

LA BIOTECNOLOGIA Y EL SECTOR AGROPECUARIO

Hilda Susana Azpíroz Rivero¹

Como preámbulo a esta exposición, mencionaremos dos de las más conocidas definiciones de Biotecnología, la de Bull et al (1982) y la definición oficial de la Oficina de Asesoramiento Tecnológico del Congreso de Estados Unidos, las cuales se presentan a continuación:

1. Biotecnología es la aplicación de los principios científicos y de ingeniería al tratamiento de los materiales de los agentes biológicos para producir bienes y servicios.
2. Biotecnología es cualquier técnica que use organismos vivos o parte de ellos para hacer o modificar productos, mejorar plantas o animales o, para desarrollar microorganismos que tengan usos específicos.

La Biotecnología en sí es un proceso de principios y técnicas que se ha utilizado desde tiempos muy antiguos, empezando con el uso de levaduras en la fabricación de pan o las fermentaciones tradicionales. Actualmente, los avances tecnológicos nos permiten clasificar a la Biotecnología en Tradicional y Moderna. Dentro de la Biotecnología Tradicional podemos mencionar las fermentaciones, la propagación rápida, el control biológico de plagas y enfermedades y la producción convencional de vacunas.

La Biotecnología Moderna comprende el uso de nuevas tecnologías generadas por el conocimiento profundo de la genética molecular y la Biología Molecular, como son las técnicas relacionadas con el cultivo *in vitro* de órganos inmaduros, la manipulación de ADN recombinante y los marcadores genéticos moleculares. Debe señalarse que la mayoría de estos métodos han sido utilizados primeramente en el sector salud y, sólo hasta hace poco, han pasado a ser aplicados en plantas y animales.

Las técnicas de la biotecnología que nos interesan como herramientas para complementar y hacer más rápidos los procesos de mejoramiento genético en plantas y animales son aquellas que nos permitan:

¹ Investigadora del Programa de Biotecnología del Centro de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de la Región Centro del INIFAP. Apdo. Postal No. 10, 56230, Chapingo, México. México.

- Crear variación genética.
- Explorar más efectivamente la variabilidad existente.
- Acelerar las diferentes etapas dentro del programa de mejoramiento.

Así, tenemos que las técnicas del cultivo *in vitro*, la manipulación de genes por medio de ingeniería genética y el uso de marcadores genéticos moleculares son poderosos auxiliares en el mejoramiento tradicional, que han permitido avances sustanciales, tanto para la obtención de nuevos individuos más productivos, como para la comprensión de ciertos fenómenos ligados a la genética cuantitativa.

CULTIVO *In vitro* DE ORGANOS Y TEJIDOS

En el área de cultivo *in vitro* de órganos y tejidos tanto vegetales como animales, las técnicas desarrolladas han permitido apoyar fuertemente a la biotecnología moderna, siendo su utilización necesaria, tanto en investigaciones básicas como en procesos industriales.

Actualmente es de todos conocido que las células aisladas pueden continuar funcionando y reproduciéndose *in vitro* si se les provee de un medio de cultivo adecuado. En el caso de células vegetales, éstas son totipotentes y omnipotentes, es decir, cada célula puede reproducir una planta completa si al medio de cultivo se le agregan los nutrientes y un balance de hormonas adecuados. Este descubrimiento ha tenido gran repercusión en la investigación agrícola, pero aún hoy en día algunas familias de plantas son muy difíciles de manejar *in vitro* (especies recalcitrantes).

La utilización del cultivo de tejidos y/u órganos inmaduros dentro de la genotecnia tradicional es de gran ayuda para acelerar el progreso genético. Ciertas técnicas de cultivo de tejidos se han desarrollado con este objetivo; así tenemos:

1. El cultivo de embriones inmaduros, somáticos y cigóticos.
2. La producción de plantas haploides, a partir del cultivo *in vitro* de gametofitos.
3. La producción de híbridos somáticos a partir de protoplastos.

4. Selección *in vitro* y
5. La regeneración *in vitro*.

Un caso concreto de la utilización de estas técnicas en el mejoramiento de plantas, es el cultivo *in vitro* de embriones sigóticos inmaduros como técnica complementaria de los métodos tradicionales de selección. El cultivo de embriones inmaduros, evita la larga fase de maduración y de dormancia de las semillas, permitiendo una reducción notable en la duración del ciclo de selección (Alissa, 1986; Plotnikov, 1983; Azpíroz, 1987). Esta operación se realiza en cada ciclo de autofecundación y, aprovechando las siembras denominadas de invierno o los invernaderos, se pueden tener hasta 4 ciclos por año.

Así mismo, esta técnica puede ser utilizada para realizar retrocruzas aceleradas, con la finalidad de adicionar algún carácter agronómico importante que haga más redituable el uso de la variedad.

Tenemos como ejemplos, las retrocruzas con materiales resistentes a enfermedades o para introducir el carácter de androesterilidad, (con fuentes CMS-S y CMS-C resistentes a *Helminthosporium maydis*), este último puede favorecer al productor de semilla, ya que se reducirían los costos de obtención de los híbridos.

Este carácter de androesterilidad CMS-S y DMS-C en maíz puede introducirse por retrocruzas aceleradas mediante el cultivo de embriones inmaduros en 390 días.

Por otra parte, es una técnica empleada en el rescate de embriones interespecíficos (Alissa et al, 1985; Monier, 1982).

La variabilidad genética es una de las condiciones primordiales para el éxito del mejoramiento genético de cualquier especie. Una de las fuentes de esa variabilidad son las especies llamadas silvestres.

Por lo tanto, el intercambio de genes entre especies diferentes permite el enriquecimiento del acervo genético, lográndose:

1. Resistencias a diferentes enfermedades.
2. Resistencia a plagas.
3. Genes con mejor adaptación a medios adversos.

Sin embargo, debe tomarse en cuenta que entre distintas especies existen marcadas barreras de incompatibilidad, lo que representa

una dificultad para el cruzamiento, la viabilidad y la fertilidad de sus híbridos (Al-Yasiri y Coyne, 1966). Sin embargo, como este problema se debe a la malogración del endospermo, como consecuencia de la tardanza de la división celular en la microspora (Rabakoarihanta et al, 1979), el cultivo de los embriones inmaduros *in vitro* evita el aborto y permite el desarrollo normal del embrión interespecífico.

Muchas de las hibridaciones interespecíficas fracasan porque ciertas especies eliminan los cromosomas extraños después de la fertilización. Actualmente, se conocen varios genes que restringen o promueven el apareamiento y recombinación (en trigo, por ejemplo, tenemos el cromosoma B5).

También los embriones inmaduros pueden ser cultivados *in vitro* para producir embriones somáticos vía callo (Green y Phillips, 1975).

Para la producción de callo los embriones inmaduros serán cultivados en condiciones de rigurosa asepsia sobre medio de cultivo nutritivo (Chu et al, 1975 y Murashige et al, 1962), utilizando fitohormonas como agentes que propiciarán el desarrollo celular en forma masiva. Una vez desarrollado el callo se transplanta en el mismo medio sin hormonas para propiciar la diferenciación celular o producción de embriones somáticos.

Posteriormente, los embrioides y brotes darán origen a nuevas plántulas, las cuales serán transplantadas en otros medios para su desarrollo adecuado, siendo después transferidas en cubos de tierra estéril e incubadas en invernadero para que más tarde se transplanten en campo.

Esta técnica puede ser útil en la propagación masiva y rápida de algún genotipo en especial, como es el caso de alguna línea necesaria en la producción de híbridos; o bien, en el mejoramiento de poblaciones pensando en la variación somaclonal, si se demuestra que ésta es suficientemente grande y que las variantes deseables son reproducibles a través de las generaciones.

Asimismo, esta técnica permite detectar los genotipos aptos a la regeneración *in vitro* como lo están haciendo actualmente en un proyecto de colaboración, el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) y el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias de México (INIFAP), con sus líneas élite y variedades de polinización libre de Valles Altos (Bohorova et al, 1991); esta aplicación es importante porque el carácter de regeneración *in vitro* puede introducirse a otros genotipos por retrocruzas y esos materiales pueden ser susceptibles de transformación por ingeniería genética, ya que este procedimiento de transformación génica necesita como materia prima callos embriogénicos que puedan regenerar plan-

tas completas de maíz.

Este tipo de transformación puede ser útil para la introducción de caracteres monogénicos que no se encuentren dentro de la especie o género, como podría ser el carácter de apomixis (o partenogénesis) que vendría a revolucionar la industria semillera, ya que las semillas apomícticas darían origen a una planta idéntica al progenitor y, así, el productor de semillas ya no tendría necesidad de aislar sus lotes de producción.

Este carácter se encuentra en el género *Tripsacum* y actualmente existen grupos científicos que trabajan en la introducción de genes de *Tripsacum* al maíz (Hanna y Bashaw, 1987; Savidan, 1986). Este tema de transformación se analizará más adelante.

En el caso de animales la técnica del cultivo de embriones inmaduros y trasplante de los mismos ha tenido gran éxito para la obtención de genotipos con características similares. Asimismo, se ha desarrollado la crioconservación de los embriones o gametofitos para ser utilizados posteriormente. Para el caso de transformación génica, los embriones inmaduros de animales se usan frecuentemente, lográndose un éxito hasta de 99%.

OBTENCION DE HAPLOIDES *In vitro*

Otra aplicación de las técnicas *in vitro* en mejoramiento vegetal es la haploidización. Los haploides *in situ* se presentan de una manera espontánea o son inducidos por la acción de diversos tratamientos. La frecuencia de este tipo de haploides varía según la especie y el genotipo; pero, en general, es muy baja; pueden ser detectados gracias a dos métodos: Uno es con la trilla de granos poliembriónicos y el otro usando marcadores genéticos. Aparentemente, la técnica del cultivo *in vitro* de gametofitos (anteras y ovarios) ha permitido la obtención de haploides en ciertas especies, con una frecuencia más elevada (Alissa et al, 1985; Mezzaroba et al, 1986; Gelebart, 1987). El interés de la obtención de haploides radica en los siguientes puntos:

1. La obtención de líneas homocigóticas por doblamiento espontáneo o artificial (Colchicina) del stock cromosómico de individuos haploides.
2. Esta vía presenta una ganancia en tiempo muy apreciable, si la comparamos con la vía tradicional, donde la homogeneidad fenotípica se obtiene después de 7 a 10 generaciones de autofecundaciones sucesivas.
3. Bajo el plan de conocimiento del genoma, la vía haploide presenta igualmente numerosas ventajas (sobre todo si se admite que la realización de la fase haploide se opera sin selección).

- Permite un análisis fino de las interacciones alélicas pudiéndose apreciar directamente ciertos parámetros de la genética cuantitativa.
- Permite la obtención de una gama de segregación gamética y favorece su difusión de manera estable bajo la forma de líneas puras (Demarly, 1983).
- Esta técnica pone en evidencia ciertas recombinaciones recesivas, que pueden eliminarse o utilizarse a conveniencia de la selección.

La obtención de plantas haploides puede ser realizada espontáneamente o utilizando procedimientos inductivos, dentro de estos últimos se puede mencionar el aislamiento *in vitro* que puede realizarse en gametos masculinos (técnica llamada androgénesis) y en gametos femeninos (ginogénesis).

Se ha señalado por varios autores (Nakata y Tanaka, 1968; Nitsch - Nitsch, 1969; Clapham, 1971; Cuyang et al, 1973) que los mejores resultados para la mayoría de las especies se han obtenido cuando las microsporas en el seno de la antera se encuentran en el estado pre-mitótico (microsporas nucleadas maduras) o postmitótico (microsporas binucleadas jóvenes).

OBTENCION, CULTIVO Y FUSION DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos son células cuya pared celular ha sido removida por métodos mecánicos y enzimáticos (cloroplastos, mitocondrias, etc).

Estas células o protoplastos son viables y rápidamente sintetizan una nueva pared celular, crecen y se pueden dividir llegando en algunas especies a regenerar una nueva planta. Cuando la célula está en estado de protoplasto se puede manipular y ésta absorbe varios tipos de materiales genéticos. Esta propiedad de los protoplastos se utiliza ampliamente en biotecnología.

Esta tecnología ofrece la oportunidad de fusionar protoplastos derivados de especies que son sexualmente incompatibles en la naturaleza. Siembre debe recordarse que todo el proceso de fusión es enteramente físico y difícil de repetir, ya que se pueden obtener autofusiones, heterofusiones, fusiones incompletas y, esto da origen a una gama muy diversa en cada experimento.

En especies de tabaco, papa, tomate, brassica y *arabidopsis*, se han obtenido varios híbridos; sin embargo, el uso está limitado debido a que no siempre es posible regenerar plantas a partir de sus protoplastos. En arroz hay algunas líneas de las subespecies Indica y Japónica que pueden contribuir mediante este método al

mejoramiento de Indica. En maíz es también posible regenerar plantas a partir de protoplastos.

Otra aplicación de esta técnica es la fusión entre protoplastos de la misma especie, o entre especies sexualmente compatibles, a fin de introducir recombinaciones epigénicas y citoplásmicas (aloplasma y fusión citoplásmica para introducir androesterilidad).

SELECCION *In vitro*

Por otra parte, la posibilidad de mejorar la resistencia de plantas frente a la acción de factores bióticos y abióticos del medio reviste una gran importancia para el fitomejorador. Al respecto, se ha propuesto por varios investigadores (Yasuda, 1982; Kurts, 1982; Nabor, 1980) la selección *in vitro* para aislar plantas resistentes a enfermedades, salinidad, frío y al déficit hídrico.

La ventaja potencial de esta técnica radica tanto en la rapidez de selección como en la capacidad de efectuar el tratamiento sobre un gran número de individuos ubicados en un espacio relativamente pequeño.

La selección *in vitro* se hace por medio del aislamiento aséptico de células y órganos en un medio de cultivo que contiene sustancias químicas o metabolitos, así como otras sales que inhiben el crecimiento. Entre esas sustancias podemos mencionar los pesticidas, toxinas o filtrados de organismos patógenos, metales pesados, sales minerales o simplemente sustancias que aumenten la presión osmótica del medio de cultivo.

Este tipo de selección de materiales con resistencia a factores bióticos o abióticos puede realizarse, tanto a nivel celular, como a nivel de órganos jóvenes (Yasuda, 1982; Azpíroz, 1988). La selección a nivel celular parte de un grupo de células llamado callo, el cual una vez demostrada su resistencia a ciertos factores, se cambia del medio para permitir el desarrollo de embrioides somáticos que serán el origen de plantas con resistencia al factor limitante. En cambio la selección a nivel de embriones inmaduros permite una eliminación de los no resistentes y los resistentes se cambian a un medio propicio o directamente a tierra para su desarrollo.

TRANSFORMACION GENICA

La introducción de genes en la misma especie, entre especies o géneros diferentes puede lograrse mediante cruza tradicionales, o bien, usando sistemas de transformación de Ingeniería Genética. La manipulación de genes o transformación de plantas y anima-

les comprende una serie de técnicas que permiten la inserción de uno o más genes provenientes de otros organismos o que han sido sintetizados en el laboratorio. Antes de insertar un nuevo gen en una planta es necesario identificar y aislar ese gen, para luego clonarse como promotor, el cual va a regular la expresión del gen, posteriormente se debe identificar el mejor sistema para introducirlo en la planta o animal a modificar. La aplicación de esta metodología equivale a la incorporación de una característica monogénica por retrocruzamiento a un material genético dado, con la ventaja de que con la transformación la incorporación de dicha característica es instantánea.

Los sistemas de transformación de nuevo material genético en plantas han resultado más difíciles que en animales, donde la microinyección directa en embriones unicelulares es la técnica más usada (Rogers, et al, 1985).

Hay varias maneras de introducir genes o transformar plantas y animales, y esto se ha logrado en varias especies. En la última década, los nuevos conocimientos de la estructura y regulación de genes y el desarrollo de vectores ha abierto nuevas expectativas y se ha logrado producir y estudiar plantas y animales transgénicos. Las plantas en que se ha logrado dicha transformación con éxito son las dicotiledóneas, que se pueden reproducir por cultivo de tejidos a partir de protoplastos y, además, responden bien al sistema de transferencia de genes que en la naturaleza lleva a cabo la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. (Fromm et al, 1985). En la actualidad, se logran transformaciones genéticas estables, en forma rutinaria, sobre varias especies vegetales, como tomate, papa, algodón, colza y, aún, en algunas especies forestales (Fischhoff et al, 1987) y en las especies animales como bovinos, ovinos y porcinos.

En plantas, los sistemas de transformación se pueden dividir en:

- a. Directos, que incluyen absorción directa de ADN por protoplastos, electroporación, microinyecciones y el uso de microproyectiles (Klein et al, 1987 y 1988; Fromm et al, 1985).
- b. Indirectos, mediante el uso de vectores, tales como *A. tumefaciens*, virus, bacterias, hongos y elementos genéticos móviles o transposones (Klee et al, 1987).

METODOS DIRECTOS DE TRANSFORMACION

Las dificultades que presenta el uso de *A. tumefaciens* en algunas especies vegetales ha aumentado el interés por encontrar otros sistemas de transformación alternos a utilizar. Entre ellos tenemos:

1. USO DE PROTOPLASTOS

Los protoplastos absorben ADN proveniente de cromosomas, plásmidos y fagos: Se ha demostrado la asociación de este ADN con el núcleo de los protoplastos en cuestión. La presencia de policationes como poly-L-lisina y poly-L-ornitina incrementan la absorción, al igual que el uso de polietilenglycol (PEG), pero la frecuencia de transformaciones es baja (1 por cada 10 protoplastos). Estos tipos de procedimientos se han utilizado en cebada y en trigo diploide (*Triticum monococcum*). Pero los protoplastos que formaron pequeños callos y que mostraron resistencia al marcador empleado (Kanamicina) no fueron capaces de regenerar plantas. En arroz también se ha intentado usar este procedimiento alcanzándose frecuencias de transformación más altas. El mayor problema en este método, además de las bajas frecuencias de transformación, lo constituye la regeneración de plantas a través de los protoplastos (Rodes et al, 1988).

2. ELECTROPORACION

Es un proceso en el cual las células se someten a pulsos eléctricos de alto voltaje. Lo cual causa perforaciones pequeñas en la membrana celular; así se logra la difusión de moléculas de ADN al interior de la célula, la cual regenera su pared celular y continúa desarrollándose normalmente. Este procedimiento se usa mucho en la transformación de células animales y se ha usado con éxito en la transformación de protoplastos de maíz de la línea A188 que llegaron a regenerar plantas, y en arroz donde algunos genotipos presentan una eficiente regeneración de protoplastos a plantas (Rodes et al, 1988).

3. USO DE MICROPROYECTILES

Esta metodología se realiza mediante un bombardeo con una pistola común y bajo vacío de pequeñas partículas de tungsteno (1.2 micro milímetros) que van cubiertas de moléculas de ADN. Este procedimiento requiere tejidos vegetales, callos embriogénicos inclusive, embriones cigóticos. En maíz se ha logrado transformar para la obtención de resistencia a herbicidas y también en cebada (Klein et al, 1987 y 1988).

4. MICROINYECCIÓN

Esta técnica se ha probado en embriones cigóticos, inflorescencias en desarrollo de diversos cultivos inyectando ADN, conteniendo el gen para la resistencia a la kanamicina; sin embargo, la frecuencia de esta transformación es muy baja en plantas, pero en embriones unicelulares de animales la frecuencia de transformación ha sido todo un éxito.

METODOS INDIRECTOS

El uso de vectores en transformación de plantas es la inclusión de genes que han sido debidamente caracterizados, en un vehículo o vector que, a su vez, es incorporado en las células vegetales. En plantas, el vector más ampliamente utilizado es *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria del suelo que tiene un sistema natural para transferir genes a la planta hospedera, causando la enfermedad de la Agalla de la Corona.

En 1975 se estableció que el plásmido PTI contenía a los genes que controlaban la inducción de las agallas en la planta. Asimismo, se demostró que en la región VIR se encontraban los genes responsables de la producción de la agalla y los genes responsables de la transferencia del TDNA a las células vegetales. Es precisamente, en esta zona donde se sustituyen los genes que producen los tumores, por los genes que van a transformar a la planta en estudio, incluyendo genes marcadores responsables de la resistencia a antibióticos que servirán para la selección de los materiales transformados.

Este sistema de transformación se puede resumir en cinco etapas:

1. Identificación y aislamiento de los genes a introducir
2. Introducción de genes foráneos en cepas desarmadas de *A. tumefaciens*.
3. Infección con *A. tumefaciens* a células o tejido vegetal para permitir la transferencia del gen o genes deseados.
4. Selección y regeneración de células y tejidos transformados.
5. Análisis y verificación de la expresión de los genes en las plantas transformadas.

Las plantas transformadas tienen apariencia normal y la herencia del ADN transformado (T-ADN) es Mendeliana.

La mayor parte de las plantas transgénicas que existen en estos momentos han sido creadas usando como vector a *A. tumefaciens*.

Así, por ejemplo, Murai et al, 1986, introdujeron en el genoma de girasol el gene responsable de la producción de faseolina que se aisló del género *Phaseolus*, usando como vector *A. tumefaciens*, pero este gene no se expresó. El material genético que se introduce en la planta debe tener todos los elementos reguladores que aseguren la correcta expresión de los genes introducidos.

En 1989 se probaron las primeras plantas transformadas de tomate con el gene responsable de la producción de una endotoxina (*Bacillus turingiensis*) que evita el ataque de insectos a esta especie.

También, usando los genes antisentido se logró la obtención de tomate transgénico con mayor vida de anaquel, ya que este gen impedía la producción de la poligalacturonasa en el fruto y éste se conserva verde por más tiempo.

Gould J. demostró en 1991, que el maíz puede transformarse usando *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido PGUS3 conteniendo los genes para la resistencia a la Kanamicina (NPT II) y la producción de B-glucoronidasa (Gus).

Otros vectores que se han desarrollado para transformación son los virus de ADN de cadena doble y simple, así como de hongos. En la actualidad se está trabajando para transformar el maíz, pero desde un punto de vista práctico, para lo cual tanto CIMMYT como el Centro de Investigaciones y Estudios Avanzados (CINVESTAV) en México, estudian la posibilidad de introducir los genes responsables de la producción de la endotoxina de *Bacillus turingiensis*, lo que haría resistente al maíz al ataque de insectos.

La utilización de estas técnicas de transformación podrían auxiliar fuertemente a la producción de semillas cuando se necesite introducir rápidamente algún gene en particular, que mejore alguna variedad ya existente, o para la introducción rápida de la apoximis, por ejemplo, una vez que se identifique el gen responsable de esa característica y se aísle.

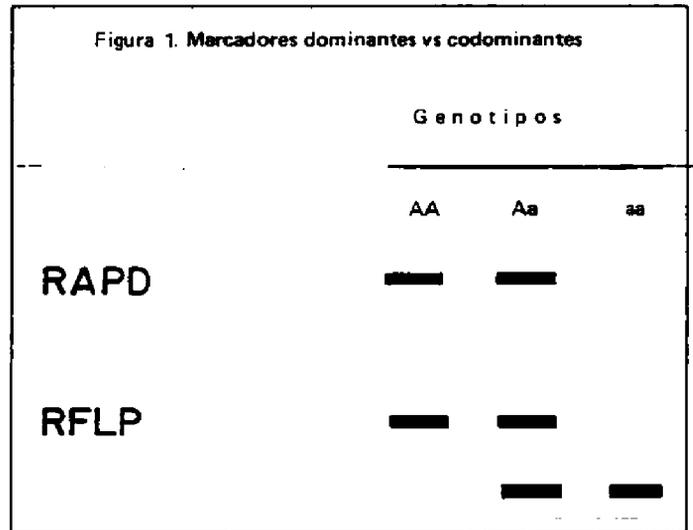
Otra aplicación práctica de la técnica de transformación es en la producción de biopesticidas, la Agencia Americana de la Protección del Ambiente (EPA) autorizó en junio de 1991 por primera vez a la Compañía Mycogen, de San Diego, California, dos bioinsecticidas genéticamente modificados.

Estos bioinsecticidas son virus modificados, así, por ejemplo, tenemos los trabajos de Tomalski, 1991 y Stewart, 1991, quienes utilizan la capacidad de los himenópteros para producir neurotoxinas que paralizan a lepidópteros para transformar los béculovirus introduciendo el gen responsable de la producción de esta toxina. Por lo tanto, las larvas infectadas por béculovirus modificado, permiten que el gene responsable de la toxina se integre al genoma del insecto y éste se paralice mientras el virus sigue su proceso destructivo convencional en el interior de la larva, evitándose así el ataque destructivo a los cultivos de interés comercial, ya que normalmente cuando el lepidóptero es atacado por el virus no transformado el insecto sigue destruyendo el cultivo por una semana hasta que muere, presentándose pérdidas económicas muy fuertes para el productor.

MARCADORES GENÉTICOS MOLECULARES

Otras técnicas biotecnológicas, importantes en lo que se refiere al mejoramiento genético, es el uso de marcadores genéticos moleculares. En la actualidad, varios países han integrado a sus programas de mejoramiento genético el uso de marcadores genéticos moleculares como son: El poliformismo de isoenzimas el de la longitud de fragmentos de ADN determinados por sitios de restricción (RFLP) y el del ADN amplificado al azar (RAPD). Estas técnicas pueden ser usadas para identificar y localizar genes de caracteres cuantitativos, medir cambios de frecuencias génicas por efectos de selección natural o artificial; se pueden predecir grados de heterosis mediante la medición de divergencia genética. Además, a un nivel práctico, los marcadores genéticos moleculares están siendo usados en algunos países para complementar la caracterización fenotípica y fenológica en el registro de las nuevas variedades vegetales y animales.

Estos marcadores tienen las ventajas de presentar efectos neutros sobre la planta; en la mayoría de esos "loci" se presentan efectos codominantes como en el caso en isoenzimas y RFLP's y dominante en caso de los RAPD's (Figura 1); se pueden tener marcadores a lo largo del genoma; el genotipo se puede determinar en cualquier estado fenológico de la planta y en cualquier tejido; se puede trabajar casi con cualquier población natural y estos genotipos no se enmascaran por el ambiente, principalmente.



ENZIMAS

Las enzimas son proteínas con una actividad catalítica, cuyo estudio y análisis nos permite conocer también la variabilidad genética en poblaciones de individuos que poseen polimorfismos para estos componentes.

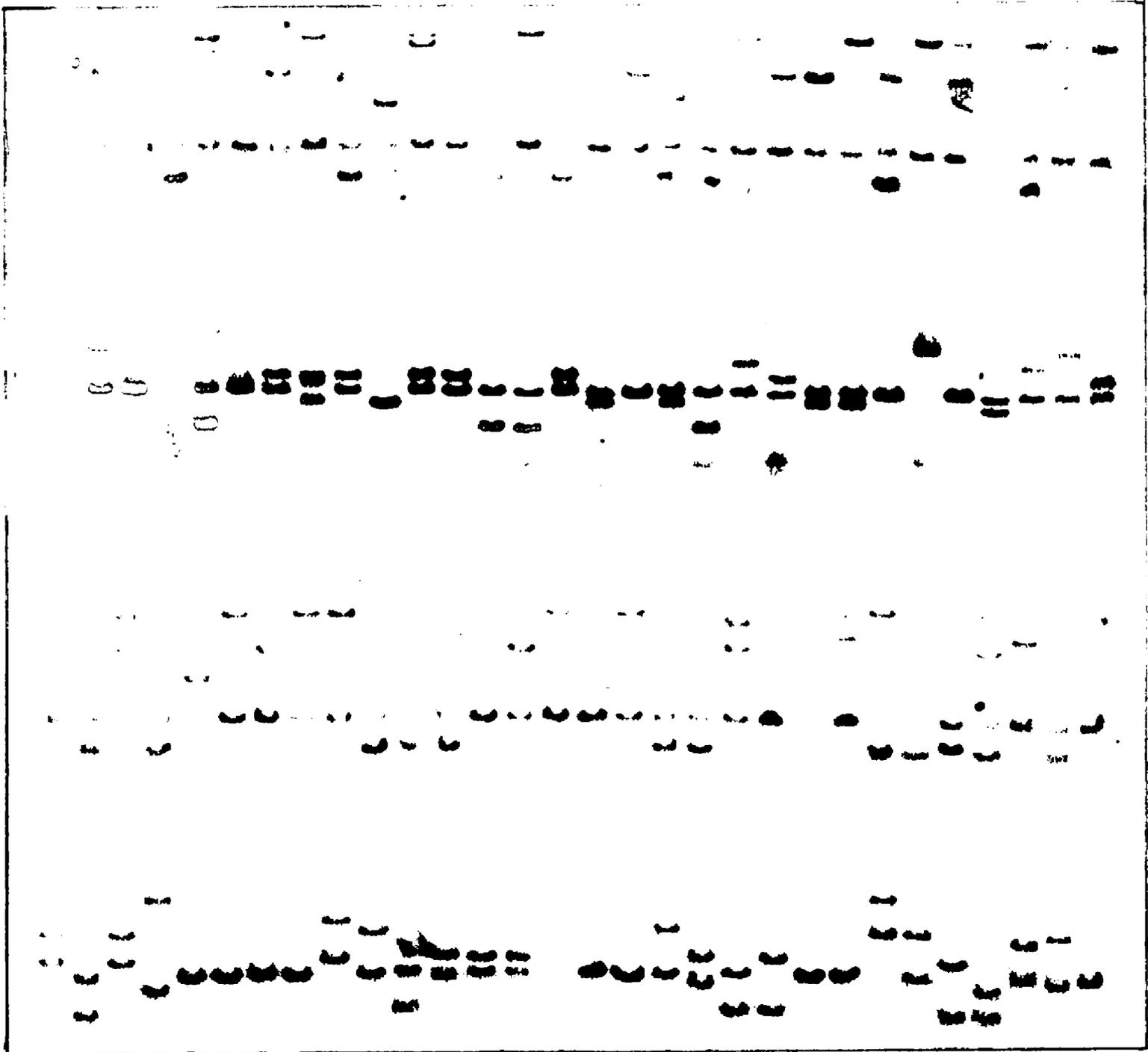


FIG. 2 FRAGMENTOS GENERADOS POR 2 ENZIMAS DE RESTRICCIÓN : 1) ECOR I y 2) HIND III.

Los genes que codifican las enzimas poseen dos propiedades que las hacen interesantes para los genotecnistas:

- 1a. Una porción importante de esos genes son polimorfos, es decir, que ellos existen bajo la forma de dos o más alelos.
- 2a. Los alelos de genes codificadores de las enzimas son generalmente codominantes.

Para estudiar las enzimas se utiliza la técnica de electroforesis que las discrimina por su peso molecular y su carga superficial sobre gel de almidón, poliacrilamida o agarosa. Estos dos parámetros están ligados a la constitución en aminoácidos y reflejan la diversidad genética asociada de la misma forma que en el caso de las proteínas de reserva.

Las enzimas así separadas se revelan por medio de reacciones específicas de coloración, dando bandas que forman un diagrama electroforético.

POLIMORFISMO DE LA LONGITUD DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN

Un RFLP es simplemente una diferencia en el ácido desoxiribonucleico entre dos individuos. Esta diferencia se puede deber a muchas razones, pero más com-

mún es, generalmente, la inserción o eliminación de un pequeño segmento de ADN o un cambio en una o dos bases dentro de la secuencia del ADN. Para detectar un RFLP se aísla el ADN de un individuo y se digiere con una o más enzimas de restricción. Estas enzimas cortan la secuencia de ADN en sitios específicos. El ADN digerido se separa en un gel mediante cargas eléctricas, se transfiere a una membrana y ésta se usa como un molde original para detectar el largo de cada fragmento individualmente.

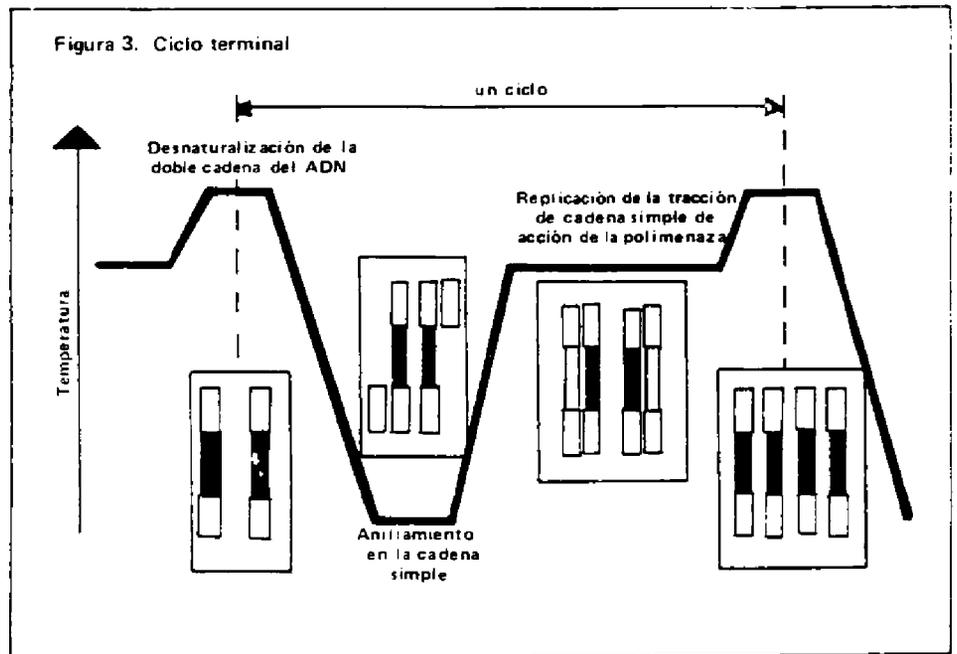
Un RFLP se observa como una diferencia entre dos individuos en el largo de los fragmentos generados por una enzima de restricción específica (Figura 2). A veces se pueden generar patrones más complicados que abarcan no sólo diferencias en los largos de los fragmentos, sino también en el número de bandas, esto dependerá de la nueva ubicación del sitio de restricción.

Estos marcadores, desde su descripción en 1975 por Grodzicki y colaboradores, se han usado con varios fines y en producción de semilla han permitido el establecimiento de similitudes y disimilitudes genéticas muy interesantes (Smith and Smith,

1991; Melchinger et al, 1991).

POLIMORFISMO DEL ADN AMPLIFICADO AL AZAR

Hace poco tiempo, en diciembre de 1990, se publicó información acerca de un segundo tipo de marcadores moleculares (Welsh y McClellan, 1990 y Williams et al, 1990). Estos marcadores se han denominado polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD's) y se basa en la amplificación del ADN mediante la reacción cíclica múltiple para amplificar pequeñas secuencias de



ácido desoxiribonucleico usando una secuencia primaria de nucleótidos como iniciador. Esta secuencia primaria es conocida, por lo que las reacciones de amplificación se pueden repetir. Una reacción típica se realiza con un amortiguador simple, los cuatro dinucleótidos trifosforados (D'ATP, D'CTP, C'GTP y D'TTP), la secuencia primaria, taq polimerasa y unos pocos nanogramos del ADN del organismo estudiado. Después de 4 horas de amplificación donde se pasa por procesos de desnaturalización, anillamiento y replicación (Figura 3), los productos se separan en un gel de agarosa mediante cargas eléctricas donde directamente se tiñe y visualiza el ADN amplificado (Figura 4). Esta técnica ha sido propuesta para la caracterización de variedades de polinización libre recientemente (Fischer, 1991).

REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA

Otra de las técnicas que se están utilizando en el sector pecuario para detectar genotipos con características sobresalientes de resistencia a enfermedades o para diagnóstico de enfermedades, uno de los más recientes trabajos en esta última aplicación se ha

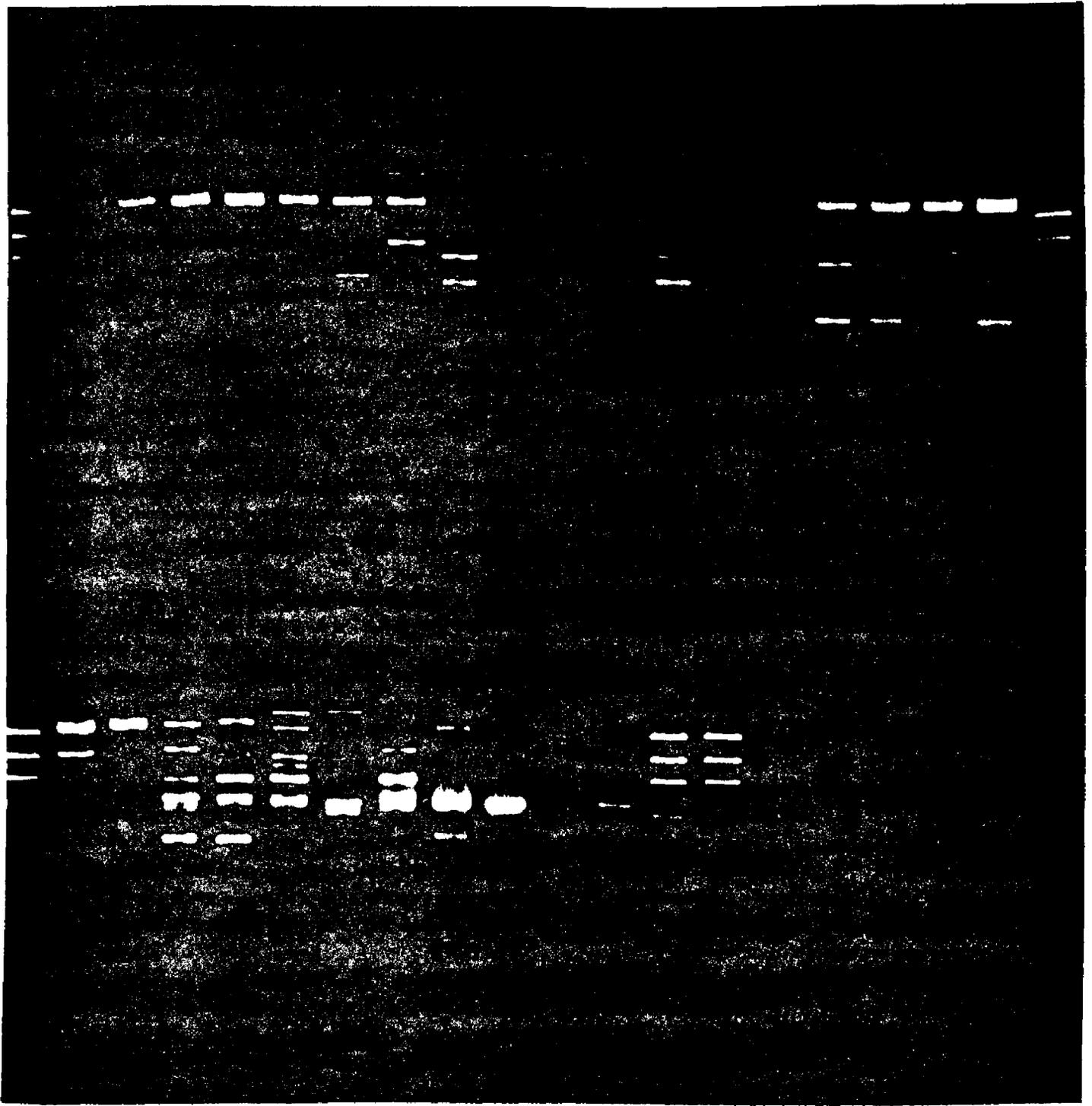


FIG. 4 VISUALIZACION DEL ADN AMPLIFICADO DE VARIEDADES VEGETALES DE POLINIZACION LIBRE

realizado en México, para la detección temprana de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa.

Como es bien sabido, la brucelosis bovina infecta además a ovinos, caprinos y al hombre. En animales propician daños económicos muy fuertes, ya que provoca abortos, mortandad de crías y problemas reproductivos. El diagnóstico de la brucelosis animal se realiza con pruebas serológicas cuya utilidad es limitada debido a su falta de especificidad y sensibilidad. La prueba serológica más utilizada (aglutinación) no detecta infecciones latentes o tempranas, ni permite diferenciar los anticuerpos de animales vacunados de los animales enfermos. En cambio, esta nueva prueba que usa la técnica en cadena de la polimerasa (RPC) ha detectado exitosamente la presencia de *Brucella*, así como la o las especies presentes que causen la infección (Martínez et al, 1993 y López et al, 1993).

PROPIEDAD INTELECTUAL, TRANSFERENCIA BIOTECNOLÓGICA Y BIOSEGURIDAD

Todas estas metodologías que son poderosas herramientas en varios campos del sector agropecuario como son: Mejoramiento genético, en el diagnóstico de enfermedades de especies vegetales, forestales y animales, en la producción de Bioinsecticida y otros campos más, han propiciado un debate sobre el desarrollo de la biotecnología agropecuaria en América Latina y el Caribe, sobre todo porque las grandes compañías transnacionales han analizado las grandes posibilidades de la agricultura transformada por la biotecnología y, actualmente, todas esas compañías realizan grandes inversiones en investigación biotecnológica como Monsanto, que invierte hasta mil millones de dólares por año, lo mismo que Dupont, INI, Pfizer y Ciba Geigy.

Las relaciones Industria-Universidad, Industria-Gobierno, que se han establecido en los países desarrollados, han permitido que la empresa transnacional tenga un control en la generación, flujo de información y conocimiento científico; esto implica la protección de dicho conocimiento, por lo que se promueve a nivel mundial el patentamiento de productos, procesos y organismos vivos obtenidos mediante la biotecnología (Solleiro, 1991).

Especialistas en la materia consideran que el desarrollo de la biotecnología en América Latina y el Caribe, deberá realizarse en un contexto de relaciones armónicas entre países desarrollados y en desarrollo, ya que se involucran aspectos de interés común muy importantes como:

- El manejo y conservación de germoplasma
- La transferencia de tecnología moderna.
- El medio ambiente
- La seguridad alimentaria

• La propiedad intelectual

Sobre el germoplasma se ha recomendado que éste sea considerado patrimonio de nuestros países; y que se considere el establecimiento de políticas económicas que permitan la conservación y explotación racional del germoplasma de América Latina y el Caribe, donde los países desarrollados que estén interesados contribuyan activamente a la implementación y ejecución de esa acción.

En lo que se refiere a la transferencia de las nuevas biotecnologías se recomienda a los países en desarrollo la unión de esfuerzos y la cooperación internacional para que esta transferencia se pueda lograr.

Como vimos, en esta exposición existen variadas metodologías en Biotecnología que pueden ser aplicadas a varios procesos del sector agropecuario para hacerlo más eficiente. Por lo que es importante un programa de transferencia de biotecnología hacia los usuarios, llámense mejoradores o productores, para que estas herramientas biotecnológicas puedan ser aplicadas correctamente a problemas concretos.

Dicha transferencia se puede lograr mediante entrenamientos cortos que permitan a los usuarios interaccionar con los laboratorios de transferencia de biotecnología y también con los grandes centros de investigación básica en el área de la biología molecular, lo que permitirá resolver problemas de interés agronómico a nivel local y regional.

Actualmente, a nivel mundial existe en varios centros de investigación y otros más de transferencia el firme propósito de simplificar las técnicas de cultivo de tejidos, transformación genética y marcadores genéticos, para que éstas puedan ser utilizadas en mejoramiento genético, tanto de animales como vegetales, lo cual dará como fruto, en breve:

- Un mayor uso de estas técnicas en mejoramiento genético.
- Obtención de genotipos con la componente biotecnológica.

Dentro del nuevo contexto de desarrollo tecnológico y comercial y de la liberación de las economías e interacción de los mercados internacionales cobra gran importancia la protección de las invenciones biotecnológicas.

A nivel internacional, se ha propuesto el Sistema de Patentes, este derecho confiere al titular de la patente una posición monopólica "temporal" que tiene intrínsecamente un elevado valor económico.

La posibilidad de contar con esta protección monopólica temporal en el campo de la biotecnología es reciente. La Legislación en la materia, en la mayoría de los países había considerado hasta hace poco que los cambios en material biológico se producen libremente sin intervención del hombre, por lo que no se podría hablar de invenciones.

Sin embargo, las aplicaciones a nivel industrial de las investigaciones de la ingeniería genética y biología molecular, han provocado la revisión del sistema de patentes en muchos países desarrollados; donde se acepta actualmente el patentamiento de nuevos seres vivos o, de los procesos para su obtención. (Correa 1992).

En Estados Unidos, desde el caso Chakrabarty en 1980, se admitió el patentamiento de un ser vivo (una nueva bacteria del grupo de *Pseudomonas* capaz de degradar 4 de los principales componentes del petróleo crudo).

Posteriormente en 1985 en el caso Hibberd se admitió la patentabilidad de plantas (cultivo de tejidos de maíz), así como la de animales en 1988 (con el ratón de "Harvard").

Debido a las presiones de los países industrializados, América Latina y el Caribe han dedicado grandes esfuerzos para revisar y adecuar sus legislaciones en la materia. Así, por ejemplo, México tiene una nueva Ley de Patentes vigente desde el 27 de junio de 1991, en la cual son patentables las variedades vegetales, los procesos biotecnológicos de obtención de fármacoquímicos, medicamentos en general, bebidas y alimentos para consumo animal y humano, fertilizantes, plaguicidas o "productos de actividad biológica".

No obstante la gran controversia con referencia a la patentabilidad de productos y procesos biotecnológicos, se han argumentado en varios foros los pros y los contras de este tipo de monopolio temporal, los países del tercer mundo tienden a modificar sus legislaciones en pro de las patentes como una respuesta a los posibles riesgos de no otorgar patentes (como son las represalias comerciales, Solleiro 1990). Así se ha propiciado la realización de diferentes seminarios y reuniones científicas para el análisis de esos riesgos y de la conveniencia de enrolarse en el cambio, propiciado por la corriente liberal que recorre Latinoamérica. Este tipo de foros recomiendan que la participación de los diferentes países sea activa, reglamentando en favor de nuestro desarrollo y protección.

Así, por ejemplo, se ha recomendado en la medida de lo posible:

1. Buscar que sólo se otorgue protección a procesos.

2. Excluir la posibilidad de patentar variedades vegetales o animales. Se recomienda buscar alternativas como adoptar el sistema de la Unión para la Protección de las Obtenciones Vegetales (POV) y, en el caso de animales, a nivel internacional hay múltiples dudas sobre el patentamiento, por lo que se recomienda mantenerse a la expectativa, mientras no hayan respuestas satisfactorias a estas preguntas.
3. En el caso de conceder patentes a microorganismos será indispensable exigir la descripción completa y depósito de la cepa (Tratado de Budapest, abril 1977).
4. Será necesario organizarse a nivel latinoamericano apoyándose en la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) y en el Programa Regional de Biotecnología (PNUD/ONUDI/UNESCO) para establecer una red de comunicación eficiente, "a nivel Latinoamericano", que de a conocer la información contenida en la patente.
5. Será requisito indispensable la obligación de explotar industrialmente la patente. Esto permitirá promover el uso de nuevas tecnologías mediante el aprovechamiento concreto de la invención, por lo tanto, no bloqueará el progreso tecnológico.
6. Se recomienda que los gobiernos latinoamericanos se reserven el derecho de otorgar licencias obligatorias.
7. La vigencia de los títulos en los países de América Latina puede ser más corta que en los países industrializados, lo que proporcionaría un acceso más libre y rápido al conocimiento.
8. Finalmente, se recomienda a los países latinoamericanos y del Caribe elaborar en forma conjunta un programa de desarrollo en biotecnología, que les permita abordar con mayor seguridad los problemas inherentes al cambio propiciado por la revolución tecnológica actual.

Dicho programa deberá contemplar los diferentes sectores de la biotecnología, con el propósito de propiciar el desarrollo o apoyo a los Centros de Investigación Básica, Laboratorios de Transferencia de Biotecnología, Comités ad hoc relacionados con la implementación de reglamentos relacionados con la Legislación de Patentes y la Bioseguridad. Este último tema es de gran importancia para nuestros países, ya que es importante establecer reglamentos que impidan que América Latina llegue a convertirse en territorio de prueba, sobre todo tomando en cuenta el peligro que correría el germoplasma vegetal y animal concentrado en esta zona privilegiada por la naturaleza.

Al respecto, algunos países desarrollados como Australia y Estados Unidos de América, tienen reglamentaciones precisas con referencia a la evaluación en el campo de organismos genéticamente modificados (National Research Council 1989).

El Consejo Nacional de Investigaciones (NRC) de la Académica Nacional de Ciencias, dio 7 recomendaciones para la evaluación de plantas transgénicas, ya que en animales se abstuvieron por la complejidad que involucra su introducción al ambiente. Sus consideraciones se basan en las condiciones ecológicas que prevalecen en los Estados Unidos, sobre todo en lo referente a especies silvestres. Las 7 consideraciones son:

1. Las plantas modificadas por métodos clásicos de mejoramiento, se juzgan seguras para la evaluación en campo, sobre la base de las experiencias con cientos de miles de genotipos evaluados en el campo por varias décadas en ese país.

El Comité enfatiza que los métodos comunes para tomar decisiones acerca de las introducciones de plantas clásicamente mejoradas son completamente apropiadas.

2. Los granos de plantas modificadas por métodos moleculares y celulares no deben poseer riesgos diferentes de aquellos modificados por métodos genéticos clásicos para características similares. Conforme los métodos moleculares sean más específicos, los usuarios de estos métodos estarán más seguros de las características que introducen a la planta.

Las características que no sean familiares en una planta específica requerirán una evaluación cuidadosa en pruebas a pequeña escala, donde las plantas que exhiban fenotipos indeseables serán destruidas.

3. En este momento, el potencial de las malezas para aumentar sus poblaciones es el principal riesgo ambiental que se percibe para introducciones de plantas genéticamente modificadas.
4. El confinamiento es la condición primaria para que se tenga seguridad de introducciones en campo de plantas clásicamente modificadas.
5. Dependiendo de las especies cultivadas las opciones probadas de confinamiento incluyen los sistemas biológicos, químicos, físicos de espacio y aislamiento temporal, así como el tamaño de la parcela experimental.
6. Las plantas cultivadas dentro de un confinamiento para propósitos experimentales raramente causan problemas en

el ecosistema natural.

7. Las opciones de confinamiento establecidas son tan aplicables a las introducciones en campo de plantas modificadas por métodos moleculares y celulares, como para las introducciones de plantas modificadas por métodos genéticos clásicos.

Quizás, si finalmente uniéramos esfuerzos los países de América Latina y el Caribe (sueño de muchos de nuestros héroes nacionales), podríamos contribuir a la conservación y desarrollo armónico del sector agropecuario en nuestra región y por qué no en el mundo.

BIBLIOGRAFIA

1. Alissa A., R. Jonard; H. Serieys; P. Vincourt. 1986. La culture d'amélioration du Tournesol C.R. Acad. Sc. Paris t. 302, Serie II, no %, p. 161-164.
2. Al-Yasiri, S.A.; Coyne, D.P. 1966. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. *Crop. Science* 6:59-60.
3. Azpíroz, H.S.; P. Vincourt, H; H, Serieys; A. Gallais. 1987. La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'accélération du cycle de selection des lignés de tournesol et ses effets morphovégétatifs. *Helia* 10, 35-38.
4. Barley D., Denis L.; Backert, M. 1989. Comparison of the aptitude for anter culture in some androgenic doubled haploid maize lines. *Maydica* 34: 303-308.
5. Bohorova, N.E.; Hoisington, D. 1991. Maize tissue at CIMMYT. Memorias del Simposio: Actualidades de la Biotecnología Vegetal en México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. 27-29 nov.
6. Bull, A.T.; G. Holt; M.D., Lilly. 1982. *Biotechnology: International Trends and Perspectives*, OECD. Paris.
7. Clapham, D. 1971. *In vitro* development of callus from de pollen of *Lolium* and *Hordeum* Z. *Pflanzenzucht* 65: 285-292.
8. Correa, C.M. 1990. Patentes y Biotecnología: Opciones para América Latina. En: *Biotecnología y patentes*. *Revista de Derecho Industrial*. No. 34: 5-53.
9. Coyne, D.P. 1964. Species hybridization in *Phaseolus* J. *Hered.* 55: 5-6.

10. Cuyang, T.W.; Hu, H.; Chuag, C.C.; Tseng, C.C. 1973. Inductions of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Sci. Sinica* 16: 79-95.
11. Chu, C.C.; Wang, C.C.; Sun, C.S.; Hsu, C.; Yin, K.C.; Chu, C.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin* 16: 659-688.
12. Fisher, M. 1990. Aplicaciones de la biotecnología en la mejora de cereales. (Mimeografiado). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. p. 48.
13. Fischer, M.; Azpíroz, S.; Hoisington, D. 1991. Comparison of RFLP and RAPD technologies for analyzing genetic diversity in open-pollinated maize varieties. *The International Society for Plant Molecular Biology. Third International Congress Molecular Biology of Plant Growth and Development. Tucson, Arizona.* 6-11.
14. Fischhoff, D.A.; Bowdish, K.S.; Perlak, F.L.; Marrone, P.G.; Cormick, S.M.; Niedermeyer, J.G.; Dean, D.A.; Kisano-Kretzmer, K.; Mayer, E.J.; Rochester, D.E.; Rogers, S.G.; Fraley, R.T. 1987. Insect-tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technologie* 5: 807-813.
15. Fromm, M.; Taylor, L.P.; Walbot, V. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 5824-5828.
16. Gould, J.; Devey, M.; Hasegawa, O.; Ulian, C.E.; Peterson, G.; Smith, R. 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex plant. *Physiol.* 95: 426-434.
17. Green, C.E.; Phillips, R.I. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. *Crop Sci.* 15: 417-421.
18. Grimsley, N.; Hohn, Y.T.; Davis, J.W.; Hohn, B. 1987. *Agrobacterium* mediated delivery of infections maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
19. Grodzcker, T.; Williams, J.; Sharp, P.; Sambrook, J. 1974. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. *Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol.* 39: 439-446.
20. Hanna, W.W.; Bashaw, E.C. 1987. Apomixis: its identification and use in plant breeding. *Crop Sc.* 27: 1136.
21. Herrera-Estrella, L.; Depicker, A.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a (Ti)-plasmid derived vector. *Nature* 303: 209-213.
22. Klee, H.; Horsch, R.; Rogers, S. 1987. *Agrobacterium* mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 487-496.
23. Klein, T.M.; Wolf, E.D.; Wu, R.; Sandorf, J.C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327: 70-73.
24. Klein, T.M.; Gradziel, T.; Fromm, M.E.; Sandford, J.C. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cell by high-velocity microprojectiles. *Biotechnology* 6: 559-663.
25. López, H.M.; J.P. Martínez. 1993. Diferencias genotípicas en diversas especies de *Brucella*, detectadas por la reacción en cadena de la polimerasa. *En prensa. Apdo. Postal 3-425, Monterrey, Nuevo León.*
26. Martínez, J.P.; D.S. Leal; H. Barrera, E.L. Cab. 1993. Detección de *Brucella abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. *En prensa. Apdo. Postal 3-425. Monterrey, Nuevo León.*
27. Melchinger, A.E.; Messmer, M.M.; Lee, M.; Woodman, W.L.; Lamkey, K.R. 1991. Diversity and relationships among U.S. maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 31: 669-678.
28. Nakata, K.; Tanaka, M. 1968. Differentiation of embryos from developing germ cells in anther culture of Tobacco. *Jap. J. Genet.* 43: 65-71.
29. National Research Council. 1989. Field testing of Genetically Modified Organisms. N.C.R., U.S.A.
30. Rabakoarihanta, A.D.; E.S. Mok; M.C. Mok. 1979. Fertilization an early embryo development in reciprocal interspecific crosses of *Phaseolus*. *Theor. Appl. Genet* 54 (2): 55-59.
31. Rhodes, C.A.; Lowe, K.S.; Ruby, K.L. 1988. A plant regeneration from protoplast insolated from embriogenic maize cell cultures. *Biotechnology* 6: 56-60.

32. -----; Pierce, D.A.; Metler, T.J.; Mascarenhas, D.; Detmer, J.J. 1988b. Genetically transformed Maize Plants from Protoplasts. *Science* 240: 204-206.
33. Rogers, S.G.; Horsch, R.B.; Fraley, R.T. 1985. Gene transfer in plants: Production of transformed plants using ti-plasmid vector. In *Methods for Plant Molecular Biology* (ed). A. Weisbach & H. Weissbach 423-436. Acad. Press New York.
34. Savidan, Y. 1986. Apomixis as a new tool to increase grain crop productions in semi-arid tropics, a research proyect. *Agriculture, Ecosystems and Environment*. 16: 285
35. Smith J., S.S.; Smith, O.S. 1991. Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among U.S. maize hibrids. *Crop Sc.* 31: 893-899.
36. Solleiro, J.L. 1990. Patentes en Biotecnología: Oportunidades, Amenazas y opciones para América Latina en: *Biotecnología y Patentes*. *Revista de Derecho Industrial* No. 34.
37. -----, 1991. Patentes en Biotecnología: Oportunidades, Amenazas y opciones para América Latina y el Caribe. En: *Políticas de la Propiedad Industrial de Inventos Biotecnológicos y uso de germoplasma en América Latina y el Caribe*. Ed. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Pág. 343-380.
38. Welsh, J.; McClelland, M. 1990. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
39. Williams J., G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.W. 1990. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18: 6531-6535.
40. Zambryski, P.; Herrera-Estrella, L.; De Block, M.; Van Montagu, M.; Schell, J. 1984. The use of the Ti-plasmid of *Agrobacterium* to study the transfer and expression of foreign DNA in plant cells; new vectors and methods. In: *Genetic Engineering: Principles & Methods*. (ed) J.K. Setlow. S.A., Hollaender 6: 253-278. New York/London: Plenum.