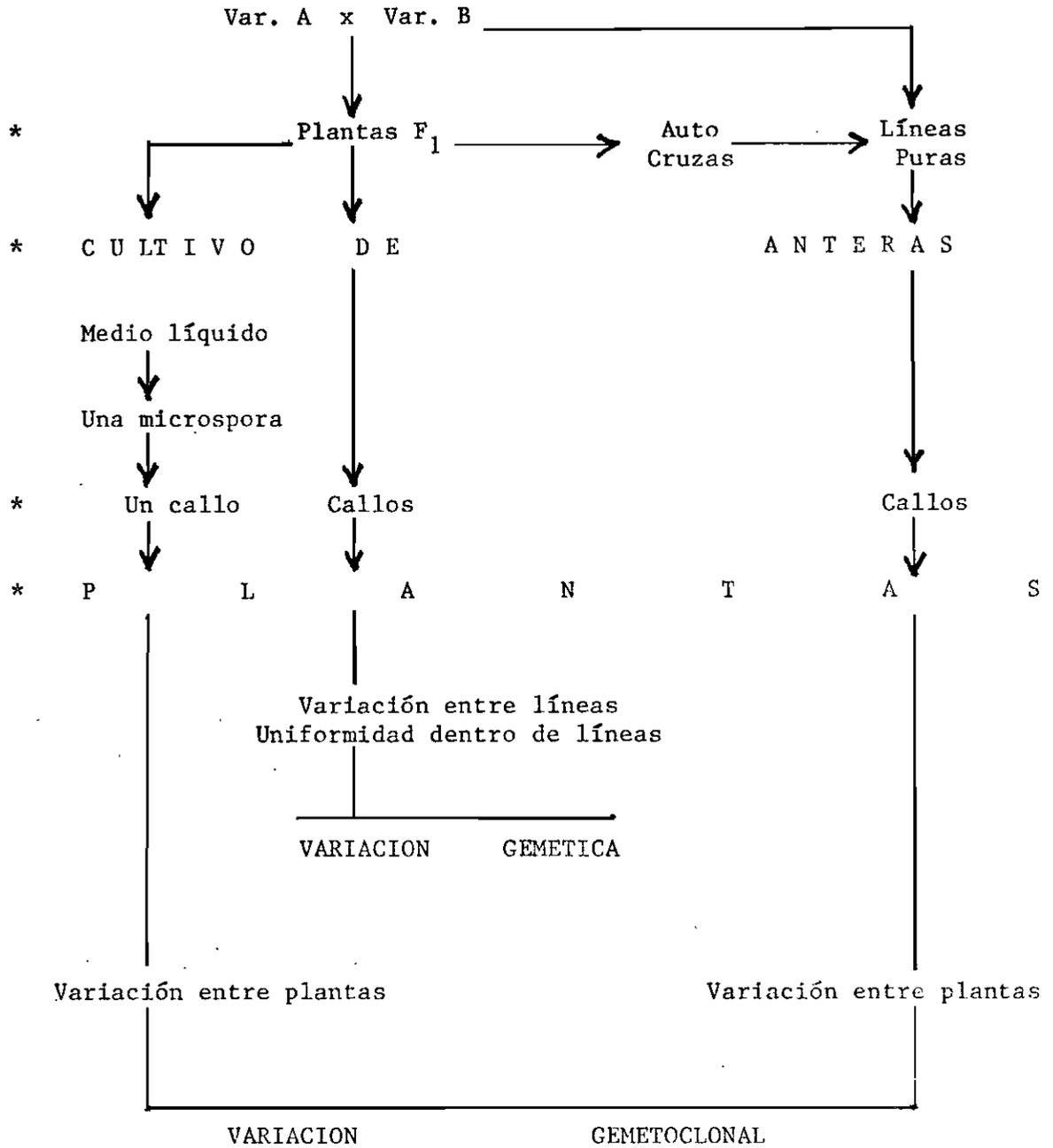


Fig. 1. El cultivo de anteras como fuente de variación genética (recombinación genética) y gametoclonal (recombinación + clonal); ej. arroz.

\* Sitios de aplicación de estrés, ej. aluminio.

puede deber a cambios en la estructura primaria del DNA, o a fenómenos de inversión, deleción o sustitución en el DNA nuclear o citoplasmático; también se puede deber a cambios en la estructura de los cromosomas como inversión y traslocación (2). Los variantes genéticos o mutantes deben cumplir con las leyes de la herencia; este análisis debe realizarse en la primera o segunda progenie sexual de las plantas regeneradas.

En maíz, se han seleccionado somaclones fértiles con resistencia a la toxina T, a partir de plantas estériles citoplasmáticas y susceptibles a la toxina; este cambio ha sido asociado a la pérdida de un fragmento específico de DNA mitocondrial; igualmente, en arroz y trigo, se han seleccionado somaclones de altura de planta, precocidad, tamaño, y número de granos, tamaño de la panícula, etc. (14).

La variación somaclonal puede ser útil para generar variabilidad útil en cvs adaptados sin necesidad de la hibridación; además, la variación somaclonal puede ayudar a aumentar la introgresión de genes en cruzamiento amplios.

Una limitación actual de la técnica es que el fenómeno no puede ser controlado por lo que es necesario regenerar números altos de somaclones para la selección.

##### 5. Aislamiento de mutantes

Las técnicas in vitro permiten la selección de mutantes que pueden condicionar cambios agronómicos útiles. Comparado con la selección convencional, el aislamiento de mutantes in vitro permite aplicar una intensidad de selección muy alta a un número muy grande de individuos, ej. un frasco con 100 ml de medio puede contener  $5 \times 10^4$  células en forma de callo,  $5 \times 10^6$  células en suspensión, o un gramo de hoja puede producir  $2-4 \times 10^6$  protoplastos.

A la fecha, se han seleccionado 51 fenotipos celulares de 20 especies, pero sólo se han regenerado 25 fenotipos de 8 especies; y aún en sólo 9 casos se ha realizado el análisis genético de las plantas regeneradas (6).

La técnica ha sido usada para la selección de resistencia a patotoxinas, ej. tizón tardío de papa, toxina T de maíz, y alternaria de tabaco; resistencia al crecimiento de hongos, ej. esporas de Phoma en Brassica; tolerancia a la salinidad, ej. arroz, tabaco; tolerancia a la

toxicidad por aluminio, ej. tomate; resistencia a herbicidas, ej. tabaco, papa; resistencia al frío, ej. zanahoria, tabaco; incremento de aminoácidos libres, ej. lisina y treonina en granos de maíz debido a cambios en la retroinhibición enzimática; aumento de aminoácidos en tejidos vegetativos, ej. tabaco, zanahoria y cebada; resistencia a antibióticos, ej. tabaco, zanahoria (2, 6).

La selección in vitro está limitada a caracteres controlados por genes simples y está restringida a especies con regeneración eficiente a partir de poblaciones uniformes de células o protoplastos. Además, en principio el método puede ser aplicado sólo cuando hay correlación entre los caracteres de la planta y la respuesta de las células in vitro. La aplicación de estreses a la planta, seguido del cultivo y regeneración de células mutadas, podría ser una estrategia interesante.

#### 6. Fusión de protoplastos

La fusión de protoplastos es otro mecanismo para lograr cruzamientos amplios, especialmente cuando la incompatibilidad sexual impide el cruzamiento convencional. Además de permitir la recombinación de genes nucleares, la fusión de protoplastos, a diferencia del cruce sexual, permitiría la recombinación y segregación de genes citoplasmáticos.

Aparentemente no existen barreras para la fusión de protoplastos, sin embargo la integración de los genomas parentales puede ser nula, parcial o total. Además, es necesario tener un sistema poderoso de selección que permita aislar las fusiones híbridas en cantidades suficientes para el análisis genético.

Con frecuencia ocurre la fusión de citoplasmas y la degeneración de uno de los núcleos, lo cual lleva a la formación de híbridos citoplasmáticos o cíbridos. La eliminación de los núcleos parentales puede ser realizada por micromanipulación con rayos laser o con radiación. Este mecanismo ofrece potencial para la transferencia de genes citoplasmáticos, ej. tolerancia a herbicidas, resistencia a ciertas enfermedades, esterilidad masculina. Se han obtenido plantas cíbridas con resistencia a atrazina y esterilidad citoplasmática masculina entre el núcleo de Raphanus y el citoplasma de Brassica.

Una limitación importante para el uso de la fusión de protoplastos es la dificultad de regeneración a partir de las células o colonias híbridas. A la fecha, de 13 híbridos somáticos intraespecíficos regenerados, se ha obtenido plantas fértiles en sólo 5 casos; y de 28 interespecíficos, se ha obtenido plantas fértiles en 15 casos; la gran mayoría pertenecientes a la familia Solanaceas (5). Debido a la alta sensibilidad de los protoplastos a factores del medio, estos podrían ser usados como detectores de contaminantes en el ambiente.

#### DNA RECOMBINANTE

Las técnicas in vitro para manipular el DNA, permite purificar y caracterizar segmentos específicos de DNA, abriendo de este modo la posibilidad de modificación genética dirigida de las plantas, proceso que se ha llamado ingeniería genética.

La ingeniería genética, que involucra atécnicas del DNA recombinante, consiste de varias etapas: caracterización de genes; aislamiento de secuencias específicas de DNA; clonaje del DNA; transferencia del DNA a un receptor apropiado y replicación; regeneración de plantas a partir del receptor transformado, ej. células, protoplastos, callos; expresión del gen en la planta adulta y transmisión sexual del gen (2).

##### 1. Caracterización de genes

Idealmente, el carácter escogido para manipular debe traducirse en una sustancia química específica y debe ser controlado por uno o pocos genes. Actualmente no es posible manipular caracteres multigénicos. Entre los genes importantes que han sido caracterizados se encuentran: la enzima ribulosa difosfato carboxilasa oxigenasa, importante en fotosíntesis; proteína de almacenamiento de semillas de cereales y leguminosas y de tubérculos; varios genes de la fijación de N; tres genes de nitrogenasa de Anabaena; los genes de nodulación de Rhizobium. La falta de genes caracterizados de importancia económica es uno de los mayores limitantes en la ingeniería genética, pero el progreso de la biología molecular es tan rápido que secuencias de otros genes estarán disponibles pronto.

## 2. Aislamiento del DNA

La técnica general para aislar las secuencias del DNA que codifican un gen consiste primero, en aislar el RNA mensajero (m RNA) de tejidos que sintetizan cantidades grandes del producto génico; luego se construye un DNA complementario (cDNA) al m RNA por medios enzimáticos.

## 3. Clonaje del DNA

Al tratar genomas nucleares o citoplasmáticos con enzimas de restricción, el DNA es cortado en sitios específicos resultando fragmentos de DNA de tamaño variable. Estos fragmentos pueden ser almacenados indefinidamente en vectores apropiados, en los que se ligan a fragmentos del DNA del vector; esto se ha llamado una genoteca.

El cDNA puede ser usado como sonda para detectar y aislar secuencias del DNA del gen estructural. Para esto, los fragmentos de DNA de la genoteca se separan electroforéticamente y se inmovilizan en una matriz a la cual se aplica la sonda radioactiva. La complementación de las secuencias nucleótidas de la sonda y del gen se visualiza por autoradiografía.

El clonaje del DNA de plantas es un método rutinario siempre y cuando los genes hayan sido caracterizados.

## 4. Tranferencia del DNA

El DNA debe ser introducido en la célula de tal forma que la información genética pueda ser expresada; para esto, el DNA debe pasar a través de todos los sistemas de vigilancia celular hasta llegar el núcleo. Varias estrategias de transferencia existen: microinyección directa a núcleos de células o protoplastos, co-cultivo con protoplastos, co-cultivo con liposomas; uso de virus conteniendo DNA o plásmidos como vectores.

Los plásmidos Ti y Ri de Agrobacterium son los vectores preferidos para transferir genes a dicotiledoneas. La secuencia del DNA que se desea transferir se liga al T-DNA del plásmido y, después de infectar las células de la planta con la bacteria, el T-DNA se une covalentemente al DNA nuclear. Además, recientemente ha sido posible mutar el T-DNA y eliminar su efecto oncogénico (4).

### 285. Identificación de las células transformadas

Desde que la frecuencia de transformación es generalmente muy baja, es necesario tratar poblaciones grandes de células y utilizar sistemas eficientes de selección. La disponibilidad de marcadores genéticos es por lo tanto muy importante.

### 6. Regeneración de plantas y expresión de los genes

La regeneración de plantas a partir de las células transformadas es de crucial importancia para la utilización práctica de la ingeniería genética. No es suficiente que se demuestre la transformación a nivel celular, sino que el carácter transferido debe expresarse a nivel de planta adulta y en la progenie sexual. Además, la expresión de los genes debe ocurrir en el sitio (tejido u órgano), y estado de desarrollo de la planta correctos.

La transformación de cultivos alimenticios importantes mediante las técnicas del DNA recombinante no está muy distante de ser una realidad, por lo menos en el caso de caracteres monogénicos. Hasta ahora, se ha trabajado con sistemas modelos, ej. tabaco, zanahoria. Transferencias de genes para tolerancia a antibióticos, usando plásmidos Ti como vectores, mediante la infección de tejidos o el co-cultivo con protoplastos, han resultado en la expresión y transmisión sexual de la resistencia en las plantas regeneradas (8). También se ha logrado introducir el gen que codifica la proteína de semilla faseolina, en frijol, a plantas de tabaco usando el plásmido Ti.

Los siguientes, son algunos de los temas de la ingeniería genética de plantas que requieren mayor estudio y desarrollo: identificación y caracterización de genes de importancia económica; regulación y expresión génica en relación al desarrollo y la especificidad tisular; manipulación de genes estructurales ligados muy debilmente o que segregan independientemente; transferencia de caracteres poligénicos; desarrollo de vectores para monocotiledoneas; y regeneración eficiente de plantas a partir de las células transformadas.

Un gran desafío para la ingeniería genética será lograr la delicada combinación de numerosos genes, cada uno con efectos de pequeña magnitud, que el fitomejorador busca usando métodos tradicionales. Una

aplicación útil de las técnicas modernas podría ser la introducción de genes a cvs adaptados sin perturbar la base genética adaptada del cv.

Entre los caracteres que podrían manipularse por medio del DNA recombinante, el contenido de aminoácidos en proteínas de almacenamiento de semilla, o de tubérculos, merece consideración. Se podrían sintetizar fragmentos cortos de DNA in vitro, que codifiquen proteínas con alto contenido de aminoácidos esenciales, y ligarlos a plásmidos de Agrobacterium para infectar plantas o tejidos. La regeneración de plantas a partir de estos tejidos es un paso necesario. Esta es una posibilidad en frijol, cuyos genes para faseolina han sido caracterizados; estos se transmiten como una sola unidad Mendeliana (2). También sería posible manipular igualmente las proteínas de la papa, camote, cebada, trigo y soya; o la introducción de genes para proteínas a la yuca. En caso de no contar con técnicas de regeneración, otras estrategias de transformación podrían ensayarse. La microinyección de DNA a polen en germinación, o a óvulos en desarrollo, es una posibilidad. El remojo de polen en germinación con soluciones de fragmentos pequeños de DNA, antes de la polinización, es otra técnica interesante.

Otros caracteres potencialmente manipulables son: tolerancia a metales pesados, a salinidad; resistencia a herbicidas, a patotoxinas y a virus. La manipulación de genes responsables de la fijación de N es una tarea a largo plazo debido a la compleja regulación genética del proceso.

Por último, un carácter muy difícil de mejorar por los métodos tradicionales es el potencial de rendimiento de los cultivos. La biotecnología puede ofrecer algunas estrategias para la transferencia de genes de especies silvestres. A corto plazo, el cultivo de embriones híbridos y el cultivo de anteras de plantas híbridas  $F_1$ ; a mayor plazo, la introducción de genes usando técnicas del DNA recombinante.

#### Otros usos del DNA recombinante

Usando el RNA del virus como patrón, se puede construir un cDNA; estos pueden ser usadas como sondas moleculares de gran especificidad y sensibilidad para detectar los ácidos nucleicos de virus o viroides a través de la formación de híbridos RNA-DNA (7). Esta técnica está

siendo usada para seleccionar germoplasma resistente a virus, o para detectar plantas libres de virus. El desarrollo de esta técnica es rápido, una vez que se tiene el virus purificado. Un problema actual es el requerimiento de radioactividad; sin embargo, hay progreso en el desarrollo de sondas moleculares no radioactivas.

En forma similar, sondas de DNA pueden construirse de fragmentos de DNA que codifican caracteres específicos. Las sondas pueden utilizarse para seleccionar germoplasma con genes introducidos mediante cruzamientos amplios (11).

#### ANTICUERPOS MONOCLONALES

El hibridoma, producto de la fusión de células cancerosas con células hiperinmunizadas con patógenos, productoras de anticuerpos, tiene la capacidad de secretar anticuerpos altamente específicos, indefinidamente, en cultivo (13). Los anticuerpos monoclonales pueden ser utilizados para detectar patógenos, particularmente virus, cuando la serología no es suficientemente específica o no está disponible en cantidades suficientes. Los anticuerpos monoclonales pueden ser usados para la diagnosis de enfermedades, rápida y de bajo costo, en programas de certificación de semilla o en trabajo de cuarentena.

#### BIOCONVERSION Y PRODUCCION DE METABOLITOS UTILES

La utilización total de la planta, no sólo los frutos o los granos, mediante biconversión es una posibilidad futura interesante. La separación de la biomasa vegetal en fracciones de celulosa, hemicelulosa y lignina podría proveer material para bioconversión. Posibles productos son proteína microbial, solventes y químicos. La utilización de la lignina en la agricultura debe investigarse; así como la fermentación de celulosa. Estas tecnologías han recibido gran atención en algunos países desarrollados como Japón.

La producción de metabolitos útiles, mediante la biotecnología moderna es una posibilidad más interesante para países en desarrollo. La extracción de ciertos compuestos, ej. pigmentos, alcaloides, sustancias antimicrobiales, insecticidas, etc. los cuáles ocurren naturalmente en especies tropicales nativas, han ocupado la atención de científicos por muchos años. Ahora existe la posibilidad de cultivar

las células de estas especies en gran escala usando bioreactores para extraer los compuestos. Esta alternativa puede ser útil sobretodo cuando la especie crece en lugares remotos, en poblaciones pequeñas o cuando es difícil de propagarse en el campo. A diferencia de las biotecnologías del DNA recombinante, en este caso la regeneración de plantas no es necesaria; además, para el futuro se abre la posibilidad de modificación genética para producir estructuras químicas diferentes. Sin embargo, un problema que puede limitar esta biotecnología es que las células vegetales, a diferencia de los microbios, crecen mucho más lentamente; la conservación de líneas celulares específicas puede ser difícil aunque la criogenia podría ofrecer soluciones en el futuro. Por estos motivos el cultivo de células vegetales podría ser usado más que todo para la biosíntesis de productos de alto valor unitario.

#### SITUACION DE LA BIOTECNOLOGIA EN AMERICA LATINA

##### INSTITUTOS NACIONALES

El Cuadro 2 muestra el número de institutos nacionales de Latinoamérica en los que se conduce investigaciones biotecnológicas de relevancia actual o potencial para la agricultura. Esta información proviene de 70 institutos en 11 países, lo que proporciona una idea clara, aunque no completa, de la situación actual en América Latina. Se está preparando un directorio latinoamericano de biotecnología el que incluirá a las personas que se entrenan en institutos desarrollados.

La propagación clonal in vitro, tecnología que ha alcanzado aplicación práctica, se utiliza principalmente en los Institutos Nacionales de Investigación Agrícola (INIA), ej. INTA en Argentina, INIPA en el Perú, etc. y en los Institutos de Educación Superior (IES), ej. Universidades para la eliminación de enfermedades de cultivos con propagación vegetativa, árboles frutales y forestales. Como se puede predecir, la investigación en tecnologías más modernas, ej. variación somaclonal, cultivo de protoplastos, DNA recombinante, además de estudios básicos sobre bioquímica y morfogénesis, está concentrada en los Institutos de Investigación Básica (IIB), ej. SENA en Brasil, CENIC en Cuba, etc. y los IESs. Sin embargo, tecnologías de gran utilidad, como el cultivo de embriones y la haploidía, no han sido suficientemente

  
 BIBLIOTECA

CUADRO 2. Investigaciones en biotecnología agrícola en Institutos Nacionales de 11 países Latinoamericanos (Agosto, 1984).

Tecnologías	No. de Países	No. de Institutos*		
		INIA	IES	IIB
Propagación clonal <u>in vitro</u>	11	21	24	6
Cruzamiento amplios (cultivo de embriones)	2	2	1	1
Haploídia (cultivo de anteras)	3	-	3	-
Variación somoclonal y selección <u>in vitro</u>	5	1	3	7
Cultivo y fusión de protoplastos	4	-	2	3
DNA recombinante	7	2	2	5
Biosíntesis (cultivos celulares)	2	-	2	2
Estudios bioquímicos (cultivos celulares)	5	-	4	6
Morfogénesis <u>in vitro</u>	4	-	4	3

\* INIA = Institutos Nacionales de Investigación Agrícola  
 IES = Instituciones de Educación Superior  
 IIB = Institutos de Investigación Básica

adaptados en los INIAs.

Entonces, se observa la siguiente división de labor. Los IIBs y los IESs con las tecnologías emergentes y, por lo tanto menos desarrolladas; y los INIAs con aquellas que han alcanzado aplicación práctica. La excepción ocurre en dos INIAs, donde se conduce trabajos relacionados con el DNA recombinante.

En el área molecular se pueden identificar tres IIBs y un IES con potencial para investigar en tecnologías de DNA recombinante para plantas. Obviamente lo que falta es una simbiosis entre los INIAs con los IIBs y los IESs, mediante proyectos de investigación colaborativos, para orientar los estudios básicos de estos últimos hacia problemas agrícolas relevantes.

#### CENTROS INTERNACIONALES DE INVESTIGACION AGRICOLA

Los INIAs y los Centros Internacionales de Investigación Agrícola (CIIA) conforman un sistema para investigación agrícola. Ambos colaboran para elevar la productividad y la producción de cultivos básicos y ganado en América Latina. Esta colaboración debería continuar en el campo de la nueva biotecnología.

El Cuadro 3 presenta el estado de desarrollo de varias tecnologías en los CIIAs de América Latina, CIAT, CIMMYT, CIP y CATIE. Los CIIAs escogen aquellas tecnologías con potencial para comprimir el tiempo, espacio y costo de procesos específicos del mejoramiento de los cultivos y las desarrollan en colaboración con institutos desarrollados. Su objetivo es integrar las técnicas dentro de estrategias de mejoramiento. De este modo, como se muestra en el Cuadro 3, las técnicas de propagación clonal por medio del cultivo de tejidos fueron las primeras en ser adaptadas. El desarrollo completo de estas técnicas ha permitido facilitar el flujo de germoplasma entre los CIIAs y los INIAs, así como el desarrollo de bancos de germoplasma para cultivo de propagación vegetativa.

Otras tecnologías de los CIIAs están ayudando a la transferencia interespecífica e intergenérica de caracteres valiosos; y el cultivo de anteras está permitiendo obtener en el laboratorio un producto final semejante al obtenido en el campo con ahorro de tiempo y costos.

CUADRO 3. Estado de la investigación biotecnológica en Centros Internacionales de Investigación Agrícola de Latinoamérica (Agosto, 1984).

Tecnologías	Estado de las tecnologías por cultivo*		
	Iniciándose	En desarrollo	En uso
Propagación clonal <u>in vitro</u>		Café, plátano	Papa, yuca Pastos (gram)
Cruzamientos amplios	Fríjol	Maíz	Trigo
Haploídia	-	Papa	Arroz
Variación gametoclinal	-	Arroz	-
Embriogenésis somática	-	Yuca	-
Variación somaclonal	Yuca	Pastos (legum.), trigo, papa	-
Selección <u>in vitro</u>	Arroz	-	-
Cultivo de protoplastos	-	Papa, yuca	-
Transformación (absorción de DNA)	-	Maíz	-
DNA recombinante sondas para viroides	-	-	Papa
mejoramiento de proteínas	Papa	-	-
Criogenia	-	Yuca	-
Marcadores genotípicos	Fríjol	Yuca, pastos	Papa

\* CIAT (yuca, arroz, fríjol, pastos tropicales); CIMMYT (maíz, trigo); CIP (papa); CATIE (café, plátano).

Tecnologías avanzadas de la biología molecular están siendo utilizadas para aumentar la efectividad de detección de virus; y pronto será posible seleccionar en el laboratorio, variantes celulares que puedan extrapolarse en plantas con nuevos atributos.

Los CIIAs deberán continuar actuando como puente para trasladar los avances biotecnológicos disponibles de institutos desarrollados a los problemas de la agricultura tropical.

En esta función, los CIIAs tienen la ventaja comparativa del enfoque multidisciplinario de sus programas de investigación, así como su conocimiento de los factores limitantes al progreso de los cultivos de su responsabilidad. La existencia de colecciones mundiales de germoplasma en los CIIAs es otra ventaja importante.

#### INSTITUTOS DESARROLLADOS

La mayor parte de la inversión en biotecnología está concentrada en áreas de salud humana y animal, ej. interferón, insulina, hormona de crecimiento, factores para el tratamiento de la hemofilia, productos para diagnóstico in vitro para enfermedades, vacunas y bioprocesamiento de plantas. En los países desarrollados como los Estados Unidos, Japón, Alemania, Francia, Inglaterra y Suiza, existen no menos de 350 compañías dedicadas a biotecnología, entre Compañías de Investigación Básica (CIB), ej. Biogen, Genenrech, Genex, etc. y Compañías Multinacionales (CMN), ej. Monsanto, du Pont, etc. En los Estados Unidos más de 35 CIBs son activos en el área de la agricultura, con una inversión cercana a los 3 mil millones de dólares (13).

La investigación básica para el desarrollo de biotecnologías está ocurriendo en los CIBs y en las Universidades (UNI). Las CMN invierten en los CIBs, los que a su vez ven en las CMN un mecanismo de llegar rápidamente al mercado. Pero lo que está llamando la atención es la participación cada vez más creciente de los CIBs y de las CMN en la investigación básica que se realiza en las UNIs. Los primeros invierten en las UNIs, o los científicos de las UNIs son atraídos hacia los CIBs. Este fenómeno está privatizando la investigación en biotecnología (15).

## COLABORACION PARA LA INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGIA

Para el desarrollo de la investigación biotecnológica en América Latina, es primero necesario tener acceso a la información sobre los aspectos básicos así como de las técnicas. Tradicionalmente, las universidades desarrolladas (UNI) han sido la fuente principal de capacitación para América Latina. Es deseable que esta relación continúe para el caso de las biotecnologías; sin embargo, en vista de la creciente privatización de la biotecnología por acción de compañías comerciales, es necesario reforzar la colaboración entre los institutos nacionales e internacionales y las universidades desarrolladas mediante proyectos de investigación en biotecnología.

La Fig. 2 presenta las relaciones actualmente existentes (líneas sólidas) y propone nuevas áreas de colaboración (líneas cortadas). Obviamente es importante que los institutos nacionales de investigación agrícola de América Latina orienten esfuerzos en prepararse para utilizar las biotecnologías más avanzadas; salvo una o dos excepciones, esto no está ocurriendo en los INIAs, posiblemente debido a que los proyectos deben ser necesariamente a largo plazo. Los CIIAs pueden actualmente cumplir el rol de puente y seleccionadores de las tecnologías nuevas de mayor potencial para su transferencia posterior a los INIAs. Para esta función, los CIIAs tienen las ventajas comparativas mencionadas anteriormente. Pero también es necesario que los INIAs establezcan relaciones de investigación con los IIBs y los IESs donde existe un buen nivel de preparación básica; y por supuesto, los CIIAs también podrían participar de proyectos colaborativos. Otra alternativa, sería relacionar a los CIIAs y a los INIAs con las compañías de investigación básica (CIB) de países desarrollados. Esto podría sin embargo encontrar dificultades en vista de los objetivos diferentes de estas instituciones. Los CIBs tienen un interés primariamente comercial y las tecnologías que allí se desarrollan mayormente están orientadas a mercados altamente desarrollados, ej. desarrollo de variedades que faciliten el enlatado o la fabricación de bocadillos, etc; además, los cultivos o variedades que se pretende transformar en estas compañías por lo general no son básicos para la población de los trópicos, o en caso contrario, están desarrollando

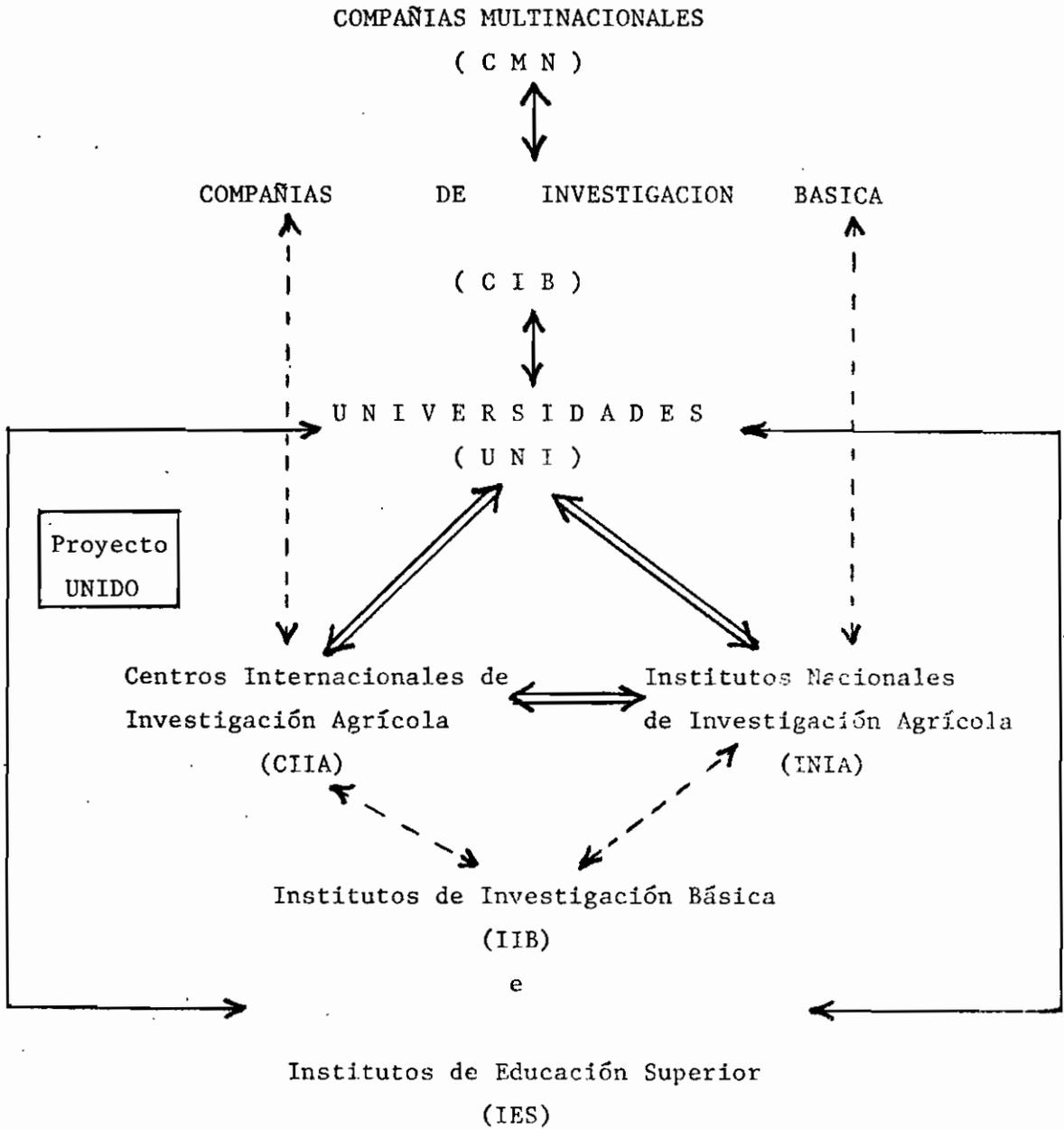


FIGURA 2. Colaboración en biotecnología agrícola entre institutos nacionales de investigación (INIA, IIB, IES), Centros Internacionales de Investigación Agrícola (CIA) de América Latina y Universidades de países desarrollados (UNI); y la relación de estos con Compañías Biotecnológicas desarrolladas (CIB, CMN).

relaciones existentes —————  
 relaciones propuestas - - - - -  
 relaciones a reforzar = = = = =

metodologías que les va a permitir el control de la producción, por ej. de semilla híbrida mediante el desarrollo de líneas con esterilidad citoplasmática o el desarrollo de marcadores moleculares para proteger las nuevas variedades patentadas. Por estas razones es posible que las Universidades desarrolladas constituyan la fuente principal de formación biotecnológica para América Latina. Además del acceso a la información tecnológica en sí, en el caso de muchos cultivos tropicales, a los que generalmente no se ha prestado atención en países desarrollados, es necesario desarrollar los conocimientos básicos sobre organización y regulación genética que hagan posible la manipulación de caracteres importantes.

La investigación y el desarrollo en biotecnología progresan demasiado rápido. Además de los "journals" conocidos sobre cultivo de células y tejidos, biología molecular, genética molecular y aplicada, etc., posibles fuentes de información crítica sobre biotecnología son las siguientes:

1. Conferencias internacionales: International Association for Plant Tissue Culture (cada 4 años), International Plant Molecular Biology Association (cada 2 años).
2. Noticias generales: Revistas Nature (mensual) y Science (mensual).
3. Información sobre actividades en otros institutos, conferencias, metodologías, y bibliografía: IAPTC Bulletin (cuatro al año), Plant Molecular Biology Newsletter (bimensual).
4. Resúmenes de descubrimientos nuevos: Agricell Report (mensual), Agricultural Biotechnology News (bimensual), Genetic Engineering News (8 al año), McGraw Hill's Biotechnology Newswatch (24 al año).
5. Resúmenes de investigaciones: Biotechnology Research Abstracts (mensual), Telegen Reporter (mensual), Telegen Reporter Review, Abstract (anual), Telegen Reporter Review, Index (anual), Telegenline (base de datos), Telegen Alert (información telefónica - electronica cada 7 días).
6. Identificación y evaluación de tecnologías: ATAS Bulletin del Centro para Ciencia y Tecnología para el Desarrollo, Naciones Unidas (bi-anual).
7. Cursos cortos de capacitación en América Latina.

Temas: Técnicas seleccionadas sobre cultivo de tejidos,  
Metodologías generales sobre cultivo de tejidos,  
Técnicas de biología molecular e ingeniería genética.

Instituciones: Centros Internacionales de Investigación Agrícola  
ICRO/UNESCO,  
Institutos nacionales: Fundación Campomar,  
Argentina; Pontificia Universidad Católica,  
Chile; SENA, Brasil; IDEA, Venezuela.

Otra fuente de información sobre biotecnología para países en desarrollo puede ser el proyecto de UNIDO para crear un Centro Internacional de Ingeniería Genética. Aunque ya se ha decidido localizar este Centro en dos lugares, Italia e India, su contribución al desarrollo de la agricultura internacional es todavía una posibilidad a largo plazo (16).

#### AREAS DE INVESTIGACION

Indudablemente, el progreso de la agricultura en América Latina continuará dependiendo primariamente del mejoramiento genético de los cultivos; por lo tanto, las tecnologías nuevas deberán estar orientadas hacia este objetivo directa o indirectamente. Algunas de las oportunidades para la investigación biotecnológica a corto y largo plazo son las siguientes:

1. Rehabilitación de variedades locales y aumento del rendimiento en cultivos clonales.
2. Producción de "semilla" básica en cultivos clonales.
3. Propagación masiva de especies alimenticias e industriales nuevas ej. palmas del trópico americano, frutales leñosos, árboles forestales, frutales industriales, etc.
4. Mejorar el potencial de rendimiento de los cultivos mediante cruzamientos interespecíficos por rescate y cultivo de embriones híbridos.

5. Introgresión de genes para tolerancia a ambientes adversos (metales pesados, salinidad, estrés de agua, etc.) mediante rescate y cultivo de embriones.
6. Acortar procesos tradicionales de mejoramiento mediante la fijación de caracteres en líneas homocigotas producidas a través de la haploidía, ej. cultivo de anteras, partenogénesis, eliminación de cromosomas, etc.
7. Diagnósis rápida de enfermedades mediante sondas moleculares no radioactivas o anticuerpos monoclonales.
8. Producción de variedades con atributos agrícolas deseables, mediante la selección de somaclones. Especialmente útil para mejorar variedades sin recurrir al cruzamiento.
9. Selección de variantes a nivel celular, con tolerancia a estreses de sales, aluminio, herbicidas, patotoxinas, etc., con niveles altos de aminoácidos esenciales.
10. Incremento del vigor híbrido de cultivos de polinización cruzada y heterocigotas, mediante la obtención rápida de homocigosis y el cruzamiento sexual.
11. Transferencia de esterilidad masculina citoplasmática, resistencia a herbicidas y tolerancia a enfermedades a través de la obtención de cíbridos por fusión de protoplastos y transferencia de organelos.
12. Transformación mediante la ingeniería genética. Introducción de segmentos de DNA que codifican caracteres de importancia económica: tolerancia a ambientes adversos; incremento de la calidad protéica de granos, tubérculos y raíces; aumento del potencial de rendimiento y rendimiento de biomasa total de los cultivos; aumento de la eficiencia fotosintética y de la fijación del nitrógeno.

En general, las áreas de investigación Nos. 1, 2, 3, 4, y 5 pueden ser desarrolladas a corto plazo (menos de 5 años); las Nos. 6, 7, 8, 9 y 10 a mediano plazo (5-10 años) y las áreas Nos. 11 y 12 a largo plazo. Esta clasificación es relativa al grado de desarrollo actual y en la próxima década de los institutos nacionales de investigación agrícola.

## BIBLIOGRAFIA

1. Baltimore, D. 1982. Priorities in biotechnology. Pages 30-37 in Board on Science and Techn., Nac. Res. Council, eds. Priorities in Biotechnology Research for International Development. Procee. Workshop, Washington, D. C., Nat. Acad. Sci. Press.
2. Bliss, F. A. 1984. The application of new plant biotechnology to crop improvement. Hort Science, 19:19-48.
3. Davis, W. C., McGuire, T.C., and Perryman L.E. 1982. Biomedical and biological application of monoclonal antibody technology in developing countries. Pages 179-207, in Board on Sci. and Techn. Int. Develop, eds. Priorities in Biotechnology research for international development. Proc. of a Workshop, Washington, DC. Nat. Acad. Sci. Press.
4. Depicker, A., Van Montagu, M., and Schell, J. 1982. Plant Transformation by Agrobacterium plasmids. Pages 143-176 in T. Kosuge, C.P. Meredith and A. Hollander, eds. Genetic engineering of plants, an agricultural perspective. Plenum Press, New York.
5. Evans, D. A. 1983. Protoplast fusion. Pages 291-321, in D. A. Evans, W. R. Sharp, P.V. Ammirato, and Y. Yamada, eds. Hand book of plant cell culture, volume 1. Techniques for Propagation and Breeding. Macmillan Publishing Co., New York.

6. Flick, C.E. 1983. Isolation of mutants from cell culture, Pages 393-441 in D. A. Evans, W. R. Sharp, P.V. Amminarto, and Y. Yamada, eds. Hand book of plant cell culture, volume 1. Techniques for Propagation and Breeding. Macmillan Publishing Co., New York.
7. Garger, S. J., Turpen, T.H. Carrington, J. C., Morris, T.J., Jordan, R.L., Dodds, A.J., and Grill, L.K. 1983. Rapid detection of plant R N A by dot blot hybridization. Plant Mol. Biol. Rep., 1:21-26.
8. Horsch, R.B., Fraley, R.F., Rogers, S.G., Sanders, P.R., Lloyd, A. and Hoffman, N. 1984. Inheritance of functional foreign genes in plants. Science, 223:496-498.
9. IRRI. 1984. Inter-Center Seminar on IARCs and Biotechnology. A report 47 p.
10. Raghavan. V. 1977. Applied aspects of embryo culture, Pages 375-397. In Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. J, Reinert and Y.P.S. Bajaj, eds. Springer-Verlag, New York.
11. Rivin, C.J. Zimmer, E.A., Cullis, C.A., Walbot, V., Huyuh, T. and R.W. Davis. 1983. Evaluation of genomic variability at the nucleic acid level. Plant Mol. Biol. Rep., 1:9-16.
12. Roca, W.M. 1984. In vitro clonal propagation and elimination of diseases in Crop Plants, Paper presented at the Inter-Center Seminar on IARC's and Biotechnology, IRRI, Los Baños, Philippines.
13. Rosenblum, J.W. 1983. The new agriculture: A view of the twenty-first century. Pages 351-367 in J.W. Rosenblum, ed. Agriculture in the twenty-first century. John Wiley and Sons, New York.

14. Scowcroft, W.R., and P. J. Larking 1982. Somaclonal variation: A new option for plant improvement. Pages 159-177 in I.K. Vasil, W.R. Scowcroft and K. J. Frey, eds. Plant Improvement and Somatic Cell Genetics. Academic Press, New York.
  
15. Toenniessen, G.H. 1984. The challenge of biotechnology to the international agricultural research system. Paper presented at Symp. on Biotechn. and Socioeconomic Transformation of Agriculture, AAAS Annual meeting, New York City, 17 p.
  
16. Zapata, F. J. Krush, G.S., Crill, J. P. New, M. H., Romero, R.O. Torrizo L.B., and Alejor, M. 1983. Rice anther culture at IRRI. Pages 27-54 in Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. Proc. Workshop, Institute of Genetic and IRRI. Science Press, Beijing.