



**Red Regional de Cooperacion en Educacion
Superior y Capacitacion Agropecuaria y
de los Recursos Naturales Renovables**

Centro Interamericano de
Documentación e Información
Agrícola

26 ENE 1989

C I D I A
Turrialba, Costa Rica

MEMORIA

✓
**SEMINARIO - TALLER
BIOTECNOLOGIA Y LAS CIENCIAS AGRICOLAS
AVANCES Y APLICACIONES**

**Universidad del Valle
Ciudad de Guatemala
23 - 25 de agosto de 1989**

CONTENIDO

	Pag.
PRESENTACION	i
INTRODUCCION	1
POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP): APLICACIONES AL MAPEO CROMOSOMICO Y AL MEJORAMIENTO GENETICO DE LAS PLANTAS Luis Mejía	3
CONSERVACION "in vitro" DE GERMOPLASMA Nelson Espinoza Ramirez	10
INGENIERIA GENETICA Miguel A. Gómez	15
EVIDENCIA Y APLICACIONES DE ISOENZIMAS EN POBLACIONES VEGETALES Leslie D. Gottlieb	20
MEJORAMIENTO GENETICO EN MUSA SP. CON EL USO DE LAS TECNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS Y DE FITOPATOLOGIA Jean-Vincent Escalant	35
LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO Juan José Peña Cabriales	42
LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES Y LA FERTILIZACION "in vitro" COMO TECNICAS BIOGENETICAS PARA CONSERVAR, MULTIPLICAR Y DIFUNDIR GERMOPLASMA CRIOLLO EN PELIGRO DE EXTINCION Richard Taylor	46
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	61
EVALUACION	68
PROGRAMA GENERAL DEL EVENTO	70
COMITE ORGANIZADOR	72
COMITE NACIONAL REDCA	73

PRESENTACION

El Comité Nacional de la Red Regional de Cooperación en Educación Superior y Capacitación Agropecuaria y de los Recursos Naturales Renovables (REDCA), compenetrado de la importancia que revisten para nuestro país los constantes avances tecnológicos, especialmente los relacionados con el campo agropecuario, decidió organizar un evento para conocer y dar a conocer nuevos conocimientos y técnicas en el área de la biotecnología.

En los últimos años, las técnicas biotecnológicas han evolucionado en forma acelerada y con resultados sorprendentes. Sin embargo es fácil comprender que aún desconocemos los efectos que a la larga pueden suceder y que pudieran poner en peligro el mismo desarrollo agropecuario ya sea por que los avances sean tan grandes que se escapen al control de los científicos e investigadores o que pudieran ocasionar la pérdida de nuestros gernoplasmas autóctonos.

De todas formas, el tema es de gran actualidad e interés para nuestros profesionales, a quienes fue dirigido es Seminario, para fomentar el interés en conocer algunos aspectos sobre "Biotecnología y las Ciencias Agrícolas, Avances y Aplicaciones".

El Comité Nacional de REDCA con la colaboración de profesionales de la FAUSAC y con la participación de distintas instituciones, conformó el Comité Organizador, integrado por relevantes personalidades de reconocido prestigio que han mantenido y realizado trabajos relacionados con las técnicas biotecnológicas.

Este Comité, auxiliado por la Representación de CATIE en Guatemala, elaboró un programa con los objetivos y temas a tratar, así como un listado de profesionales extranjeros y nacionales para que dictaran conferencias.

Deseamos dejar constancia de nuestro sincero agradecimiento por el importante aporte proporcionado por AID Guatemala, el cual nos permitió invitar a destacados conferencistas de Estados Unidos, México, Perú, Costa Rica, Francia y por supuesto Guatemala. Asimismo nuestro agradecimiento al Rector Magnífico de la Universidad de San Carlos de Guatemala, a la Asociación Nacional del Café (ANACAFE), quienes también nos brindarán valiosos aportes y por último a la Universidad del Valle que nos proporcionó sus instalaciones para la realización del evento.

El Comité Nacional de REDCA espera haber contribuido en algo positivo con la comunidad científica guatemalteca, en cuyas manos depositamos el presente documento, concientes de que solo representa un primer esfuerzo y aproximación a tan fascinante como complejo tema, como lo es la Biotecnología.

Ing. Bladimiro Villeda S.
Representante y Coordinador
de CATIE en Guatemala

INTRODUCCION

Nos encontramos en la actualidad al inicio de una "revolución tecnológica" que sigue a la "revolución verde" de la década pasada y que seguramente tendrá efectos, aún en gran parte imprevistos, sobre la agricultura a nivel mundial y, particularmente, sobre la agricultura y la vida de los habitantes de los países subdesarrollados.

Se entiende por biotecnología, en el sentido estricto, todas aquellas técnicas que utilizan organismos vivos o sustancias derivadas de ellos para fabricar o modificar un producto. Algunas técnicas recientes asociadas con la biotecnología en la agricultura son el cultivo de tejidos, la fusión de protoplastos (células vegetales desprovistas de pared celular) o hibridación somática y las manipulaciones de ADN (ácido desoxiribonucleico), el material genético recombinante o ingeniería genética. Las aplicaciones de estas técnicas pueden incidir sobre la producción primaria (mejoramiento de plantas y fijación de nitrógeno) o sobre la bioconversión de productos y deshechos agrícolas para la producción de alimentos.

La biotecnología es una consecuencia directa del desarrollo de las técnicas y conceptos de la biología molecular el cual se basa en el avance de las ciencias biológicas y se produce en forma vertiginosa a partir del descubrimiento de la naturaleza y estructura del material genético a mediados del presente siglo. A diferencia de lo que sucedió en la época de la revolución verde, una gran parte de las investigaciones en biotecnología se realizan en laboratorios privados, muchos de ellos subvencionados por las grandes compañías multinacionales productoras de químicos para la agricultura, y los procedimientos y resultados derivados de éstas están protegidos por patentes comerciales. En este sentido, la revolución biotecnológica

podría contribuir a hacer aún más grande la brecha que nos separa de los países industrializados y a aumentar nuestra dependencia.

Con relación a esta problemática, en un artículo titulado "La Biotecnología y el Tercer Mundo" aparecido recientemente en El Correo de la UNESCO (marzo, 1987. p. 23-33) A. Sasson hace las siguientes recomendaciones:

1. Establecer prioridades y objetivos económicos que permitan obtener el máximo beneficio de los recursos existentes mediante una política y un programa nacional bien definidos;
2. Adaptar y aplicar en la escala adecuada una biotecnología barata, de probada eficacia, de fácil transferencia y adaptable a las condiciones locales;
3. Asociar los nuevos procedimientos de la biotecnología con los métodos clásicos de probada eficiencia; y,
4. Formar una comunidad científica local capaz de utilizar las técnicas más avanzadas y de adaptarlas a la investigación de problemas locales.

Es claro que la cooperación internacional, particularmente la cooperación regional, resulta ser fundamental en la promoción y transferencia de la nueva biotecnología. Este Seminario-Taller organizado por REDCA nos brinda la oportunidad de reunirnos con eminentes investigadores de diferentes países para conocer sobre la situación actual de los avances así como de discutir críticamente sobre las implicaciones de los mismos para el desarrollo de la ciencia y la agricultura en nuestros países.

Esperamos que de las Conclusiones y Recomendaciones de este evento surjan directrices para la formulación de las políticas que regirán la investigación y la aplicación de la biotecnología en nuestro medio.

Dr. Luis Mejía
Presidente, Comité Organizador

**POLIMORFISMO DE FRAGMENTOS DE RESTRICCIÓN (RFLP):
APLICACIONES AL MAPEO CROMOSÓMICO Y AL MEJORAMIENTO GENÉTICO
DE LAS PLANTAS.**

**Luis Mejía
Facultad de Agronomía, USAC
Guatemala**

A. Introducción

La nueva tecnología de ADN recombinante ha permitido realizar grandes avances en muchas áreas de la biología. Una de estas es el uso de fragmentos de ADN como marcadores genéticos para seguir segmentos cromosómicos a través de diferentes cruces. El polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción ("restriction fragment length polymorphism" o RFLP) depende de la variación natural en las secuencias de bases en el ADN. Esta nueva tecnología podría tener un gran impacto en la genética y en el mejoramiento de las plantas.

B. Polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción (RFLP)

La información genética de todos los organismos está contenida en la secuencia de nucleótidos del ADN de los cromosomas nucleares y el genoma de los organelos. A pesar de que el ADN es capaz de replicarse con un alto grado de fidelidad, existen diversos mecanismos que introducen cambios mutacionales a esta información. Es tal la cantidad de ADN en una célula eucariótica que dos organismos nunca son idénticos en las secuencias de bases del ADN que conforman su genoma. Existe por lo tanto un alto grado de variabilidad a este nivel en las poblaciones vegetales.

Una forma de determinar y de utilizar esta variación natural es mediante la digestión del ADN vegetal con ciertas nucleasas provenientes de microorganismos llamadas enzimas

de restricción, las cuales reconocen secuencias de nucleótidos específicas, llamadas sitios de restricción, en las que introducen cortes para producir fragmentos. El número y el tamaño de los fragmentos producidos por la digestión con una enzima particular reflejan la distribución de los sitios de restricción en una molécula de ADN particular. Los fragmentos de restricción pueden ser separados de acuerdo a su tamaño por electroforesis en gel de agarosa y pueden ser visualizados en forma de bandas de luz ultravioleta después de su coloración con bromuro de etidio. Cuando la molécula de ADN es pequeña, como en el caso del ADN de cloroplastos, la cantidad de fragmentos es pequeña, alrededor de 40 en caso de cloroplastos, y el patrón de restricción es fácilmente discernible. Los ADN de cloroplastos que difieren en la secuencia de bases por substituciones de estas o por rearrreglos causados por inserciones, deleciones o inversiones, producirán fragmentos de restricción de diferentes tamaños, estas diferencias se conocen como polimorfismo en el largo de los fragmentos de restricción o RFLP y pueden ser usados como una medida directa de la variabilidad genética.

Handwritten note: HMP 2000 2000

El análisis de RFLP también puede ser aplicado al ADN cromosómico, sin embargo, es más complejo debido a que como producto de una digestión se generan millones de fragmentos los cuales no pueden distinguirse el uno del otro y después de su revelación aparecen como una mancha continua. El uso de sondas de ADN para hibridación permite discriminar fragmentos específicos y detectar de esta manera diferencias en el ADN de diferentes organismos.

C. Bibliotecas de Sondas

Para visualizar los RFLPs del ADN nuclear se utilizan pequeños segmentos de ADN como sondas para detectar por hibridación fragmentos de restricción específicos. El primer paso en el uso de esta técnica es la preparación de

las sondas mediante la construcción de lo que se conoce como una biblioteca genómica. Se aísla el ADN de la especie bajo estudio, se digiere con una enzima de restricción y se separan fragmentos pequeños (de 2 a 5 kilobases). Para obtener una buena cantidad de cada uno de estos fragmentos y poder utilizar como sondas, estos se "clonan" ligándolos individualmente a un plásmido y luego transformando réplica el plásmido en cada división para formar un clon, al aislar el plásmido de un cultivo de bacterias transformadas se obtiene una gran cantidad de cada fragmento de restricción para ser usado como sonda de hibridación.

Las sondas son usadas para detectar RFLPs en preparaciones de ADN nuclear para lo cual primero se aísla el ADN, luego se digiere con una enzima de restricción y se fracciona por electroforesis. El ADN de los fragmentos se denatura por tratamiento alcalino y se transfiere a un filtro por un proceso que se conoce como transferencia "Southern" (o "Southern blotting" por ser similar a la transferencia de un párrafo escrito con tinta fresca a un papel secante). El filtro es sondeado con una sonda de la biblioteca previamente denaturada y marcada radioactivamente con fósforo 32. La sonda se hibridiza con los fragmentos en el filtro que muestran homología, el sitio de hibridación es revelado por autoradiografía.

D. Construcción de Mapas Genéticos con RFLPs

Al cruzar dos progenitores se produce una F1 de naturaleza híbrida, ambos genomas se recombinan en esta durante la meiosis y al autofecundarse la F2 resultante contendrá cromosomas que son mosaicos de diferentes segmentos de los cromosomas originales. Este proceso de recombinación permite hacer mapas cromosómicos en base a dos principios.

- 1) Los segmentos cromosómicos que se encuentran localizados en diferentes cromosomas se recombinan independientemente.
- 2) Los segmentos cromosómicos localizados en el mismo cromosoma, o ligados, se recombinan con una frecuencia que depende de la distancia física que los separa.

Los mapas cromosómicos convencionales se han realizado con marcadores que se expresan fenotípicamente, tales como en el color de la flor, la altura de la planta, las características del endosperma, etc. La recombinación de estos marcadores morfológicos durante la formación de gametos permite inferir el comportamiento de los segmentos cromosómicos a los cuales se encuentran ligados de manera indirecta. Los marcadores moleculares, como los RFLPs, permiten seguir a los segmentos cromosómicos directamente. Mediante su uso es posible visualizar el genotipo de la planta directamente y no indirectamente a través del genotipo que es producto de la acción génica. Los marcadores moleculares segregan de igual manera que los marcadores convencionales, de acuerdo a los mismos principios Mendelianos, por lo cual sus patrones de segregación pueden analizarse con las herramientas tradicionales del análisis genético

Los marcadores moleculares tienen muchas ventajas sobre los marcadores morfológicos para la construcción de mapas genéticos, tales como ser una forma de variación natural que se presenta en altos niveles, pueden ser analizados en cualquier parte de la planta y en cualquier fase de desarrollo, no se produce efecto fenotípico, una sola población producto de un solo cruce es suficiente para la construcción de un mapa detallado, no hay efecto del ambiente porque no hay expresión génica, tampoco hay dominancia u otras interacciones génicas.

En la actualidad se cuenta con mapas de RFLPs para varias plantas de importancia en la agricultura, tales como arroz, maiz y tomate (ver referencias específicas).

E. Uso de RFLPs en el Mejoramiento Genético de las Plantas

Los mapas con RFLPs pueden ser muy útiles en el mejoramiento genético de las plantas cuando se utilizan conjuntamente con marcadores convencionales de importancia económica, de esta manera es posible realizar una selección indirecta de los mismos. Cuando se desea seleccionar un gen particular, pero su selección directa es difícil por uno u otro motivo, es posible seleccionar uno o más marcadores RFLP ligados estrechamente con éste. La selección indirecta puede ser ventajosa por ejemplo en la selección de alelos recesivos o en la selección de plántulas en una fase temprana de desarrollo.

Los caracteres cuantitativos, determinados por varios genes localizados en diferentes cromosomas, con efecto aditivo y grandemente influenciados por el ambiente, son difíciles de analizar por métodos mendelianos convencionales.

Los marcadores RFLP permiten realizar una disección genética de estos caracteres y correlacionarlos con segmentos cromosómicos específicos para luego seleccionar aquellos segmentos con efecto positivo e introducirlos en un mismo individuo. De esta manera se vuelve posible, por primera vez, analizar los caracteres cuantitativos, entre los que se cuentan la mayoría de características de importancia agronómica, por medio del análisis mendeliano convencional.

F. Bibliografía

Revisiones Generales

BOTSTEIN, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980) Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.

BECKMANN, J.S., Soller, M., (1986). Restriction fragment length polymorphisms and genetic improvement of agricultura species. *Euphytica* 35:111-124.

LANDRY, B., Michelmore, R.W. (1987). Methods and applications of restriction fragment length polymorphisms analysis to plants. In: *Tayloring genes for crop improvement.* eds: Bruening, G., Harada, J., Kosuge, T., Hollander, A., Plenum Press, New York.

BECKMANN, J.S. (1988). Oligonucleotide polymorphisms: A new tool for genomic genetics. *Biotechnology* 6:1061-1064.

WATKINS, P.C. (1988). Restriction fragment length polymorphism (RFLP): Applications in human chromosome mapping and genetic disease research. *Biotechniques* 6:310-320.

KOCHERT, G. (1989). Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications. *The Rockefeller Foundation International Program on Rice Biotechnology.* 15pp.

TANKSLEY, S.D., Young, N.D., Paterson, A.H., Bonierbale, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: New tools for an old science. *Biotechnology* 7:257-264.

ESTUDIOS EVOLUCIONARIOS Y SISTEMATICOS

BONIERBALE, M.W., Plaisted, R.L., Tanksley, S.D. (1988). RFLP maps based on a common set of clones reveal nodes of chromosomal evolution in potato and tomato. *Genetics* 120:1095-1103.

SONG, K.M., Osborn, T.C., Williams, P.H. (1988). Brassica taxonomy based on nuclear restriction fragment length polymorphisms (RFLPs). *Theor. Appl. Genet.* 75:784-794.

NIVELES DE POLIMORFISMO RFLP EN VARIAS PLANTAS

APUYA, N.R., Frazier, B.L., Keim, P., Roth, J., Lark, K.G. (1988). Restriction fragment length polymorphisms as genetic markers in soybean, *Glycine max* (L.) Merrill. *Theor. Appl. Genet.* 75:889-901.

FIGDORÉ, S.S., Kennari, W.C., Song, K.M., Slocum, M.K., Osborn, T.C. (1988). Assessment of the degree of restriction fragment length polymorphism in *Brassica*. *Theor. Appl. Genet.* 75:833-840.

MAPAS PARA VARIAS PLANTAS

HELENTJARIS, T. (1986). Construction of genetics linkage maps in maize and tomato using restriction fragment length polymorphisms. *Theor. Appl. Genet.* 72:761-769.

HELENTJARIS, T. (1987). A genetic linkage map for maize based on RFLPs. *Trends in Genet.* 3:217-221.

MCCOUCH, S.R., Kochert, G., Yu, Z.H., Wang, Z.Y., Rhush, G.S., Coffman, W.R., Tanksley, S.D. (1988). Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 176:815-829.

CARACTERES CUANTITATIVOS

BECKMANN, J.S., Soller, M. (1988). Detection of linkage between marker loci and loci affecting quantitative traits in crosses between segregating populations. *Theor. Appl. Genet.* 76:228-236.

PATERSON, A.H., Lander, E.S., Hewitt, J.D., Peterson, S., Lincoln, S.E., Tanksley, S.D. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726.

TANKSLEY, S.D., Hewitt, J. (1988). Use of molecular markers in breeding for soluble solids content in tomato - a re-examination. *Theor. Appl. Genet.* 75:811-823.

LANDER, E.S., Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.

MARTIN, B., Nienhuis, J., King, G., Schaefer, A. (1989) Restriction fragment length polymorphisms associated with water use efficiency in tomato. *Science* 243:1725-1728.

CONSERVACION "in vitro" DE GERMOPLASMA

**Nelson Espinoza Ramirez
Centro Internacional de la Papa
Peru**

La preservación de germoplasma es una medida de asegurar la disponibilidad de material genético cuando las necesidades lo requieran.

Para la mayoría de los cultivos propagados sexualmente, la semilla es la forma apropiada de conservar germoplasma, debido a su bajo contenido de humedad que permite a las células del embrión vivir en condiciones mínimas cuando se les somete a bajas temperaturas de almacenamiento.

Pero existen otros cultivos para los que su propagación sexual es dificultosa, ya sea que sus semillas tienen una viabilidad muy baja o porque segregan en una tasa muy alta y por lo tanto no se puede conservar el genotipo. Este tipo de cultivos se propagan vegetativamente por medio de esquejes, estolones, tubérculos, bulbos, rizomas, cornos, estacas e injertos.

Por lo tanto conservar material genético bajo estos sistemas de propagación vegetativa demanda:

- Amplios terrenos de cultivo
- Manejo agronómico apropiado
- Equipo y maquinaria para preparación del terreno
- Fertilizantes y pesticidas
- Mano de obra intensa

Con una duración de la conservación limitada y con los riesgos de que sea destruido por plagas, infecciones (bacterias o virus), cambios atmosféricos intempestivos (heladas, sequía).

Es aquí donde la técnica de conservación "in vitro" juega un papel muy importante, donde la planta entera o segmentos de ella pueden ser almacenadas por periodos prolongados sin que sufran alteraciones o pérdida de las características genotípicas.

Las células aisladas, protoplastos y los callos son explantes que presentan variabilidad genética en alto grado, por lo que no pueden utilizarlos para conservar germoplasma. Son los meristemas y las yemas de las plantas, los explantes más estables que se conocen y se usan para esta técnica.

La conservación "in vitro" se puede catalogar en tres tipos: conservación a corto, mediano y largo plazo. La conservación a corto plazo utiliza los mismos medios de cultivo que se usan en la micropropagación y se puede mantener el germoplasma por periodos que varían entre unas semanas hasta 3 ó 4 meses y, por consiguiente, es necesario hacer transferencias a medios frescos frecuentemente.

La conservación a mediano plazo prolonga las transferencias a medio fresco entre 2 a 5 años, dependiendo de las especies a preservarse. Para conseguir este objetivo es necesario usar temperaturas por debajo de las que normalmente se utilizan para la micropropagación, y se asocian a medios de cultivo para crecimiento mínimo. Estos medios reducen el metabolismo de las plantas por stress osmótico o porque contiene inhibidores del crecimiento. Las sustancias químicas frecuentemente usadas para causar stress osmótico son el manitol y el sorbitol, y como inhibidor el ácido abscísico.

La conservación a largo plazo usa el método de la criopreservación, en donde los procesos metabólicos prácticamente se inactivan a temperaturas de -196°C logradas con el nitrógeno líquido. Se puede postular que se puede almacenar por periodos indefinidos. Debido a que el metabolismo celular está completamente suspendido, el tiempo o la duración del proceso de criopreservación no afecta la posterior sobrevivencia de los tejidos. Los periodos críticos para la sobrevivencia de los tejidos se presentan en el momento mismo del enfriamiento o en el descongelamiento.

La planta que se quiere criopreservar debe someterse a un pretratamiento de varios días a temperaturas de 4 a 5°C , para obtener mejores resultados en todo el proceso. Luego se escinden meristemas o yemas, las cuales se incuban con sustancias crioprotectoras con la finalidad de evitar la formación de cristales de hielo dentro de las células. Los crioprotectores se adicionan gradualmente para evitar la plasmolisis y se realiza dentro de un baño de hielo.

Entre los crioprotectores más usados están el glicerol, dimetil sulfóxido (DMSO), etilenglicol, glucosa, etc. Cumplido el pretratamiento, se procede a la etapa de congelamiento que puede ser de tres tipos:

- Rápido, donde la temperatura decrece entre 50 a 120°C cada minuto hasta alcanzar los -196°C .
- Lento, donde la temperatura decrece entre 0.1 a 10°C cada minuto.
- Combinado, en donde se congela en forma lenta hasta que se alcance la temperatura -40°C y de ahí en adelante se procede a congelar rápidamente hasta -196°C .

Para el proceso de congelamiento se necesitan envases resistentes a temperaturas bajas en donde se colocará el explante inmerso en el crioprotector. Existen equipos para criopreservación, que donde están programados los sistemas de congelamiento según las necesidades y que realizan todo el proceso en forma automática.

Cuando se requiere descongelar el explante, se somete el envase que lo contiene a un baño de agua a 40°C hasta que tome la temperatura ambiente, luego se procede a sembrarlo en los medios de micropropagación. Dependiendo de las especies, estado fisiológico del explante y un procedimiento adecuado de criopreservación, el éxito del proceso va de un 60 a 80%.

En todos los procesos citados de conservación de germoplasma se recomienda hacer un control electroforético (proteínas totales, isoenzimas), para determinar si en el periodo de almacenamiento pudo haberse producido cambios que afecten el genotipo.

Una condición que debe tenerse en cuenta para conservar germoplasma es que el material debe estar libre de patógenos. En caso que el material esté contaminado con patógenos, se procederá a su limpieza antes de someterlo a conservación "in vitro".

Los hongos y bactericidas son controlables por fungicidas y antibióticos antes de pasar la planta a condiciones "in vitro".

Para limpiar de virus una planta se puede usar la termoterapia asociada al cultivo de meristemas. El proceso consiste en someter la planta constantemente a temperaturas altas (en papa se usa 30°/36°C; en camote 34°/40°C) por un periodo de 30 días, luego se cortan segmentos individuales

de tallo que contengan un nudo. Se esterilizan estos segmentos con alcohol seguido de hipoclorito de calcio por 15 minutos. Se procede a lavar los segmentos con agua estéril y se escinden los meristemos bajo un estereoscopio, en condiciones de asepsia.

El meristemo debe ser lo más pequeño posible para evitar que contenga tejido vascular que es por donde se transportan los virus; la temperatura alta inhibe la replicación de los virus. El meristemo aislado es sembrado en medios de cultivo apropiados bajo los cuales se desarrolla, y en algunas semanas se obtiene una planta completa. Esta planta se micropropaga para tener material suficiente para poder realizar las pruebas de detección de virus.

Las plantas indicadoras, las pruebas serológicas (latex, ELISA), la microscopia electrónica nos ayudan a comprobar la eliminación de los virus.

Es el material libre de patógenos el que se debe utilizar para ser conservado "in vitro" y para el intercambio de germoplasma entre países. También es usado para obtener material para micropropagación para abastecer de semilla pre-básica a los programas nacionales de certificación.

INGENIERIA GENETICA

Dr. Miguel A. Gómez L.
CINVESTAV-IRAPUATO
México

La Ingeniería Genética consiste en la manipulación y transferencia de genes a organismos heterólogos, con el fin de conferir características nuevas. Estas pueden ser de resistencia de plagas o para mejorar el contenido nutricional. Esta metodología nació como un complemento para los métodos de Fitomejoramiento Tradicional. La combinación de ambos métodos puede producir resultados impactantes y desventajas de ambos (Tabla 1).

La transferencia de genes a plantas puede llevarse a cabo de diversas maneras en nuestros días. Sin embargo, el método que ha dado los mejores resultados es el uso de Agrobacterium tumefaciens. Esta bacteria, que normalmente se encuentra en el suelo (de ahí el nombre), es capaz de infectar algunas partes aéreas de muchas plantas (principalmente dicotiledóneas) y de provocar tumores. Esto se debe a la transferencia de un segmento de ADN, el T-ADN, al genoma de la planta y su integración. El T-ADN contiene genes tumorales y genes para producir opinas. Las opinas son derivadas de aminoácidos y sirven como fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias.

Los genes tumorales codifican enzimas que sintetizan los reguladores del crecimiento Auxinas y Citocininas, las cuales inducen la proliferación celular incontrolada.

El T-ADN es parte del plástimo Ti (Tumor-Inducing), presente en Agrobacterium. El pTi contiene, además, un grupo de cinco operones llamados genes de virulencia. Estos genes se expresan

como respuesta a la producción por la planta de unos compuestos fenólicos. Estos compuestos se sintetizan en la planta como respuesta a heridas. De tal manera, que la infección de la planta, por la bacteria, produce heridas que estimulan la síntesis de los compuestos fenólicos, los que a su vez inducen la expresión de los genes de virulencia. Estos causan la transferencia de T-ADN a la planta, el cual se encuentra entre dos bordes (ver Figura 1). Estos bordes, de 25 pares de bases (pb) cada uno, son los "Marcadores Moleculares". Cualquier fragmento de T-ADN contenido entre ambos bordes será transferido al genoma vegetal. El lugar de integración es aleatorio e influirá en el nivel de expresión del ADN transferido.

Actualmente los vectores utilizados, todos derivados del pTI, se han modificado, renovando los genes indeseables como los tumorales y dejando sólo las funciones esenciales para la transferencia; por ejemplo: bordes, genes de virulencia, orígenes de replicación, etc.

Una vez teniendo el gen de interés, se transfiere al plásmido Ti entre los dos bordes. Este plásmido "recombinante" se usará después para transformar bacterias, las que infectarán el material vegetal adecuado. Este puede ser explantes de hoja, meristemos o protoplastos. Después de su cultivo y regeneración, será necesario efectuar diversas pruebas sencillas para confirmar la transformación.

Siguiendo esta metodología, actualmente en el CINVESTAV-IRAPUATO se realizan diversos proyectos, principalmente encaminados a producir plantas resistentes a diversas plagas. A continuación se enumeran algunos proyectos, aclarando que todos ellos están en desarrollo:

- La bacteria Pseudomonas syringae P.V. Phaseolicola produce la "Faseolotoxina", la cual inhibe a la Ornitin Carbamoil Transferasa (OCTasa), enzima involucrada en la síntesis de aminoácidos. La toxina puede causar necrosis y muerte total de la planta hospedera (frijol). Bajo ciertas condiciones la bacteria produce una OCTasa resistente, ya que la toxina puede afectar el metabolismo bacteriano. La estrategia ha sido aislar el gene que codifica para la enzima resistente a la toxina, lo que ya ha sido hecho y su posterior transferencia a frijol. De esta manera habrá frijoles resistentes a Pesudomonas.

- También se está trabajando con Bacillus thuringensis. Esta bacteria, al esporular produce un cristal con propiedades entomopatógenas. Se tiene la ventaja de que distintas variedades del Bacillus pueden matar específicamente a distintos tipos de insectos (dipteros, lepidópteros, coleópteros, etc.). Recientemente se aisló el gene que codifica para la proteína que forma el cristal y se transfirió a tabaco (el sistema modelo). Las plantas "transgénicas" obtenidas fueron completamente resistentes a insectos. Ahora se trabaja para la obtención de tomate y frijol resistentes.

- Para obtener plantas resistentes a hongos se trabaja actualmente en la transformación de plantas (frijol, tabaco, tomate) con genes aislados para Quitinasa y B-1,3 Glucanasa. Los sustratos para ambas enzimas no se encuentran en plantas, pero son componentes mayoritarios de las paredes celulares de muchos hongos fitopatógenos. Por ello, se espera que el hacer que estas plantas tengan niveles altos de ambas enzimas, les confiera resistencia contra hongos.

- Igualmente existe otro proyecto encaminado a aislar los genes de proteínas de almacenamiento del amaranto (ricas en aminoácidos esenciales) y su transferencia a plantas con bajo contenido de estos aminoácidos, como maíz.

Como puede verse, todos los proyectos involucran problemas relevantes para México y se basan en plantas con importancia económica y social para el país. Como decía al principio, la Ingeniería Genética es una herramienta que en combinación con el Fitomejoramiento Tradicional y otras metodologías puede contribuir decisivamente a resolver problemas en países subdesarrollados, pero no debe considerarse como la panacea.

Tabla 1. Ventajas y desventajas de Fitomejoramiento Tradicional y la Ingeniería Genética.

	<u>Fitomejoramiento Tradicional</u>	<u>Ingeniería Genética</u>
VENTAJAS	Exito probado en muchas especies	- Escala de tiempo para su aplicación menor que en el otro caso
	Suficiente personal capacitado	- No existe barrera interespecifica
DESVANTAJAS	Escala de tiempo prolongada para su aplicación	- Su uso puede limitarse con sistemas multigénicos
	Uso restringido a especies compatibles	- poco personal entrenado
	Ocacional pérdida de caracteres benéficos originales	- necesidad de infraestructura especial
		- Exito a comprobarse a escala comercial

EVIDENCIA Y APLICACIONES DE ISOENZIMAS EN POBLACIONES VEGETALES

Leslie D. Gottlieb
Departamento de Genética
Universidad de California, Davis

A. Naturaleza, localización subcelular y genética de isoenzimas.

Las isoenzimas pueden ser utilizadas para identificar un alto número de genes los cuales pueden ser usados en el estudio de diversos problemas en genética, en evolución, en ecología, así como en aplicaciones en agricultura. Las isoenzimas son proteínas enzimáticas generalmente codificadas en el núcleo de la célula vegetal y que funcionan en diferentes compartimientos subcelulares, por ejemplo, cloroplastos, mitocondrias, microsomas o en el citosol. Apesar de estar localizadas en diferentes partes de la célula, las isoenzimas catalizan la misma reacción química. En el estudio de las isoenzimas es necesario conocer su herencia o genética, así como su estructura o el número de polipeptidos que componen a la enzima. En las plantas existe un número conservado de isoenzimas, el número de genes que determinan estas isoenzimas es el mismo en todas las plantas, este número se ha conservado debido a que el metabolismo se ha conservado (Fig. 1).

Para realizar un análisis genético, se cruzan individuos que presentan diferentes formas de la misma enzima, formas que tengan diferente movilidad electroforética, y se analiza la segregación de las diferentes isoenzimas representadas éstas por bandas en diferentes posiciones. El resultado del análisis genético es una identificación de qué enzimas están determinadas por alelos en el mismo locus y cuales por diferentes loci. El uso de isoenzimas como marcadores genéticos permite que el genotipo de un individuo pueda determinarse con solo una pequeña cantidad de tejido, los genes que determinan las

enzimas se expresan en todos los tejidos de las plantas, el genotipo puede determinarse inmediatamente después de la germinación. Otra ventaja es que los genes se expresan siempre de manera que ambos alelos pueden ser observados al mismo tiempo. Estos son fáciles de identificar porque sus productos tienen diferente movilidad electroforética. Existen generalmente un alto número de alelos en el mismo locus y éstos muy raramente tienen algún efecto sobre la morfología o la fisiología, es posible muestrear cientos de individuos y muchas poblaciones en un corto período de tiempo. Varias isoenzimas pueden ser también evaluadas en el mismo cruce (Fig. 2).

B. Variación electroforética en poblaciones vegetales

Hasta ahora se han estudiado un total de 450 especies que representan una gran variedad de géneros (Tabla 1). Para describir la variación se determina la proporción de genes que son polimórficos, es decir, la proporción de genes que tienen por lo menos dos alelos. Es una población promedio. Usando muestras muy grandes se ha encontrado que aproximadamente 1/3 de los genes tienen al menos dos alelos. Otra forma de describir la variabilidad en una población es por medio de la probabilidad de que un individuo sea heterocigota en un locus promedio, es decir que sea portador de dos alelos distintos. En las poblaciones vegetales alrededor de 10-11% de los genes en un individuo promedio tendrán dos alelos. Si estudiamos 20 o 40 genes esto significa que esencialmente cada individuo es genéticamente diferente. En general las plantas parecen ser más variables que los animales, por ejemplo, la heterocigocidad promedio en vertebrados es al rededor de 5% y en invertebrados, primordialmente insectos, es alrededor de 10%. Alrededor de 80% de las diferencias dentro de las especies se encuentran dentro de una misma población y no entre diferentes poblaciones, las que difieren entre sí en sólo 22%. Muchos factores influyen el grado de variación, por ejemplo, la

geografía, las especies que se distribuyen en un amplio ámbito geográfico son en general más variables (Tabla 2). Otro factor importante que afecta la cantidad y distribución de la variabilidad es el sistema reproductivo, las especies alógamas, que se reproducen fundamentalmente por fecundación cruzada, son casi dos veces más variables que las especies autógamias. En cuanto a la distribución de la variabilidad, puede decirse que si la especie es altamente autógama, las poblaciones tienden a ser más diversas entre sí que si la planta se reproduce por fertilización cruzada. Con respecto a la forma de vida de la especie, puede notarse que los grandes árboles leñosos, los datos con los que se cuenta son principalmente de coníferas, son extremadamente variables (Tabla 3).

C. Aplicaciones de las isoenzimas en biología de la evolución y genética.

La Figura 3 indica algunas de las aplicaciones de las isoenzimas. La maleza compuesta del género Trogopogón proporciona el mejor ejemplo del origen reciente de un tetraploide, de lo que sucede cuando se combinan genes de los progenitores diploides en el derivado tetraploide. El diploide Dubius y el diploide Pratensis se hibridizan para producir el tetraploide Miscellus, el cual expresa las isoenzimas de ambos progenitores (Fig. 4). Los genes contribuidos por ambos progenitores se expresan en el tetraploide. El análisis de isoenzimas requiere del conocimiento del nivel de ploidia, cuando éste no se conoce puede simplemente contarse el número de isoenzimas y, si éste es mayor que el número conservado, puede inferirse que se trata de un poliploide, aún sin haber hecho el recuento cromosómico ya que el atributo importante de un poliploide es el número de genes que posee y no el número de cromosomas.

También es posible determinar el grado de identidad entre diferentes poblaciones. Las isoenzimas pueden usarse para identificar a los progenitores de una especie, lo cual es crítico para entender la evolución de nuevos atributos en la especie. El maíz y el teosinte proporcionan un ejemplo de un cultivo y su ancestro silvestre que son comunes en Guatemala. Durante muchos años ha existido una controversia muy intensa sobre el origen del maíz, esta controversia se debe a que el maíz es muy diferente a cualquier planta silvestre. Se ha creído que el maíz evolucionó a partir de la hibridación entre teosinte y otra planta silvestre, también se ha argumentado que el teosinte se derivó del maíz y que el maíz es muy antiguo, se han presentado aún otros puntos de vista. El problema ha sido resuelto finalmente mediante el uso de isoenzimas. Los teosintes de México y Guatemala Zea mays subespecie mexicana y subespecie parviglumis son distintos en términos de isoenzimas, en el occidente de Guatemala existe la variedad parviglumis llamada Huehuetenanguensis la cual también es muy distinta. En México existe una división geográfica formada por una franja volcánica, arriba de 1,700 m. se encuentra la subespecie mexicana y abajo de los volcanes se encuentra la subespecie parviglumis. Se han identificado algunas poblaciones de otra especie llamada diploperennis, éste es un maíz perenne el cual es diploide y tiene el mismo número cromosómico que el maíz cultivado, y de la especie perennis que es un tetraploide. Esta separación taxonómica de las diferentes especies y subespecies fue posible mediante el estudio de sus isoenzimas. En un estudio de maíz de México y Guatemala que incluyó alrededor de 100 accesiones y aproximadamente 23 isoenzimas, se encontró que 21 de éstas eran polimórficas y que el gen promedio exhibía muchos alelos, hasta 7 de ellos. El maíz es entonces una planta extremadamente variable, la mayoría de alelos se encuentran sólo en de 1 a 5 accesiones y tienen una frecuencia relativamente baja, de manera que en la naturaleza sólo se

encuentran 1 o 2 veces en cada 100 individuos. Algunos alelos por el contrario son muy frecuentes, alrededor de 10% de los genes se encontraron en todas las accesiones estudiadas. Es posible determinar el grado de similitud de las diferentes poblaciones y por medio de un análisis cluster determinar qué grupos son más similares y el grado de similitud. En maíz se encontró una correlación muy alta entre especies o subespecies y la similitud de isoenzimas. La conclusión del estudio anterior fue que el maíz es indistinguible de *Zea mays* subespecie *parviglumis*, el maíz cultivado se deriva de esta subespecie la cual se encuentra en la vegetación natural y muy raramente hibridiza con el maíz.

Además de estudiar las relaciones entre teosintes y el maíz, ha sido posible estudiar las diferentes variedades de maíz y encontrar la relación entre ellas. Por ejemplo, debido al análisis de isoenzimas se sabe que la variedad llamada "Northern Flint", cultivada en el este de los Estados Unidos, es muy similar al maíz cultivado en el suroeste, Arizona, Nuevo México, y seguramente se deriva de allí. La otra variedad, cultivada en el sureste, Alabama, Florida, es llamada "Southern Dent" y se deriva del maíz cultivado en el sur de México y fué llevado al sur de los Estados Unidos por los Españoles. El "Southern Dent" y el "Northern Flint" son muy diferentes en términos de isoenzimas, ambos se hibridizan para producir el "Midwestern Dent" que es el principal maíz cultivado en los Estados Unidos.

El análisis de isoenzimas también ha sido usado para estudiar la relación entre pares de especies. La Tabla 4 lista todas las especies en las cuales se conoce con certeza que una especie particular genética es una medida de la probabilidad de que si se toma un alelo de una especie y otro de otra especie, éstos sean iguales. En el primer caso

listado la identidad es de 94%, lo cual indica que las dos especies están estrechamente emparentadas. De esta manera es posible reconocer a los progenitores de una especie, lo cual es importante si se quiere entender la evolución de la especie o la evolución de la morfología o de la fisiología.

Las isoenzimas también han sido usadas para examinar especies del mismo género cuando éstas muestran diferente morfología. En Hawaii existen especies de varios géneros que crecen en diferentes habitats y tienen aspectos muy diferentes, sin embargo, los resultados electroforéticos indican que a nivel genético son casi idénticas (Tabla 5). En este caso son las isoenzimas las que revelan la verdadera similitud genética, la morfología se adapta a diferentes habitats y no revela la filogenie. Entonces, la apariencia de la planta no siempre refleja su genotipo, la electróforesis de enzimas es una manera mucho más directa de analizar los genes.

La planta anual del género Stephanomeria en la familia Compositae que crece en el este de Oregon proporciona un ejemplo del uso de las isoenzimas en genética ecológica. En su habitat, esta planta se encuentra en diferentes tamaños, con diferencias en producción de semilla que varían hasta en mil veces a uno. Se recolectaron las plantas más pequeñas y las más grandes con el objeto de determinar el origen de la diferencia en tamaño. Al estudiar los alelos en un número grande de genes y calcular las frecuencias genotípicas no se observó mayor diferencia entre ambas. Al crecer la semilla de estas plantas bajo condiciones uniformes y medir el tamaño de la progenie tampoco se encontró ninguna diferencia. La conclusión es que las diferencias observadas inicialmente pueden ser atribuidas al habitat local de estos individuos.

En cuanto a aplicaciones de las isoenzimas en genética agrícola (Fig. 5), una posibilidad es la construcción de mapas cromosómicos y la detección de ligamiento con genes que determinan resistencia a enfermedades, esterilidad masculina u otros genes de interés agronómico. Es posible también identificar ligamiento entre genes que determinan caracteres cuantitativos, como requerimiento, y genes que afectan a isoenzimas particulares. Usando isoenzimas para distinguir diferentes cultivares, es posible estimar proporciones de alogamia, identificar plantas híbridas inmediatamente después de la germinación y sin tener que esperar hasta la floración en programas de mejoramiento. Es posible supervisar los cambios en variabilidad genética en programas de mejoramiento para evitar las consecuencias de la depresión endogámica. Es posible realizar estudios en los parientes silvestres de los cultivos, si se encuentra una alta variabilidad en isoenzimas existe una alta probabilidad de encontrar genes interesantes para resistencia a enfermedades, para rendimiento, etc. En tomate, por ejemplo, se ha encontrado ligado al gen peroxidasa 2 un gen para esterilidad masculina y este ligamiento es tan estrecho, 1%, que es posible determinar la peroxidasa en una plántula y si se obtiene el alelo correcto, el ligamiento garantiza la presencia del gen de esterilidad. Otro ligamiento importante en tomate es entre una fosfatasa y la resistencia a nemátodos.

He tratado de describir diferentes aplicaciones de la isoenzimas en poblaciones naturales y en la agricultura. El uso de la electroforesis para separar isoenzimas es relativamente barato y puede obtenerse una gran cantidad de información al identificar y mapear genes para usarlos de la manera que he descrito.

Quisiera, para terminar, hacer un comentario sobre el objeto de este seminario. Espero que su interés por la biotecnología no los conduzca a un descuido de la biología. Recuerden que en biotecnología, primero está biología y después la tecnología. Existen muchas plantas y animales maravillosos que habitan en Guatemala y creo que es muy importante que entrenen y eduquen a sus estudiantes para que aprecien y valoricen sus recursos locales. En Guatemala tienen la oportunidad de coleccionar a los parientes silvestres de muchas plantas cultivadas, tienen una biota tropical muy bella que necesita ser inventariada e identificada. Finalmente, yo creo que es muy importante que continuemos recordando la importancia de la conservación al mismo tiempo que hacemos biotecnología. Buena suerte.

1. La estructura en subunidades afecta el número de banda en heterocigota
2. La comportamentalización subcelular revela la homología evolutiva
3. La conservación del número permite el reconocimiento de genes duplicados y niveles de polidía

FIG. 1. ALGUNAS CARACTERISTICAS DE LAS ISOENZIMAS

1. Los genotipos pueden determinarse con cantidades pequeñas de tejido de cualquier parte de la planta a cualquier edad
2. Expresión genética codominante
3. Identificación rápida de alelos individuales
4. El número de alelos es generalmente alto
5. Los efectos epistáticos o pleiotropicos generalmente ausentes
6. Efectos deletéricos generalmente ausente
7. Son posibles muestras poblacionales con altos números
8. Pueden evaluarse muchos loci isoenzimicos en un solo cruce

FIG.2 VENTAJAS DEL USO DE LAS ISOENZIMAS COMO MUESTRADORES GENETICOS

1. Descripción de la variabilidad genética en población natural
2. Estimación de la identidad genética entre población, especies
3. Identificación de filogenética en especies progenitoras-derivadas
4. Identificación de progenitores diploides de especies aloploidos
5. Identificación de "micro-especies"
6. Identificación de "especies híbridas" diploide
7. Determinación de nivel de ploidia cuando el número cromosómico es ambiguo
8. Identificación de genes duplicados (y consecuente linaje monopolítico en las especies)
9. Identificación de ligamentos genético-conservadores en especies divergentes
10. Genética ecológica: probar la "aleatoriedad" de los procesos demográficos (por ejemplo: Supervivencia de tamaño de la planta, fecundidad, longevidad)
11. Correlacionar propiedades bioquímicas de las alozimas y los requerimientos del "habitat"

FIG 3. APLICACION DE LAS ISOENZIMAS EN BIOLOGIA EVOLUCIONARIA Y GENETICA

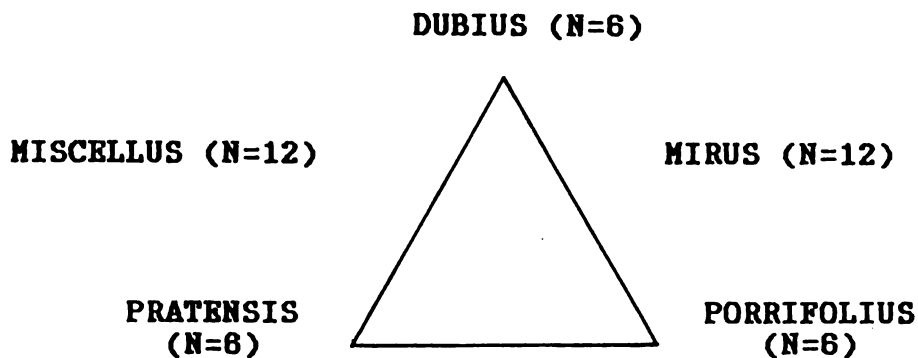


FIG. 4 ALOTETRAPLOIDIA EN TROGOPOGON

1. Construcción de mapas génicos: maíz, tomate, cebada, trigo.
2. Identificar ligamento entre loci isozimicos y resistencia a enfermedades o esterilidad masculina.
3. Identificar ligamento entre "loci para características cuantitativas" y "loci isozimicos".
4. Identificar y distinguir cultivares.
5. Estimar tasas de polinización cruzada.
6. Identificar plantas híbridas en programa de mejoramiento.
7. Supervisar cambios en variabilidad en programa de mejoramiento.
8. Evaluar parientes silvestres de cultivos como nuevas fuentes de variabilidad.

FIG. 5 APLICACION DE ISOENZIMAS EN GENETICA AGRICOLA

**TABLA 1. VARIACION ELECTROFORETICA EN PLANTAS
(449 Especies/165 Géneros)**

Loci Polimorficos (%)	34.00
Número o promedio de alelos/locos	1.53
Interegociada Esperada (%)	11.30
Diversidad genética entre población	0.22
Diversidad genética dentro de la población	0.78

From Hamrick & Godt, 1989. Allozyme diversity in plant species. En Brown A.H.D, M.T. Clegg, A.L. Mahler Y. B.S. Weir (EDS) Population genetics and germplasm resources in crop improvement. Sraver press, Sunderland, Mass. P. 2-40.

**TABLA 2. VARIACION ELECTROFORETICA EN FUNCION DE
DISTRIBUCION GEOGRAFICA**

n	Loci Polimorficos	No. Alelos Locus	Heterocigocidad esperada
Endémica 100	26	1.4	6.3
Estrecha 115	31	1.4	10.5
Regional 180	38	1.6	11.8
Amplia 85	43	1.7	15.9

From Hamrick & Godt 1989

TABLA 3. VARIACION ELECTROFORICA EN FUNCION DE SISTEMA REPRODUCTIVO Y FORMA DE VIDA

		n	Loci Polimorficos	No. Alelos Locus	Heterogocida Esperada	Diversidad Entre pob.
<u>Sistema Reproductivo</u>						
Autogama	113	20	1.3		7.4	0.51
Alogama	164	36	1.5	12.4	0.21	
<u>Forma de vida</u>						
Anual	187	30	1.5	10.5	0.30	
<u>Vida corta</u>						
Perenne:						
Herbacea	159	28	1.4	9.6	0.23	
Leñosa	11	31	1.6	9.4	----	
<u>Vida larga</u>						
Perenne:						
Leñosa	115	50	1.8	14.9	0.08	

From Hamrick & Godt, 1989

TABLA 4. IDENTIDADES GENETICAS ENTRE ESPECIES PROGENITORAS DERIVADAS

Progenitor	Derivado	I	Elelos Unicos	Referencia
<i>Stephanomeria exigua</i> subsp. <i>coronaria</i>	<i>S. malheurensis</i>	0.94	1	Gottlieb 1973
<i>Clarkia biloba</i>	<i>C. lingulata</i>	0.88	2	Gottlieb 1974
<i>Gaura longiflora</i>	<i>G. demareei</i>	0.99	2	Gottlieb & Pliz
<i>Coreopsis nuecensoides</i>	<i>C. nuecensis</i>	0.97	0	Crawford & Smith
<i>Coreopsis basalis</i>	<i>C. wrightii</i>	0.92	4	" "
<i>Layia glandulosa</i>	<i>L. discoidea</i>	0.90	8	Gottlieb et al 1985
<i>Lasthenia minor</i>	<i>L. maritima</i>	0.89	1	Crawford et al 1985
<i>Camassia scilloides</i>	<i>C. angusta</i>	0.98	2	Ranker & Schnabel 1986
<i>Cirsium canescens</i>	<i>C. pitcheri</i>	0.78	0	Loveless & Hamrick 1988
<i>Erythronium albidum</i>	<i>E. propullans</i>	0.88	5	Pleasants & Wendel 1989

TABLA 5. IDENTIDADES GENETICAS ENTRE ESPECIES LENOSAS PERENNES DIVERGENTES MORFOLOGICAMENTE

LOCALIDAD	TAXA	I	REFERENCIA
Hawaii	Bidens spp.	0.96	Helenurm & Ganders 1985
	Tetramolopium spp.	0.95	Lowrey & Carwford 1985
	Dubautia (n=13 species)	0.95	Witter & Carr 1988
Juan Fernández Is., Chile	Dendroseris spp.	0.99	Crawford et al 1987

MEJORAMIENTO GENETICO EN MUSA SP. CON EL USO
DE LAS TECNICAS DE CULTIVO DE TEJIDOS Y DE FITOPATOLOGIA

Jean-Vincent ESCALANT
IRFA-CIRAD/CATIE

Introducción

Las musaceas comestibles en América Latina y el Caribe, además de ser elementos importantes en la dieta, tienen una especial significancia económica al ser una actividad generadora de empleo, divisas e ingresos fiscales.

Sin embargo, existen serios problemas que limitan una producción eficiente: a) Mal de Panamá (*Fusarium oxysporum* var CUBENSE), b) Sigatoka Negra (*Mycosphaerella fijiensis*), c) virosis, d) nematodos, etc.

La mayoría de las musaceas comestibles son triploides partenocárpicas y, por lo tanto, su multiplicación es asexual. La baja variación genética, debida a la condición partenocárpica, dificulta su mejoramiento por vías convencionales. En este sentido, el uso de métodos de cultivo "in vitro" con objetivos de mejoramiento genético son una de las posibilidades. Las metodologías para la obtención de plantas de Musa a partir de ápices vegetativos y del cultivo de embriones cigóticos están bien definidas. Los intentos de regeneración de plantas previos al cultivo de callo y de células, han fracasado en la mayoría de los casos. Sin embargo, el uso de la embriogénesis somática, el cultivo de células, el cultivo de protoplastos, la fertilización "in vitro" y la inducción de mutaciones "in vitro" y posterior diferenciación sería de gran utilidad debido a la variación que se podría generar. Si existen dificultades en el establecimiento de todas esas técnicas, algunos resultados ya fueron obtenidos.

1. Cultivo "in vitro" de embriones cigóticos de Musa sp.

El cultivo "in vitro" de embriones puede ser muy útil en un programa de mejoramiento genético por vías convencionales (cruces interespecíficos). Así, en el caso de hibridización interespecífica, el rescate de embriones posibilita recuperar plantas completas. Además para la aplicación de las técnicas de haplométodos (fecundación artificial, doblamiento con colchicina, etc.) el dominio adecuado de la germinación "in vitro" de diploides es de vital importancia.

1.1. Cultivo in vitro de embriones de Musa (4)

1.1.1. Métodos

Las semillas utilizadas son recogidas desde 80 días después de la fecundación hasta la maduración completa del fruto. El fruto es colocado en una solución de hipoclorito de calcio al 8% durante 20 minutos. Después de tres enjuagues, las semillas están extraídas, y los embriones aislados. En caso de frutas o de semillas muy sucias, los embriones aislados pueden ser desinfectados en una solución de hipoclorito de calcio a 1% durante 10 minutos.

Dos medios básicos son utilizados: un medio G (germinación), contiene las sales de Murashige y Skoog (5), con sus macroelementos reducidos a la mitad. Además, vitaminas de Morel (1950), 60 g/l de sacarosa y 7 g/l de Agar Difco. El pH debe ser ajustado a 5,8 con NaOH o HCl (1 N, 0.1 N). El segundo medio C (crecimiento) se distingue del primero por la no dilución de las sales de M.S. y por tener la concentración de sacarosa reducida a 40 g/l. Cada tipo de medio puede ser enriquecido con diferentes hormonas tales como: AIA, Picloram, BAP.

En condiciones "in vitro", sobre el medio de germinación después de 4 o 5 días, el embrión adquiere una coloración café, esto indica el inicio activo de las fenoloxidasas. Es la primera manifestación de la viabilidad y de la germinación in vitro. Los embriones que se mantienen blancos jamás germinan. La germinación propiamente dicha ocurre después de 8 a 10 días de cultivo y se manifiesta por el desarrollo de la gémula.

2. Embriogénesis somática en Musa sp.

La investigación sobre embriogenesis somática en bananos y plátanos (6,7,8,9) ha finalizado en una embriogenesis más o menos atípica, con embriones que no se desarrollan en una planta completa. Sin embargo, hace poco tiempo, algunos autores (10,11) lograron obtener una embriogenesis típica con un desarrollo de los embriones así obtenidos.

2.1. Embriogenesis somática en Musa sp (12)

Este trabajo fue realizado a partir de embriones cigóticos de diferentes especies diploides. Los ovarios se lavan y se desinfectan con alcohol de 70° durante 3 minutos. Luego se realiza un tratamiento de 20 minutos en una solución de hipoclorito de sodio (8° cloro). Después de tres enjuagues con agua estéril, se aíslan los embriones. En realidad es muy difícil de aislar el embrión. En el caso de semillas, de 40 o 50 días después de la fecundación, si los embriones no son orientados quedan muy pequeños. Así que se aísla el embrión con una parte del tegumento interno.

Dos medios han sido utilizados durante la primera fase del cultivo (más o menos 2 meses) el medio se compone de las sales de M.S. Los embriones inmaduros producen, después de dos meses en el medio con picloram, un callo compuesto de dos partes: una de color anaranjado y otra más compacta y

blanca. El callo blanco se desarrolla lentamente, esta epidermisado y se diferencia en su superficie de los embriones somáticos. Esa diferenciación tiene lugar sin cambio de medio ni aportación de citocinia. La producción continua de embriones somáticos se obtiene con el mantenimiento de los callos sobre el medio con picloram.

El callo embriogénico se caracteriza por la presencia de una gran cantidad de proteínas de reservas en el citoplasma. Un análisis en HPLC de estas proteínas revela una gran cantidad de arginina (14% del total de los aminoácidos). Eso es similar a la tenor que se encuentra en los embriones cigóticos. Así que una cantidad de más o menos 15% de arginina en un callo podría ser considerada como un marcador característico de embriogenesis. Así se podría hacer una selección muy rápida de los callos.

3. Suspensión de células

Exito en el establecimiento de suspensión de células fue obtenido por el uso de diferentes materiales: callos embriogénicos, flores masculinas y cornos de plantas in vitro.

3.1. Suspensiones de callos embriogénicos

Las suspensiones están establecidas en erlen meyer conteniendo 30 ml de medio M.S., vitaminas de Morel, hormonas (Picloram 2 mg/l o 24-D 1mg/l), y sacarosa 30 g/l. Los erlen se ponen sobre un agitador a 80 rpm. Después de 2 ó 3 meses las suspensiones se filtran para eliminar los fragmentos de callos. Un rápido incremento de la cantidad de células ocasiona su separación en tres nuevos frascos cada dos meses. Las suspensiones pueden ser mantenidas así más de un año. De vez en cuando las células se prueban en

diferentes medios de regeneración. Esos medios pueden ser tanto líquidos como sólidos. Aunque hemos hecho muchos ensayos, por el momento no hemos logrado la formación de embriones somáticos y tampoco de plántulas.

Sin embargo, cuando las células están aplicadas sobre un medio dicho de calogénesis se puede recuperar un callo que presenta todas las características embriogénicas. Además, se puede observar en la superficie de esos callos el desarrollo de pequeños nódulos blancos y epidermizados. Esos nódulos podrían ser embriones somáticos en formación. Así esperamos lograr la obtención de plántulas. Todos estos datos nos permiten ser optimistas sobre el desarrollo futuro de esa vía.

3.2. Suspensiones con flores masculinas.

El uso de flora masculina como explante para iniciar suspensiones celulares parece una vía promisorias. Las flores escogidas son muy jóvenes (las primeras 25 a partir del meristema floral). El cultivo se hace en erlen meyer de 125 ml con 30 ml todavía no hemos logrado una regeneración de embriones o plántulas. Sin embargo según los resultados ya obtenidos por el profesor MA (Taiwan) parece que estamos muy cerca del éxito.

3.3. Suspensiones con segmentos de cormos (3)

En este caso se utiliza segmentos de cormos de plántulas "in vitro". Para estimular la formación de callo a partir de corno, se colocan en el medio sólido de S.H. (Schenck y Hildebrandt) con dicamba a 6 mg/l. El cultivo se hace en obscuridad. El callo inducido de corno todavía no hemos logrado una regeneración de embriones o plántulas. Sin embargo según los resultados ya obtenidos por el profesor MA (Taiwan) parece que estamos muy cerca del éxito.

3.3. Suspensiones con segmentos de cormos (3)

En este caso se utiliza segmentos de cormos de plántulas "in vitro". Para estimular la formación de callo a partir de corno, se colocan en el medio sólido de S.H. (Schenck y Hildebrandt) con dicamba a 8 mg/l. El cultivo se hace en obscuridad. El callo inducido de corno presentó una coloración cremosa desde el inicio y aparece en forma de pequeñas estructuras globulares en las márgenes del explante. En los cultivos en suspensión y en presencia de luz fue evidente a los 15 días una total disgregación de los callos y la suspensión adquirió un cambio de coloración, tornándose amarillenta. Transcurridos 22 días se notaron en la suspensión, pequeñas estructuras redondas y semiredondas de coloración blanca, luego amarillenta y finalmente verdes. El cambio frecuente de estas estructuras a un medio de diferenciación permitió observar en algunos casos la regeneración de raíces y en otros la formación de estructuras unipolares, que posteriormente se transformaron en plantas completas. Sin embargo, no existen una relación de proporcionalidad entre la cantidad de estructuras observadas con potencial para transformarse en plantas y lo que realmente se logra regenerar. No obstante, los resultados son promisorios y la investigación en este sentido continua. Actualmente las plantas regeneradas a partir de callo se encuentran en invernadero.

4. Presión de selección

La utilización de las técnicas de cultivo de tejidos "in vitro" para la creación de nuevas variedades resistentes o tolerantes a una determinada enfermedad causada por un hongo, una bacteria o un virus está documentada en la literatura. Los ejemplos son: caña de azúcar (14,15), maíz (16,17) y papa (18). En todos los casos las variantes han sido obtenidas a partir de callos embriogénicos, suspensión de células o protoplastos, después de realizar presión de selección "in vitro". La utilización de presión de

selección a nivel de cultivo de callos o suspensión celular presenta varias ventajas: hacer una escongencia en las células y los callos y así evitar poner miles de plantas al campo para descubrir dentro de tantas plantas aquellas que presentan alguna tolerancia o resistencia a la Sigatoka Negra. Con la finalidad de aplicar presión de selección, en el caso de enfermedades fungosas, se pueden utilizar varios agentes de selección como lo son: micelio, conidios, ascosporas, extracto líquido del hongo o toxinas. Trabajos efectuados en otras plantas muestran el interés en la utilización de una toxina. En el caso de los bananos y plátanos otras alternativas de trabajo pueden ser factibles, mientras investigación sobre el aislamiento de una toxina se lleva a cabo.

CONCLUSION

Los recientes adelantos en el cultivo "in vitro" de las musaceas, tal como embriogénesis somática y, suspensión de células hacen posibles que el cultivo in vitro sea parte integral de programas de mejoramiento de los bananos, los plátanos y los diploides en Musa sp.. El cultivo de tejidos debe estar ahora dirigido hacia la obtención de plantas a partir de suspensiones de celulares después de la utilización de una presión de selección.

LA FIJACION BIOLOGICA DE NITROGENO

Juan José Peña Cabriales
CINVESTAV-IRAPUATO
México

La fijación biológica de nitrógeno se refiere a la utilización de nitrógeno atmosférico por microorganismos procarióticos. Consecuentemente, cuando este fenómeno se explota adecuadamente adquiere relevancia agronómica ya que representa una alternativa en el uso de fertilizantes químicos nitrogenados. Entre los sistemas simbióticos fijadores de N_2 (*Azolla-Anabaena*; plantas actinorrícidas-*Frankia*; leguminosas-*Rhizobium*) destaca la simbiosis que se establece entre algunas plantas leguminosas y bacterias de los géneros *Rhizobium* y *Bradyrhizobium* no solo por la importancia de esta familia de plantas en la producción de alimentos y forrajes sino también porque la simbiosis constituye un modelo de estudio de la interacción planta-microorganismo.

En relación al microsimbionte (*Rhizobium*) se han descrito alrededor de 50 genes bacterianos que participan en el proceso de nodulación y fijación de nitrógeno. Sin embargo, las funciones bioquímicas de la mayoría de estos genes se desconocen. En *Rhizobium* la mayor parte de los genes simbióticos tanto para la nodulación como para la fijación de nitrógeno, se encuentran localizados en plásmidos, moléculas circulares extracomosomales de ADN de tamaños variables.

En relación a la planta huésped un grupo de proteínas son sintetizadas como respuesta a la infección por *Rhizobium*. A estas proteínas se les denomina nodulinas. Las

nodulinas pueden ser divididas en dos grupos: 1) tempranas: aquellas que son expresadas al principio del desarrollo del nódulo y se cree que juegan un papel importante en el proceso de infección bacteriana, la transducción de señales y en la estructura del nódulo; 2) tardías: aparecen cerca del momento en que la fijación de nitrógeno ocurre y parecen funcionar en el proceso mismo de fijación y en la asimilación del nitrógeno.

Los estudios sobre fijación de N₂ en leguminosas cultivadas hasta ahora realizados permiten con frecuencia identificar con más confiabilidad aquellos cultivos y/o condiciones que requieran de atención y estudio para la optimización del sistema simbiótico en el campo. Por ejemplo con base en resultados generados en México se ha logrado estimar que alrededor de 131×10^3 toneladas de N entran anualmente al sistema agrícola mexicano vía fijación biológica, esto es considerando exclusivamente a las leguminosas cultivadas. Luego entonces, lograr un aumento del 10% en la tasa global de fijación de N₂ a nivel nacional justificaría plenamente nuestro esfuerzo.

En el caso particular de frijol, leguminosa de vital importancia para Latinoamérica, se ha demostrado a través del uso de técnicas nucleares (¹⁵N) que la capacidad fijadora de N₂ varía fuertemente entre genotipos, reportándose valores que van desde 5 a 50% del contenido de N en la planta como proveniente de la atmósfera. Esta variabilidad hace atractivo los programas de mejoramiento rindientes a aumentar las propiedades simbióticas (fijación de N₂) de variedades comerciales de frijol.

La diversidad de genotipos presentes en Latinoamérica con frecuencia va acompañada de una riqueza similar de la población del *Rhizobium* específico. Esta riqueza genética en ambos simbioses implica que los esfuerzos por optimizar y recomendar combinaciones particulares entre cultivables y cepas deberán formularse de tal forma que esta "reserva" biológica no se vea afectada. Así, en México las poblaciones nativas de *R. phaseoli* alcanzan en algunos sitios hasta 10^8 células por g. de suelo. En términos generales presentan además una gran diversidad en cuanto a sus propiedades ecológicas y simbióticas.

Los estudios genéticos sobre el microsimbionte, indican que existen dos tipos principales, aunque ambos establecen simbiosis efectiva con frijol. Básicamente, el tipo I se caracteriza por tener varias copias de los genes nitrogenasa y un rango de plantas hospederas estrecho, mientras que cepas del tipo II tienen una copia única de los genes de nitrogenasa y un rango de plantas hospederas más amplio. Por otro lado, la información sobre diferencias entre los dos tipos de cepas en cuanto a competitividad, capacidad saprofítica y comportamiento ecológico es bastante escasa.

Es importante mencionar que a través del uso de técnicas de biología molecular se ha reportado ya, aunque con ciertas reservas, que se ha mejorado genéticamente algunas cepas del tipo I obteniéndose aparentemente una mejor capacidad para competir con algunas cepas nativas.

Desde el punto de vista agronómico es importante destacar que el cultivo de frijol con frecuencia ocurre en zonas donde la agricultura se ve limitada por lo escaso e irregular de la precipitación. Los estudios referentes a la obtención de materiales resistentes a sequía indican etapas en el desarrollo del cultivo de mayor susceptibilidad al

agobio y aunque se cuenta ya con materiales promisorios aparentemente resistentes, poco se conoce del comportamiento de estos materiales en cuanto a fijación de N₂. Asimismo, los estudios fisiológicos que se realizan empleando genotipos contrastantes en su susceptibilidad a sequía generando información interesante sobre los mecanismos que las plantas poseen para enfrentar las condiciones de agobio.

La problemática en torno al cultivo del frijol ilustra claramente la necesidad de desarrollar investigación con enfoques multidisciplinarios, enfoques que permitan optimizar la infraestructura con la que ya se cuenta, no sólo en materia de laboratorios bien equipados y personal altamente calificado, sino también en la riqueza natural de la simbiosis *Rhizobium* leguminosa.

**LA TRANSFERENCIA DE EMBRIONES Y LA
FERTILIZACION IN VITRO COMO TECNICAS BIOGENETICAS PARA
CONSERVAR, MULTIPLICAR Y DIFUNDIR GERMOPLASMA CRIOLLO
EN PELIGRO DE EXTINCION**

**Richard Taylor
Area de Ganaderia Tropical
CATIE, Costa Rica**

De 1890 cuando Heape logró la primera transferencia de un embrión en conejos, del tracto reproductivo de una hembra al de otra, a 1988, esta técnica se ha convertido en un valioso instrumento para estudiar el proceso reproductivo en las especies domésticas.

La transferencia de embriones en bovinos desde entonces, se ha convertido en una técnica biogenética importante. Una de las principales ventajas estriba, en la posibilidad de aumentar la capacidad reproductiva de una ternera o vaca valiosa, reduciendo el intervalo generacional lo que facilita y acelera el proceso de selección, aumentando de esta manera la progénie en donadoras jóvenes. La técnica hace posible también, que algunas vacas genéticamente valiosas pero infértiles debido a enfermedades, lesiones o edad, tengan cría.

El procedimiento consiste en superovular a una donadora con hormonas, para inducir el desarrollo y la maduración de varios folículos simultáneamente. Los óvulos liberados y fertilizados, son removidos de la donadora mediante técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas, y transferidos a vacas receptoras para llevar la gestación a término.

Los aspectos más relevantes, en lo que la transferencia de embriones esta contribuyendo a la producción animal moderna son:

- a) La expansión genética rápida con base en el núcleo bovino.
- b) El aumento de la intensidad de selección de hembras.
- c) El aumento de la tasa de generalidad.
- d) El transporte internacional de genoma diploide con bajo riesgo de transmisión de enfermedades.
- e) La reducción del intervalo generacional mediante la fertilización in vitro de ovocitos prepuberales.
- f) La reducción drástica del tiempo de estudios de interacción genético-ambientales, materno-fetales y feto-fetales.

Una de las principales consideraciones en todo programa que involucre la transferencia de embriones en ganado bovino es la superovulación, la cual mediante la estimulación ovárica, activa el desarrollo y maduración simultánea de una cantidad aceptable de ovocitos fertilizables. Sin embargo, uno de los mayores problemas encontrados es la respuesta impredecible de los animales al tratamiento superovulatorio. La complejidad de la variación individual ha sido enfatizada en varios trabajos.

El primer paso en la mayoría de los tratamientos superovulatorios en ganado bovino, es la administración de

preparaciones con actividad biológica tipo hormona folículo estimulante (FSH), la cual se debe administrar a la donante varios días antes del estro (natural o inducido) y en cantidades suficientes como para provocar la maduración de 10 a 20 folículos. Aunque es posible inducir la maduración de más folículos con gonadotropinas exógenas, la recolección y la fertilización de un número mayor a 20 ovocitos se dificulta significativamente.

Parte del problema encontrado en la superovulación, es el poco conocimiento todavía existente acerca del patrón de crecimiento del folículo preovulatorio y la falta de información cuantitativa precisa, sobre los factores hormonales involucrados en el ciclo estral de la hembra bovina.

Las gonadotropinas han sido extensamente utilizadas como estimulantes del desarrollo folicular. Las más frecuentemente empleadas son las gonadotropinas del suero de la yegua preñada (PMSG) y la hormona folículo estimulante de origen porcino (FSH-p), la acción de las cuales se encuentran condicionada a respuestas variadas de acuerdo al esquema de aplicación y las variaciones de un lote a otro, aunque algunos investigadores no han encontrado diferencias significativas al comparar la respuesta producida por ambas. La superovulación en ganado bovino puede ocasionar desbalances en los perfiles hormonales, en la esteroidogénesis folicular y en el desarrollo normal embrionario, resultando en la producción de embriones de mala calidad. Estas anomalías se han atribuido en parte a los animales donadores y también a la pureza y actividad biológica de las gonadotropinas disponibles en la actualidad.

Parte de la variación observada en la respuesta del ganado bovino a la PMSG o FS-P, se debe también a la dificultad para anticipar con suficiente certeza, cuando va a ocurrir el estro después del tratamiento con gonadotropinas. Este problema ha sido en parte superado a través del uso de prostaglandinas exógenas (PGF₂); mediante la administración de PGF₂, 72 horas después de iniciada la estimulación con FSH-P, las donantes entran en celo generalmente dos días después. El intervalo entre la administración de gonadotropinas y PGF₂, influye significativamente en el proceso ovulatorio.

Existen varios regímenes para fertilizar donadoras. Aunque la mayoría de los investigadores prefieren la fertilización por monta natural o la inseminación artificial (I.A.) con semen fresco, esta no es posible en la mayoría de casos, especialmente cuando se quiere utilizar sementales valiosos, por lo que debe recurrirse al uso de semen congelado. Cuando se utiliza la monta natural o el semen fresco, un servicio en el momento de observado el celo, en lugar de dos o tres inseminaciones con semen congelado, es suficiente para garantizar la fertilización de los ovocitos producto del proceso superovulatorio.

Para la recuperación de los embriones se han utilizado técnicas quirúrgicas y no quirúrgicas. Las primeras fueron desarrolladas por el grupo de investigadores de Cambridge, Inglaterra, siendo ésta reemplazada más tarde en la mayoría de los centros de investigación por técnicas no quirúrgicas, las cuales aseguran una mayor vida productiva de las donadoras al evitar adherencias y complicaciones posoperatorias.

Los primeros resultados alentadores con técnicas no quirúrgicas fueron publicados por Sugie et al., quienes trabajaron arduamente para mejorar la técnica de recolección. Los métodos no quirúrgicos se basan principalmente en dos sistemas: uno abierto, empleando jeringas para lavar cada cuerno uterino y otro cerrado, el cual utiliza la fuerza de la gravedad para pasar el medio de lavado a través de los cuernos uterinos.

Ozil et al., usando los dos sistemas, obtuvieron una eficiencia de recolección del 60 % con la técnica abierta, en comparación al 53 % con la técnica cerrada. Aunque los resultados no se consideraron significativos estadísticamente, estos autores sugirieron que la aspiración del líquido de lavado puede incrementar el número de embriones recuperados por donante. Sin embargo, otros investigadores no han observado diferencia alguna entre estos dos métodos. Independientemente del sistema empleado, Goncalves et al., obtuvieron una mejor eficiencia cuando colectaron los ovocitos 6 días después de haber sido fertilizados.

Según Saumande et al., el cultivo in vitro de embriones de mamíferos comenzó con el trabajo de Bracket en Bélgica, quien en 1913, cultivó por primera vez blastocistos de conejo. El descubrimiento de Whitten en 1957, que los embriones de ratón de 2 células podrían cultivarse hasta el estado de blastocisto, en solución fisiológica salina suplementada con albúmina sérica bovina y lactato de sodio, inició la revolución en el estudio de embriones preimplantados de mamíferos. El trabajo posterior se basó, en el uso de este medio con embriones de ratón, lo que condujo posteriormente al desarrollo de procedimientos e investigación en criopreservación, microdissección y la producción de quimeras y animales transgénicos. Todos estos

procedimientos tienen interés actual o potencial en la investigación que gira alrededor de la transferencia de embriones.

Existen dos situaciones en donde el cultivo de embriones bovinos cobra especial interés e importancia para la investigación actual. La primera es el cultivo de mórulas a blastocistos, para examinar la viabilidad embrionaria después de procedimientos tales como la criopreservación, microcirugía y micromanipulación. Los embriones bovinos pueden cultivarse desde el estado de 8 células o mórula, hasta el estado de blastocisto en solución salina amortiguada de fosfato (PBS) y suplementada con suero fetal bovino microinyectados con ADN, se cultivan hasta el 8 o 16 células en medio suplementado con suero. El desarrollo continuado de ovocitos bovinos de 1 o 2 células en medios de cultivo, es en la actualidad parcialmente exitoso a nivel experimental.

La criopreservación de embriones en nitrógeno líquido a -196°C y la descongelación rápida de los mismos tiene varias ventajas y aplicaciones. La sincronización de recipientes se hace innecesaria, debido a que los embriones se mantienen en un banco, siendo transferidos o implantados cuando las vacas o novillas recipientes entren en celo de manera natural. La criopreservación también proporciona un método rápido y seguro de transporte de genoma diploide. En programas de mejoramiento genético, mientras que los embriones permanecen en un banco de germoplasma congelados, las diferentes líneas genéticas pueden probarse con base en características productivas.

La solución PBS enriquecida, similar a la utilizada en el almacenamiento en frasco, ha sido empleada para la congelación de embriones, con la utilización de 1.5 a 2.0 M de dimetil sulfóxido (DMSO) o glicerol 1.0 M como crioprotectores. Los resultados obtenidos indican que no hay diferencias significativas en la efectividad crioprotectora al comparar el DMSO con el glicerol. El congelamiento de embriones de -30°C a -196°C no afecta la tasa de sobrevivencia de los mismos siempre y cuando esta maniobra vaya precedida del descogelamiento rápido en agua a 36°C .

La producción de linaje de sexo conocido, ha sido la meta de la industria de transferencia de embriones desde el inicio. El progreso logrado en la separación de espermatozoides machos y hembras (x-y) para inseminar donadoras ha sido poco; se podría decir que la investigación en este campo se encuentra en sus estados iniciales. Un método ahora en estudio el cual ha arrojado específico de los machos denominado antígeno de histocompatibilidad Y(H-Y), el cual está presente en los embriones recuperados. El antígeno H-Y se comienza a expresar en embriones de 8 células, encontrándose preferentemente en el estado de mórula, haciéndose difícil su detección en el estado de blastocisto. La prueba indirecta de inmunofluorescencia para detectar el antígeno H-Y, es compatible con la sobrevivencia y continuo desarrollo del embrión; la efectividad de la misma se encuentra ahora en 84%.

La producción de un número adecuado de embriones viables en hembras donadoras, todavía constituye un obstáculo serio para el uso más eficiente y comercial de la transferencia de embriones. La mayoría de los experimentos han fallado en dar una explicación aceptable a este

fenómeno. Sin embargo, recientemente se ha encontrado que los análisis de los perfiles de progesterona (P₄) y embrionaria, han revelado desviaciones de los perfiles endocrinos normales en los animales superovulados, sugiriéndose una posible relación entre los perfiles de P₄ y LH con la calidad de los aparentemente asociados con una respuesta superovulatoria pobre y a efectos deletereos sobre la viabilidad embrionaria.

Con el advenimiento de la criopreservación de embriones, se ha incrementado el movimiento de germoplasma a nivel internacional, con lo cual ha aumentado la posibilidad de introducir enfermedades exóticas a países importadores.

Para que la transmisión de una enfermedad infecciosa ocurra vía embrionaria, el agente patógeno tienen que ser transferido 1) en el embrión per se 2) dentro o adherido a la zona pelúcida del embrión y 3) en el medio dentro del cual el embrión es transferido. La más peligrosa de todas las posibilidades es la de que el embrión per se transfiera el patógeno(s). Sin embargo, pocos patógenos han sido encontrados en ovocitos. Adicionalmente, aunque muchos patógenos se han detectado en el semen, estos se han encontrado en el líquido seminal y no asociado con los espermatozoides. Por lo consiguiente, se acepta generalmente que la infección de los gametos no constituye un factor significativo en infecciones embrionales.

Teóricamente, el potencial de transmisión de enfermedades a través del embrión es menor que a través del animal vivo o del semen. Dependiendo de la especie, los embriones son recuperados 4 a 7 días después de la ovulación. Por lo consiguiente, existe un período corto de

tiempo en el cual el embrión puede infectarse en el tracto reproductivo de la donadora. El embrión también es recuperado mientras que está dentro de la zona pelúcida, la cual constituye una barrera física protectora que dificulta el paso de bacterias y hongos. Es posible que los virus pequeños puedan atravesarla, de manera que las enfermedades que podrían transmitirse por el embrión, sería virales y no bacterianas ni micóticas.

Otros factores que ayudan a reducir el potencial de transmisión de enfermedades a través del embrión, son aquellos inherentes a la técnica de lavado del útero de la donadora. Es así como los embriones se recuperan del útero, utilizando volúmenes considerables de medio, los cuales ayudan a diluir cualquier patógeno que pueda estar presente. Durante el proceso de transferencia, los embriones recolectados son lavados o tratados varias veces, lo cual reduce a un mínimo el potencial para transmitir enfermedades.

Hasta ahora, los resultados de las investigaciones que involucran la exposición de la zona pelúcida intacta del embrión a diferentes patógenos, indican que únicamente dos virus han logrado permanecer adheridos a las mucoproteínas de la zona pelúcida; el de la rinotraquitis infecciosa bovina (RIB) y el de la estomatitis vesicular (VSV). En ambos casos no ocurrió la replicación del virus en las células del embrión. Sin embargo, el tratamiento de los mismos con tripsina al 0.25%, pH 7.6 - 7.8, durante 60 a 90 segundos, fue efectivo contra ambos virus, quedando los embriones viables y con la zona pelúcida intacta y libre de estos patógenos.

Durante la exposición se discutió los resultados obtenidos en el CATIE dentro del marco del proyecto piloto de superovulación y transferencia de embriones en las razas Romosinuano y Criollo Lechero Centroamericano, el cual se lleva en colaboración con investigadores de la Universidad de Missouri (USA).

Se hizo énfasis en la necesidad de contar con objetivos claramente definidos y sobre todo en la importancia de que la superovulación y la transferencia de embriones son herramientas, que bien utilizadas pueden ser un importante apoyo a los programas de mejoramiento genético que se ejecuten en los países en vías de desarrollo.

La segunda parte de la exposición se concentró sobre la fertilización in vitro, dentro de este contexto se discutió las posibles aplicaciones y la metodología empleada para la obtención, maduración y fertilización de oocitos bajo condiciones in vitro, comparándola con la fertilización in vivo en bovinos. Dentro de este proyecto se trabaja en colaboración con investigadores de dos Universidades Norteamericanas Wisconsin y Missouri y de dos instituciones nacionales que forman parte de REDCA, la Universidad de San Carlos y el Ministerio de Agricultura y Ganadería de Guatemala. A través de las investigaciones que se están llevando a cabo en el CATIE se pretende en el mediano plazo desarrollar una metodología confiable para evaluar la fertilidad en sementales bovinos y en el largo plazo producir embriones para los estudios de clonación en razas criollas promisorias.

BIBLIOGRAFIA

- ANDERSON, G.B. 1987. Identification of embryonic sex by detection of H-Y antigen. *Theriogenology* 27: 81-97.
- BETTERIDGE, K.J. Procedures and results obtainable in cattle. In: Morrow, D.A. (ed). *Current therapy in Theriogenology*, London, Saunders Company, 1980. p.p. 74-88.
- BIELANSKI, A.; SINGH, E.L. and HARE, W.C.D. 1987. The in vitro exposure to bovine rhinotracheitis virus of zona pellucida-micromanipulated bovine embryos with the zona pellucida damaged or removed. *Theriogenology*. 28:495-501.
- BRACKET, A. 1913. Recherches sur le déterminisme héréditaire de l'oeuf des mammifères. *Development in vitro de jeunes vésicules blastodermiques du lapin*. *Arch. Biol. (Paris)* 28:447-504.
- BRACKETT, B.G.; BOUSQUET, D.; BOICE, M.L.; DONAWIDE, W.J.; EVANS, J.F. and DRESSEL, M.A. 1982. Normal development following in vitro fertilization in the cow. *Biol. Reprod.* 27:147-158.
- BRITT, J.H. and HOLT, L.C. 1988. Endocrinological screening of embryo donors and embryo transfer recipients: A review of research with cattle. *Theriogenology*. 29:189-202.
- CALLESEN, H.; GRENE, T. and HYTTEL, P. 1986. Preovulatory endocrinology and oocyte maturation in superovulated cattle. *Theriogenology* 25:71-86.
- CRITSER, J.K.; ROWE, R.F.; DEL CAMPO, M.R.; SNYDER, D.A., and GINTHER, O.J. 1978. Factors associated with superovulation in cattle. *Anim. Sci.* 70th. Ann. Meeting p. 348 abstr.
- CUNNINGHAM, E. P. 1989. The genetic improvement of cattle in developing countries. *Theriogenology* 31:17-28.
- DROST, M.; BRAND, A. and AARTS, M.H. 1978. A device for nonsurgical recovery of bovine embryos. *Theriogenology* 8:503-507.
- EAGLESOME, M.D.; HARE, W.C.D. and SINGH, E.L. 1980. Embryo transfer: a discussion of its potential for infectious diseases control based on a review of studies on infection of gametes and early embryos by various agents. *Can. Vet. J.* 21:106-112.

- ELSDEN, R. P.; NELSON, L. D. and SIEDEL Jr., G.E. 1980. Superovulating cows with follicle stimulating hormone and pregnant mare's serum gonadotropin. *Theriogenology* 13:397-408.
- FOOTE, R.H. and ONUMA, H. 1970. Superovulation, ovum collection, culture and transfer: a review. *J. Dairy Sci.* 53:1681-1692.
- FORTUNE, J.E.; SIROIS, J. and QUIRK, S. M. 1988. The growth and differentiation of ovarian follicles during the bovine estrus cycle. *Theriogenology* 29:95-109.
- GONCALVES, P.B.D.; GREGORY, R.M. and RODRIGUEZ, J.L. 1987. The efficiency of two non surgical techniques for bovine embryo recovery on days 6 and 7 of the estrus cycle. *Theriogenology* 28:25-32.
- GREVE, T.; CALLESEN, H. and HYTTEL, P. 1983. Endocrine profiles and egg quality in the superovulated cow. *Nord. Vet. Med.* 35:408-421.
- HODGES, J. 1986. Biotechnology and domestic animals. *World Animal Review.* 59:2-10.
- JENSEN, A.M.; GREENE, T.; MADEJ, A. and EDQVIST, L.E. 1982. Endocrine profiles and embryo quality in the PMSG-PGF₂ treated cow. *Theriogenology* 18:33-44.18. LEIBO, S.P. and MAZUR, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel jr., J.C. (ed). *Methods in Mammalian Reproduction.* Academic Press, N.Y., 1978, pp. 179-201.
- LEIBO, S.P. and MAZUR, P. Methods for the preservation of mammalian embryos by freezing. In: Daniel jr., J.C. (ed). *Methods in Mammalian Reproduction.* Academic Press, N.Y., 1978, pp. 179-201.
- LINDSELL, C.R.; MURPHY, B.D. and MAPLETOFT, R.J. 1986. Superovulatory and endocrine responses in heifers treated with FSH-p at different stage of the estrous cycle. *Theriogenology* 28:209-219.
- MAURER, R.R. 1978. Freezing mammalian embryos: a review of the techniques. *Theriogenology* 9:45-68.
- MONNIAUX, D.; CHUPIN, D. and SAUMANDE, J. 1983. Superovulatory responses of cattle. *Theriogenology* 19:55-61.



MOOR, R.M.; CAHILL, L.P. and STEWART, F. 1980. Ovarian stimulation or egg production as a limiting factor of egg transfer 9th int. Congr. Anim. Reprod. & A.I. Madrid, I: 43-58.

-----; KRUIP, TH.A.M. and GREEN, D. 1984. Intraovarian control of folliculogenesis: Limits to superovulation? Theriogenology 21:103-118.

FIRST, N.L.; PARRISH, J.J. 1987. In vitro fertilization of ruminants. Journal of Reproduction and Fertility. Supplement 43:151-185.

OZIL, J.P.; HEYMAN, Y. and RENRD, J.P. 1979. An instrument for transcervical recovery of embryos from heifers. Theriogenology 11:173-183.

PRATHER, R.S.; BARNES, F.L.; SIMS, M.M.; ROBL, J.M.; EYESTONE, W.H. and FIRST, N.L. 1987. Nuclear transplantation in the bovine embryo: Assessment of donor nuclei and recipient oocyte. Biol. of Reprod. 37:859-866.

-----; SPIRE, M.F. and SCHALLES, R.R. 1987. Evaluation of cryopreservation techniques for bovine embryos. Theriogenology. 28:195-204.

RAWSON, L.E.A.; TERVIT, R. and BRAND, A. 1972. The use of prostaglandin for synchronization of oestrus in cattle. J. Reprod. Fertil. 29:145 abstr.

ROWE, R.F.; DEL CAMPO, M.R.; BILTS, C.L.; FRECH, L.R.; WINCH, R.P. and GINTHER, O.J. 1976. A single cannula technique for nonsurgical collection of ova from cattle. Theriogenology 8:471-483.

-----; DEL CAMPO, M.R.; CRIDTSER, J.K. and GINTHER, O.J. 1980. Embryo transfer in cattle: nonsurgical collection techniques. Am. J. Vet. Res. 41:106-108.

SAUMANDE, J.; CHUPIN, D.; MARIANA, J.C.; ORTOVANT, R. and MAULEON, P. Factors affecting the variability of ovulation rates after PMSG stimulation In: Sreenan, J.M. (ed). Control of Reproduction in the cow. The Hague, M. hijhoff. 1978, pp. 195-224.

-----; HEYMAN, Y.; RENARD, J.P. and CHUPIN, D. 1980. New attempts for decreasing the variability of the ovarian response to PMSG in cattle. II. Comparison of different schemes of treatment. Proc. IX Intl. Cong. An. Reprod. & A.I. Madrid, V: 558-558.

- SCHNEIDER, V. and MAZUR, P. 1984. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozen-thawed embryos. *Theriogenology* 21:66-69.
- SEGUIN, B.E.; TATE, D.J. and OTTERBY, D.E. 1983. Use of cloprostenol in a reproductive management system for dairy cattle. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 183:533-537.
- SEIDEL, G.E. 1981. Superovulation and embryo transfer in cattle. *Science.* 211:351-358.
- ; & SEIDEL, S.M. Analysis of applications of embryo transfer in developing countries. *Theriogenology* 31:3-16.
- SINGH, E.L. 1987. The disease control potential of embryos. *Theriogenology* 27:9-20.
- SIRARD, M.A. and LAMBERT, R.D. 1985. In vitro fertilization of bovine follicular oocytes obtained by laparotomy. *Biol. Reprod.* 33:487-494.
- SMITH, C. 1986. Applications of embryo transfer in animal breeding. *Theriogenology.* 29:203-212.
- SREENAN, J.M. and DISKIN, M.G. 1987. Factors affecting pregnancy rate following embryo transfer in the cow. *Theriogenology.* 27:99-113.
- ; BEEHAN, D. and GOSLING, J.P. Ovarian responses in relation to endocrine status following PMSG stimulation in the cow. In: Sreenan, J.M. (ed) *Control of reproduction in the cow.* The Hague, M. hijhoff. 1978, pp. 144-158.
- ; 1983. Embryo transfer procedure and its use as a research technique. *Vet. Rec.* 112:494-500.
- SUGIE, T.; SOMA, T.; FUKUMITSU, S. and OTSUKI, K. 1972. Studies on the ovum transfer in cattle with special reference to collection of ova by means of nonsurgical techniques. *Bulletin of Nat. Inst. of Anim. Industry* 25:27-32.
- THIBIER, M. and NIBART, M. 1987. Disease control and embryo importation. *Theriogenology.* 27:37-47.
- WHITE, K.L.; ANDERSON, G.B. and BONDURANT, R.H. 1987. Expression of a male-specific factor on various stages of preimplantation bovine embryos. *Biol. Reprod.* 37:867-873.

WHITTEN, W.K. 1957. Culture of tubal ova. Nature (London)
179:1081-1082.

WRIGHT, R.W. and BONDIOLI, K.R. 1981. Aspects of In vitro
fertilization and embryo culture in domestic animals.
J. Anim. Sci. 53:702-729.

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Las conclusiones y recomendaciones, son producto de las apreciaciones de los grupos de trabajo a quienes se les proporcionó una guía de discusión, con 12 preguntas, todo lo cual, fué aprobado por la plenaria.

Pregunta 1.

Considera el grupo que el cultivo de tejidos vegetales es una tecnología viable de implementarse y desarrollarse en Guatemala?

Respuesta:

El cultivo de tejidos vegetales debe desarrollarse en Guatemala. Esto debe hacerse a nivel de investigación, dentro de una política integradora, así como también a nivel comercial.

Pregunta 2.

En orden de prioridad, indique en qué especies vegetales, de importancia para Guatemala, deben aplicarse técnicas de cultivo de tejidos para su propagación.

Respuesta:

El cultivo de tejidos vegetales, en lo que respecta a la propagación de plantas, en orden de prioridad debe aplicarse a:

- a) Especies en peligro de extinción, especialmente especies forestales.
- b) Cultivos alimenticios, específicamente: papa, plátano y frutales tropicales.
- c) Especies forestales, provenientes de genotipos superiores seleccionados.
- d) Cultivos no tradicionales para exportación.

Pregunta 3.

Qué especies vegetales de importancia para Guatemala, considera el grupo que debe tener prioridad en el uso de técnicas de cultivo de tejidos para su mejoramiento? El cultivo de tejidos vegetales, en lo que respecta al mejoramiento de plantas, en orden de prioridad, debe aplicarse a:

Respuesta:

a) Cultivos alimenticios, tales como:

- hortalizas
- raíces y tubérculos
- granos básicos

b) Cultivos de exportación:

- café
- cardamomo
- caña de azúcar
- ornamentales
- hule
- banano y plátano

c) Especies forestales y frutales

d) Especies medicinales

Pregunta 4.

Qué estrategias a nivel nacional debe desarrollarse para aplicar las técnicas de cultivo de tejidos en la propagación y mejoramiento de plantas?

Respuesta:

Para el desarrollo del cultivo de tejidos en la propagación y mejoramiento de plantas se deben desarrollar las estrategias siguientes:

a) Integración de una comisión nacional que coordine el trabajo entre las diferentes instituciones y que propicie el intercambio de conocimiento entre las mismas.

- b) Elaboración de un plan nacional para el desarrollo de la biotecnología.
- c) Formación de recursos humanos.
- d) Establecer comunicación con centros de investigación y/o de enseñanza de otros países, con el fin de realizar trabajos conjuntos y compartir conocimientos.
- e) Compartir conocimientos entre los grupos de investigadores nacionales.
- f) Hacer un inventario de necesidades.
- g) Difundir las técnicas del cultivo de tejidos y sus aplicaciones a la población nacional, con el propósito de involucrar otros grupos (agricultores, industriales, etc.).
- h) Implementar los laboratorios ya existentes y considerar la posibilidad de implantar otros, de acuerdo con las necesidades nacionales.
- i) Establecer comunicación con bibliotecas especializadas para enriquecer el conocimiento sobre biotecnología.
- j) Elaborar y proponer proyectos de prioridad nacional, a instituciones nacionales o extranjeras, con el propósito de conseguir financiamiento.

Pregunta 5.

Cuáles son las limitaciones más importantes para la aplicación de cultivos de Guatemala?

Respuesta:

Las principales limitaciones para el desarrollo del cultivo de tejidos son:

- a) Falta de personal capacitado.
- b) Falta de recursos económicos.

- c) Inexistencia de coordinación interinstitucional.
- d) Falta de infraestructura.
- e) Falta de incentivos fiscales.

Pregunta 6.

Considera el grupo que la Ingeniería Genética es una tecnología viable de implementarse y desarrollarse en Guatemala?

Respuesta:

A corto plazo no se considera viable la implementación y desarrollo de la Ingeniería Genética. Antes es necesario implementar y desarrollar otras técnicas biotecnológicas más simples y con aplicación directa.

Se debe desarrollar la biotecnología en la producción pecuaria; los aspectos más importantes a considerar son: nutrición animal, reproducción animal, producción de vacunas y métodos de diagnóstico de enfermedades.

Para el desarrollo de la Ingeniería Genética es necesario la formación de recursos humanos, asegurar el financiamiento y continuidad de los proyectos y la cooperación interinstitucional a nivel nacional e internacional, especialmente a nivel latinoamericano.

Pregunta 7.

Qué aplicaciones en la agricultura guatemalteca podría tener la Ingeniería Genética?

Respuesta:

La Ingeniería Genética podría tener aplicaciones en la agricultura guatemalteca en los aspectos siguientes:

- a) Mejoramiento de especies vegetales, principalmente en: resistencia a enfermedades, calidad nutricional y control de plagas. La fuente de estas características podría encontrarse en bancos de germoplasma.
- b) En especies animales en la producción de vacunas y métodos inmunológicos de diagnóstico.

Pregunta 8.

Qué aplicaciones biotecnológicas viables considera el grupo posibles en la industria y la protección ambiental en Guatemala?

Respuesta:

La biotecnología podría ser útil en la protección ambiental, por ejemplo, la purificación y reciclaje del agua.

Pregunta 9.

En orden de prioridad, identifiquen los problemas en los que el control biotecnológico puede ser útil en Guatemala.

Respuesta:

En la industria, la biotecnología podría aplicarse en:

- a) Biodegradación de desechos industriales.
- b) Producción de metabolitos secundarios.
- c) Producción masiva de plantas.
- d) Utilización de subproductos.
- e) Obtención de medios biológicos para el control de plagas.

Pregunta 10.

Qué aspectos deben considerarse en la formulación de políticas para el desarrollo de la biotecnología en Guatemala?

Respuesta:

En la formulación de políticas para el desarrollo de la biotecnología en Guatemala, es necesario considerar la infraestructura, recursos humanos, problemas más urgentes de resolver, con el fin de tener objetivos claros.

Pregunta 11.

Qué estrategias deben desarrollarse a corto, mediano y largo plazo, para la ejecución de las políticas en biotecnología?

Respuesta:

Las estrategias a desarrollar para la ejecución de políticas en biotecnología son:

Corto Plazo

- a) Integración de un consejo de biotecnología, con representantes de los diferentes sectores productivos, así como de representantes del área educativa y gubernamental.
- b) Elaborar un plan de divulgación de aplicaciones y limitaciones de la biotecnología.
- c) Priorizar las necesidades del país.
- d) Elaborar un plan de capacitación de personal.

Mediano Plazo

- a) Establecer un programa de postgrado en biotecnología.

- b) Plantear proyectos, tomando en cuenta las prioridades del país, a fin de obtener financiamiento de organismos nacionales e internacionales.
- c) Evaluar el trabajo realizado hasta el momento.
- d) Organizar seminarios, pláticas y otros eventos que informen los resultados obtenidos y expectativas de los proyectos. A los eventos se deben invitar científicos extranjeros.

Largo Plazo

- a) Plantear nuevos proyectos.
- b) Evaluar continuamente los proyectos.
- c) Mejorar continuamente el equipo e infraestructura para la investigación.

Pregunta 12.

Cómo puede lograrse el desarrollo de la ciencia y la tecnología en Guatemala?

Respuesta:

- a) Canalizar mayor cantidad de recursos nacionales para la ciencia y tecnología.
- b) Fortalecer los pensa de estudios de las universidades.
- c) Evaluar y mejorar los programas de investigación.
- d) Integrarse a una red de información científica.
- e) Formar recursos humanos en forma permanente.
- f) Crear un organismo coordinador de la ciencia y tecnología, con carácter permanente.

EVALUACION DEL SEMINARIO TALLER
BIOTECNOLOGIA Y LAS CIENCIAS AGRICOLAS:
AVANCES Y APLICACIONES

Los resultados de la evaluación se presentan sobre la base de 34 boletas de evaluación que fueron contestadas y entregadas por igual número de participantes en el Seminario.

1. **Cumplimiento de los objetivos del evento**
el 97% indicó que los objetivos fueron cumplidos y el 3% que los mismos no se cumplieron.

2. **Importancia de los temas tratados en el evento**
el 97% indicó que los temas tratados en el Seminario fueron adecuados y el 3% consideró que la temática del evento no fue adecuada.

3. **Temas sugeridos para próximos eventos**
Para próximos eventos se sugirieron los temas siguientes:
 - Fitomejoramiento por cultivo de tejidos.
 - Producción animal.
 - Producción de vacunas.
 - Metodologías para el manejo integrado de plagas.
 - Estudios en biotecnología efectuados en Centroamérica.
 - Utilización comercial de la biotecnología.
 - Presentación de resultados de estudios efectuados en biotecnología en Guatemala.
 - La empresa privada y la biotecnología.
 - Biotecnología aplicada a germoplasma nativo.
 - Metabolitos secundarios.
 - Anticuerpos monoclonales.
 - Biotecnología y contaminación ambiental.
 - Formación de Recursos Humanos con Biotecnología.

4. Realización de eventos similares al Seminario.

El 100% consideró que se deben seguir efectuando eventos similares a este seminario.

5. Frecuencia en la realización de eventos.

El 62% indicó que eventos similares a este seminario deben efectuarse cada año, 15% consideró que se deben efectuar cada seis meses, 12% indicó que se deben efectuar cada dos años, el resto consideró que se deben efectuar trimestralmente, mensualmente y cada dos años y medio (6%, 3% y 5% respectivamente).

**SEMINARIO TALLER
BIOTECNOLOGIA Y LAS CIENCIAS AGRICOLAS
AVANCES Y APLICACIONES**

Programa General

Miércoles, 23 de Agosto

- 8:00 - 9:00** Cultivo de Tejidos (Propagación)
Disertante: Dr. Víctor Villalobos
- 9:00 - 10:00** Cultivos de Tejidos (Conservación)
Disertante: Dr. Nelson Espinoza
- 10:00 - 10:15** Café
- 10:15 - 11:00** Cultivo de Tejidos (Mejoramiento)
Disertante: Dr. Víctor Villalobos
- 11:00 - 11:45** Embriogenesis somática en musáceas
Disertante: Dr. Jean V. Escalant
- 11:45 - 12:30** Cultivo de Tejidos en Café
Disertante: Ing. M.S. Dora Flores
- Almuerzo**
- 14:00 - 15:00** Producción Animal
Disertante: Dr. Richard Taylor
- 15:00 - 16:30** Mesa Redonda
Moderadores: Lic. Claudia Marroquín
Ing. M.S. Edgar Franco
Ing. Juan Antonio Paz
- 16:30 - 16:45** Café
- 16:45 - 18:00** Trabajo de Grupos

Jueves, 24 de agosto

- 8:00 - 9:00** Ingeniería Genética
Disertante: Dr. Miguel Gómez Lim
- 9:00 - 10:00** Bio-degradación
Disertante: Lic. Roberto De León
- 10:00 - 10:15** Café

- 10:15 - 11:15 **Bioprocesos**
Disertante: Ing. Carlos Rolz
- 11:15 - 12:15 **Control Biológico (General)**
Disertante: Dr. Mario Pareja
- Almuerzo**
- 14:00 - 15:00 **Control Biológico (Especial)**
Disertantes: Lic. Ma del Carmen de Arriola
Lic. Sheryl de Cabrera
- 15:00 - 16:30 **Mesa Redonda**
"Implicaciones de la Biotecnología"
Moderadores: Dr. Luis Mejía
Dr. Juan de Dios Calle
- 16:30 - 16:45 **Café**
- 16:45 - 18:00 **Trabajo de Grupos**

Viernes, 25 de agosto

- 8:00 - 8:45 **Política Nacional y Plan Regional**
Disertante: Ing. Daniel Sánchez
- 8:45 - 10:00 **Evidencias Electroforéticas (Isoenzimas)**
Disertante: Dr. Leslie Gottlieb
- 10:00 - 10:15 **Café**
- 10:15 - 11:30 **Polimorfismo de Fragmentos de Restricción (RFLP)**
Disertante: Dr. Luis Mejía
- 11:30 - 12:30 **Fijación Biológica del Nitrógeno**
Disertante: Dr. Juan José Peña
- Almuerzo**
- 14:00 - 15:30 **Panel "Formación de Recursos Humanos"**
Participantes: Conferencistas y Asistentes
- 15:30 - 16:30 **Trabajo de Grupos**
- 16:30 - 16:45 **Café**
- 16:45 - 18:00 **Plenaria**

COMITE ORGANIZADOR

Facultad de Agronomia, USAC

Dr. Luis Mejia, Presidente

Ing. M.S. Edgar Franco, Vocal

Universidad del Valle

Ing. M.A. Canga-Argüelles, Vocal

Ing. Mario Vela, Vocal

Dr. Juan de Dios Calle, Vocal

Universidad Rafael Landivar

Ing. Bruno Busto Brol, Vocal

ICTA

Dr. Porfirio Masaya, Vocal

Ing. Juan Antonio Paz, Vocal

ANACAFE

Ing. Edgar López, Vocal

Ing. M.S. Ricardo del Valle

ICAITI

Ing. Carlos Rolz, Vocal

SEGEPLAN

Ing. Daniel Sánchez, Vocal

CATIE

Ing. Bladimiro Villeda, Coordinador General

COMITE NACIONAL DE REDCA

Ing. Miguel Angel Canga-Argüelles
Presidente del Comité
Rector de la Universidad del Valle

Ing. Anibal Martínez
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Ing. Bruno Busto Brol
Facultad de Ciencias Agrícolas
Universidad Rafael Landívar

Ing. Horacio Juárez
Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola

Ing. Alejandro Fuentes
Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola

Ing. Mario Vela
Departamento de Ciencias Agrícolas
Universidad del Valle

Ing. Bladimiro Villeda S.,
Secretario Técnico del Comité
Representante y Coordinador de CATIE en Guatemala