

## ANALISIS Y COMENTARIOS

### LA BIOTECNIA Y EL SECTOR AGROPECUARIO<sup>1</sup>

*Azpíroz, Susana<sup>2</sup>*

#### RESUMEN

**La biotecnia y el sector agropecuario.** En este trabajo se presenta una síntesis, de como las nuevas técnicas de la biotecnología moderna pueden ser usadas como herramientas que hagan más eficiente las metodologías tradicionales de mejoramiento genético en plantas y animales. Se analizan las ventajas y desventajas del uso de cada una de las técnicas biotecnológicas en las diferentes etapas de selección realizadas en mejoramiento genético, comparando sobre todo la facilidad de manipulación y el ahorro de tiempo logrado mediante la integración de la componente biotecnológica a los procesos usados corrientemente por el mejorador. Las técnicas discutidas son: a- Cultivo in vitro de órganos y tejidos; b- Transformación génica; c- Marcadores genéticos moleculares. Así mismo, se analiza el interés actual de las transnacionales en la agricultura modificada por la biotecnología, incluyendo las consecuencias del acaparamiento en el conocimiento y la propiedad intelectual. Se resalta la importancia de reglamentar como grupo de países latinoamericanos en materia de propiedad intelectual y bioseguridad, con la finalidad de unificar criterios y presentar un frente común legal, que permita un desarrollo armónico de la biotecnología moderna en nuestros países.

#### ABSTRACT

**Biotechnology and the agricultural field.** This article summarizes how the modern biotechnology techniques can be used as a tool to make the traditional animal and plant breeding methodologies more efficient. The advantages and disadvantages of using these techniques were analyzed at each stage of the selection process of the breeding program. We compared the ease of handling and time saving obtained when the biotechnology component is integrated in the process used by the breeder. The new techniques analyzed were: a- Tissue and organ culture; b- Genetic transformation; c- Molecular genetic markers. Likewise, the current interest of multinational corporations on the potential of the agriculture modified by the biotechnology and the further concentration of knowledge and intellectual rights was analyzed. The importance for the Latin American countries to rule as a group and to share a common criteria in order to legislate in favor of the intellectual rights and biosafety was also emphasized. This legislation would allow a harmonic development of biotechnology among our countries.

---



---

#### INTRODUCCION

En este documento se analizarán las posibilidades de aplicación de algunas técnicas de la biotecnología en el mejoramiento genético, así como algunos aspectos socioeconómicos relacionados con la transferencia de la biotecnología a los países del tercer mundo, la propiedad intelectual de las obtenciones biotecnológicas y la

reglamentación necesaria en bioseguridad como protección a nuestros recursos genéticos y naturales.

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

---

<sup>1</sup> Presentado en la XXXIX Reunión Anual del PCCMCA en Guatemala, América Central. 28 de marzo - 3 de abril, 1993.

<sup>2</sup> Investigador del Programa de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales y Agropecuarias (INIFAP). Apartado Postal N°10, 56230 Chaapingo, Edo de México, México.

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

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

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

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

- a.) Crear variación genética.
- b.) Explotar más efectivamente la variabilidad existente.
- c.) Acelerar las diferentes etapas dentro del programa de mejoramiento.

Así, tenemos que las técnicas del cultivo *in vitro*, la manipulación de genes por medio de

ingeniería genética y el uso de marcadores genéticos moleculares, son poderosos auxiliares en el mejoramiento tradicional que están permitiendo avances sustanciales, tanto para la obtención de nuevos individuos más productivos como para la comprensión de ciertos fenómenos ligados a la genética cuantitativa.

### Cultivo "*In Vitro*" de órganos y tejidos

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

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

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

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

### Cultivo "In Vitro" de embriones cigóticos

Un caso concreto de la utilización de estas técnicas en el mejoramiento de plantas, es el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros como técnica complementaria de los métodos tradicionales de selección. El cultivo de embriones inmaduros, evita la larga fase de maduración y de dormancia de las semillas permitiendo una reducción notable en la duración del ciclo de selección (Alissa, 1986; Azpíroz, 1987). Por lo que ésta metodología puede ser usada en la obtención de líneas endocriadas, extirpando los embriones inmaduros 3 o 18 días después de la polinización (dependiendo de la especie). Esta operación se realiza en cada ciclo de autofecundación y aprovechando las siembras denominadas de invierno o los invernaderos, se pueden tener hasta cuatro ciclos por año. Así mismo, esta técnica puede ser utilizada para realizar retrocruzas aceleradas, con la finalidad de adicionar algún carácter agronómico importante que haga más redituable el uso de la variedad.

Tenemos como ejemplos, las retrocruzas con materiales resistentes a enfermedades o para introducir el carácter de androesterilidad, este último puede favorecer al productor de semilla ya que se reducirían los costos de obtención de los híbridos. Por ejemplo en Girasol (*Helianthus annuus*), Maíz (*Zea mays*), Colza (*Brassica napus*), y Sorgo (*Sorghum bicolor* L. Moench) tenemos esta posibilidad. Este carácter de androesterilidad puede introducirse por retrocruzas aceleradas mediante el cultivo de embriones inmaduros, en 390 días. Por otra parte, es una técnica empleada en el rescate de embriones interespecíficos (Alissa *et al.* 1985).

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

El intercambio de genes entre especies diferentes, permite el enriquecimiento del acervo genético, lográndose:

1. Resistencias a diferentes enfermedades.
2. Resistencia a plagas.
3. Introducción de genes que confieren a la planta mejor adaptación a medios adversos.

Sin embargo, debe tomarse en cuenta que entre distintas especies existen marcadas barreras de incompatibilidad, lo que representa una dificultad para el cruzamiento, la viabilidad y la fertilidad de sus híbridos (Al-Yasiri y Coyne, 1966). Sin embargo, como este problema se debe a la malogración del endospermo como consecuencia de la tardanza de la división celular en la micropora (Rabakoarihanta *et al.*, 1979), el cultivo de los embriones inmaduros *in vitro* evita el aborto y permite el desarrollo normal del embrión interespecífico.

También los embriones inmaduros pueden ser cultivados *in vitro* para producir embriones somáticos vía callo (Green y Philips, 1975). La producción de callo se logra cultivando los embriones inmaduros en condiciones de rigurosa asepsia sobre medio de cultivo nutritivo (Chu *et al.*, 1975), utilizando fitohormonas como agentes que propiciarán el desarrollo celular en forma masiva. Una vez desarrollado el callo se transplanta en el mismo medio sin hormonas para propiciar la diferenciación celular o producción de embriones somáticos.

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

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

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

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

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

En el caso de animales, la técnica del cultivo de embriones inmaduros y trasplante de los mismos ha tenido gran éxito para la obtención de genotipos con características sobresalientes similares. Asimismo, se ha desarrollado la crioconservación de los embriones y/o gametofitos para ser utilizados posteriormente en explotaciones ganaderas. En el caso de transformación génica los embriones inmaduros de animales se usan frecuentemente lográndose un éxito hasta de 99% (Van Brunt, 1988).

## Obtención de haploides "In Vitro"

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

1. La obtención de líneas homocigóticas por doblamiento espontáneo o artificial (Colchicina) del stock cromosómico de individuos haploides.
2. Esta vía presenta una ganancia en tiempo muy apreciable, si la comparamos con la vía tradicional, donde la homogeneidad fenotípica se obtiene después de 7 a 10 generaciones de autofecundaciones sucesivas.
3. Bajo el plan de conocimiento del genoma, la vía haploide presenta igualmente numerosas ventajas (sobre todo si se admite que la realización de la fase haploide se opera sin selección). Así por ejemplo:
  - Permite un análisis fino de las interacciones alélicas pudiéndose apreciar directamente ciertos parámetros de la genética cuantitativa.
  - Se logra la obtención de una gama de segregación gamética y favorece su difusión de manera estable bajo la forma de líneas puras.
  - Esta técnica pone en evidencia ciertas recombinaciones recesivas, que pueden eliminarse o utilizarse a conveniencia de la selección.

La obtención de plantas haploides puede ser realizada espontáneamente o utilizando procedimientos inductivos, dentro de estos últi-

mos se puede mencionar el aislamiento *in vitro* que puede realizarse en gametos masculinos (técnica llamada androgénesis) y en gametos femeninos (ginogénesis).

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

### Obtención, cultivo y fusión de protoplastos

Otra de las técnicas en la que se puede apoyar el mejorador es el cultivo de protoplastos. Los protoplastos son células cuya pared celular ha sido removida por métodos mecánicos y enzimáticos (cloroplastos, mitocondrias, etc).

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

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

En especies de Tabaco (*Nicotiana tabaco* L.), Papa (*Solanum tuberosum*), Tomate (*Lycopersicum* spp), Colza y Arabidopsis (*Arabidopsis talyana*), se han obtenidos varios híbridos; sin embargo, el uso está limitado debido a que no siempre es posible regenerar plantas a partir de sus protoplastos. En arroz (*Oryza* spp.) hay algunas líneas de las subespecies Indica y Japonica han contribuido mediante este método

al mejoramiento de Indica. En maíz es también posible regenerar plantas a partir de protoplastos. (Fischer, 1990).

Otra aplicación de esta técnica es la fusión entre protoplastos de la misma especie o entre especies sexualmente compatibles a fin de introducir recombinaciones epigénicas y citoplásmicas (aloplasma y fusión citoplasmática para introducir androesterilidad) (Fischer, 1990).

### Selección "En Vitro"

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

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

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

Este tipo de selección de materiales con resistencia a factores bióticos o abióticos puede realizarse tanto a nivel celular como a nivel de órganos jóvenes (Azpíroz *et al.*, 1988). La selección a nivel celular parte de un grupo de células llamado callo, el cual una vez demostrada su resistencia a ciertos factores, se cambia del medio para permitir el desarrollo de embrioides somáticos que serán el origen de plantas con resistencia al factor limitante. En cambio, la selección a nivel de embriones inmaduros permite una

eliminación de los no resistentes y los resistentes se cambian a un medio propicio o directamente a tierra para su desarrollo.

### Regeneración "In Vitro"

Como hemos indicado en párrafos anteriores las células que se cultivan en condiciones apropiadas, son capaces de desarrollar individuos completos como lo hace el cigote. El éxito en el establecimiento de un sistema de regeneración se basa en tres condiciones: la selección del explante adecuado, la elección apropiada del medio de cultivo y el control de las condiciones físicas. (Thorpe, 1980).

Los explantes in vitro evolucionan morfológicamente hacia la producción de meristemoides, posteriormente primordios, brotes y finalmente la formación de raíces adventicias a esto se le llama diferenciación directa de tejidos u organogénesis. Otra vía es la formación de embriones somáticos directamente de la masa de células desarrollada a partir del explante (Winton y Verhagen, 1977). Uno de los factores determinantes en la regeneración de plantas a partir de explantes es la interacción cuantitativa de los reguladores de crecimiento (fotohormonas) que determinan el desarrollo organizado de las células iniciales.

Tanto la organogénesis como la embriogénesis somática son formas eficientes para la multiplicación clonal; por otro lado esta regeneración es importantísima para los trabajos de ingeniería genética, ya que un explante transformado que no llega a regenerar plantas no tiene ningún valor de aplicación directa a la problemática agropecuaria.

### Transformación génica

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

ción de plantas y animales comprende una serie de técnicas que permiten la inserción de uno o más genes provenientes de otros organismos o que han sido sintetizados en el laboratorio. Antes de insertar un nuevo gen es necesario identificar y aislar ese gen, para luego clonarlo con el promotor, el cual va a regular la expresión del gen, posteriormente se debe identificar el mejor sistema para introducirlo en la planta o animal a modificar.

La aplicación de esta metodología equivale a la incorporación de una característica monogénica por retrocruzamiento a un material genético dado, con la ventaja de que con la transformación la incorporación de dicha características es instantánea.

Los sistemas de transformación en plantas han resultado más difíciles que en animales, donde la microinyección directa en embriones unicelulares, es la técnica más usada (Van Brunt, 1988).

Hay varias maneras de introducir genes o transformar plantas y animales, y ésto se ha logrado en varias especies. En la última década los nuevos conocimientos de la estructura y regulación de genes, así como el desarrollo de vectores, han abierto nuevas expectativas y se han logrado producir y estudiar plantas y animales transgénicos. Las plantas en que se ha logrado dicha transformación con éxito son las dicotiledoneas que se pueden reproducir por cultivo de tejidos a partir de protoplastos y, además, responden bien al sistema de transferencia de genes que en la naturaleza lleva a cabo la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. (Fromm *et al.*, 1985). En la actualidad, se logran transformaciones genéticas estables en forma rutinaria sobre varias especies vegetales, como Tabaco, Tomate, Papa, Algodón (*Gosypium* spp.), Colza Kiwi (*Actinidia deliciosa*), Pepino (*Solanum muricatum*), (Uematsu *et al.*, 1991; Alkinsky Garder, 1991) y, aún, en algunas especies forestales (Fischhoff *et al.*, 1987) así como en los animales (Van Brunt, 1988).

En plantas los sistemas de transformación se pueden dividir en directos e indirectos:

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

### Métodos directos de transformación

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

#### 1. Uso de protoplastos.

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

#### 2. Electroporación.

La electroporación es un proceso en el que las células se someten a pulsos eléctricos de alto voltaje. Esto causa perforaciones pequeñas en la membrana celular; así se logra la difusión de moléculas de ADN al interior de la célula, la cual regenera su pared celular y continua

desarrollándose normalmente. Este procedimiento se usa mucho en la transformación de células animales y se ha usado con éxito en la transformación de protoplastos de Maíz, Arroz y Colza que llegaron a regenerar plantas transformadas (Rodes *et al.*, 1988).

#### 3. Uso de microproyectiles.

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

#### 4. Microinyección.

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

### Métodos Indirectos

Los métodos indirectos comprenden el uso de vectores en transformación de plantas con los cuales se logra la inclusión de genes que han sido debidamente caracterizados y, a su vez, éstos son incorporados en las células vegetales. En plantas, el vector más ampliamente utilizado es *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria del suelo que tiene un sistema natural para transferir genes a la planta hospedera causando la enfermedad de la Agalla de la Corona.

En 1975 se estableció que el plásmido PTI contenía a los genes que controlaban la inducción de las agallas en la planta. Asimismo, se demostró

que en la región VIR se encontraban los genes responsables de la producción de la agalla y los genes responsables de la transferencia del TADN a las células vegetales. Es precisamente en esta zona donde se sustituyen los genes que producen los tumores, por los genes que van a transformar a la planta en estudio, incluyendo genes marcadores responsables de la resistencia a antibióticos que servirán para la selección de los materiales transformados (Zambryski *et al.*, 1984).

Este sistema de transformación se puede resumir en cinco etapas:

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

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

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

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

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

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

En Papa fue transformada mediante *A. tumefaciens*, el cual contenía los genes que codifican para la proteína de la cápside de los virus "X" y "Y". Se obtuvo un rendimiento de plantas transformadas de un 18%, del cual el 25% expresaron la resistencia a los virus "X" y "Y".

Gould J. *et al.* (1991), demostró que el maíz puede transformarse usando *Agrobacterium tumefaciens* y el plásmido PGUS3, conteniendo los genes para la resistencia a la Kanamicina (NPT II) y la producción de B-glucoronidasa (Gus). Con este estudio se demostró que las monocotiledoneas también pueden ser transformadas usando como vector *Agrobacterium*.

Otros vectores que se han desarrollado para transformación son los virus de ADN de cadena doble y simple, así como de hongos. En la actualidad se está trabajando para transformar cereales como el maíz, pero desde un punto de vista práctico como lo es la introducción de los genes responsables de la producción de la endotoxina de *Bacillus turingensis*, lo que haría a este cultivo resistente al ataque de insectos.

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

Otra aplicación práctica de la técnica de transformación es en la producción de biopesticidas, la Agencia Americana de la Protección del Ambiente (EPA) autorizó en Junio de 1991 por primera vez a la Compañía Mycogen, de San Diego, California, dos bioinsecticidas genéticamente modificados (Bouguerra, 1992).

Estos bioinsecticidas son virus modificados, así, por ejemplo, tenemos los trabajos de Tomalski, 1991 y Stewart, 1991, quienes han logrado aislar los genes responsables de la producción de neurotoxinas en los himenópteros; esta neurotoxina causa la parálisis en lepidópteros. Estos genes se han usado para transformar los bacteriófagos; estos virus atacan específicamente a lepidópteros y transformados sirven de vehículo para que dentro del cuerpo del insecto se produzca la toxina. Por lo tanto, las larvas infectadas por bacteriófago modificados se paralizan mientras el virus sigue su proceso destructivo convencional en el interior de la larva, evitándose así el ataque destructivo por parte de las larvas a los cultivos de interés comercial, ya que normalmente cuando el lepidóptero es atacado por el virus no transformado, la larva del insecto sigue destruyendo el cultivo por una semana hasta que muere, presentándose pérdidas económicas muy fuertes para el productor.

Las ventajas del uso de estos bioinsecticidas radican por un lado en evitar el uso indiscriminado de insecticidas convencionales los cuales deterioran el ambiente y, por otro lado, la especificidad de éstos evita la destrucción de insectos benéficos.

### Marcadores genéticos moleculares

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

Estos marcadores tienen las ventajas de presentar efectos neutros sobre la planta; en la mayoría de esos "loci" se presentan efectos codominantes como en el caso en isoenzimas y RFLP's y dominante en caso de los RAPD's (Figura 1); se

Marcadores	Genotipos		
	AA	Aa	aa
RAPD			
RFLP E			
ISOENZIMAS			

Figura 1. Marcadores dominantes vrs codominantes

pueden tener marcadores a lo largo del genoma; el genotipo se puede determinar en cualquier estado fenológico de la planta y en cualquier tejido; se puede trabajar casi con cualquier población natural y estos marcadores no se enmascaran por el ambiente.

## Enzimas

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

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

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

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

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

Con las isoenzimas sólo se pueden estudiar alrededor de 40 loci dependiendo de la especie que se esté analizando, en cambio con los RFLP y los RAPD se puede estudiar todo el genoma de la especie de interés.

## Polimorfismo de la longitud de fragmentos de restricción

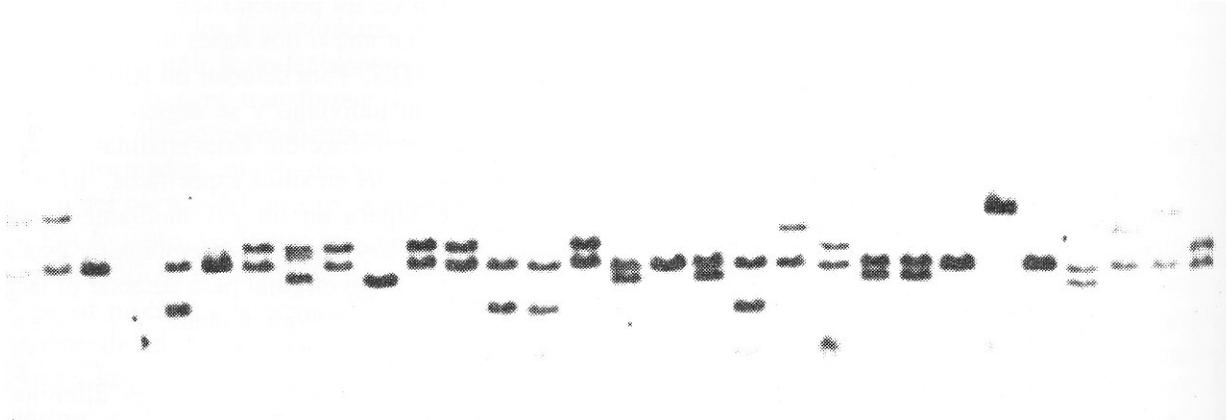
Un RFLP es simplemente una diferencia en el ácido desoxiribonucleico entre dos individuos. Esta diferencia se puede deber a muchas razones pero la más común es, generalmente, la inserción o eliminación de un pequeño segmento de ADN o un cambio en una o dos bases dentro de la secuencia del ADN. Para detectar un RFLP se aísla el ADN de un individuo y se digiere con una o más enzimas de restricción. Estas enzimas cortan la secuencia de ADN en sitios específicos. El ADN digerido se separa en un gel mediante cargas eléctricas, se transfiere a una membrana y ésta se usa como un molde original para detectar el largo de cada fragmento individualmente.

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

Estos marcadores, desde su descripción en 1975 por Grodzicken y colaboradores, se han usado con varios fines y en producción de semilla han permitido el establecimiento de similitudes y disimilitudes genéticas muy interesantes (Smith and Smith, 1991; Melchinger *et al.*, 1991).

## Polimorfismo del ADN amplificado al azar

Hace poco tiempo, en diciembre de 1990, se publicó información acerca de un segundo tipo de marcadores moleculares (Welsh y McClellan, 1990 y Williams *et al.*, 1990). Estos marcadores se han denominado polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPD's) y se basan en la amplificación del ADN mediante la reacción cíclica múltiple para amplificar pequeñas secuencias de ácido desoxiribonucleico usando una secuencia primaria de nucleótidos como iniciador. Esta secuencia primaria es conocida, por lo que las reacciones de amplificación se pueden repetir.



**Figura 2.** Polimorfismo en el largo de Fragmentos del ADN de maíz, contados con la enzima de restricciones, Hind III, e hibridados con la sonda BNL 5.09.

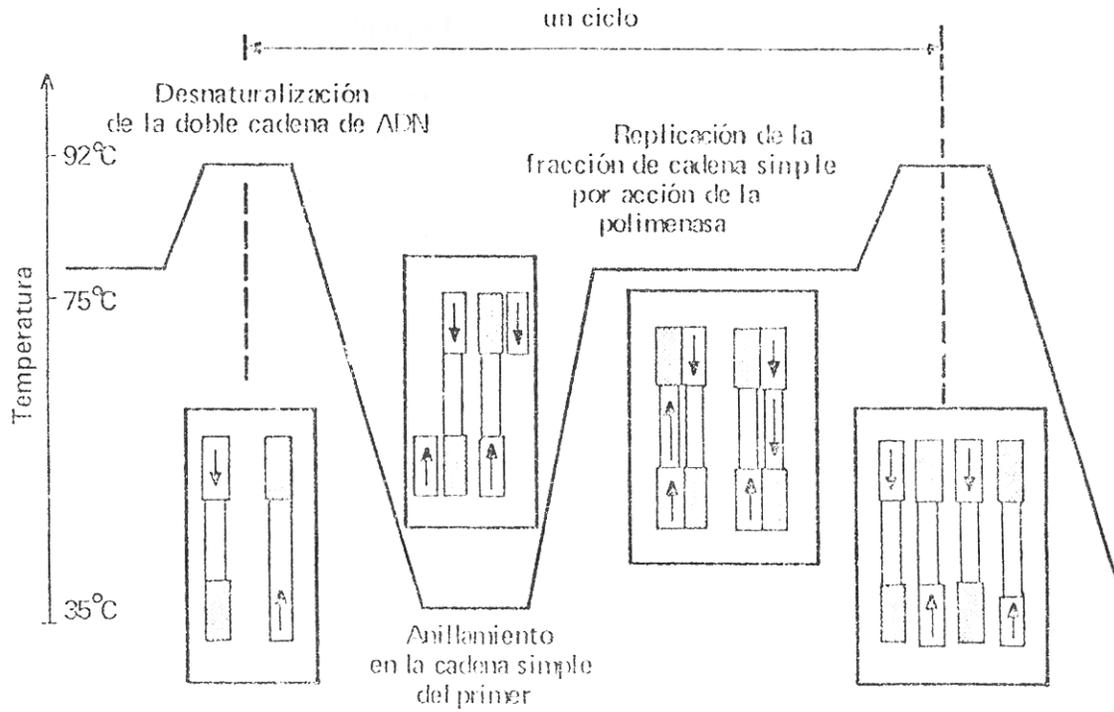
Una reacción típica se realiza con un amortiguador simple, los cuatro dinucleótidos trifosfatados (D'ATP, D'CTP, D'GTP y D'TTP), la secuencia primaria, taq polimerasa y unos pocos nanogramos del ADN del organismo estudiado. Después de cuatro horas de amplificación donde se pasa por procesos de desnaturalización, anillamiento y replicación mediante cambios bruscos de temperatura de 92, 35 y 72 °C respectivamente (Figura 3), los productos se separan en un gel de agarosa mediante cargas eléctricas donde directamente se tiñe y visualiza el ADN amplificado (Figura 4). Esta técnica ha sido propuesta para la caracterización de variedades de polinización libre recientemente (Fisher, 1991).

### Reacción en cadena de la polimerasa

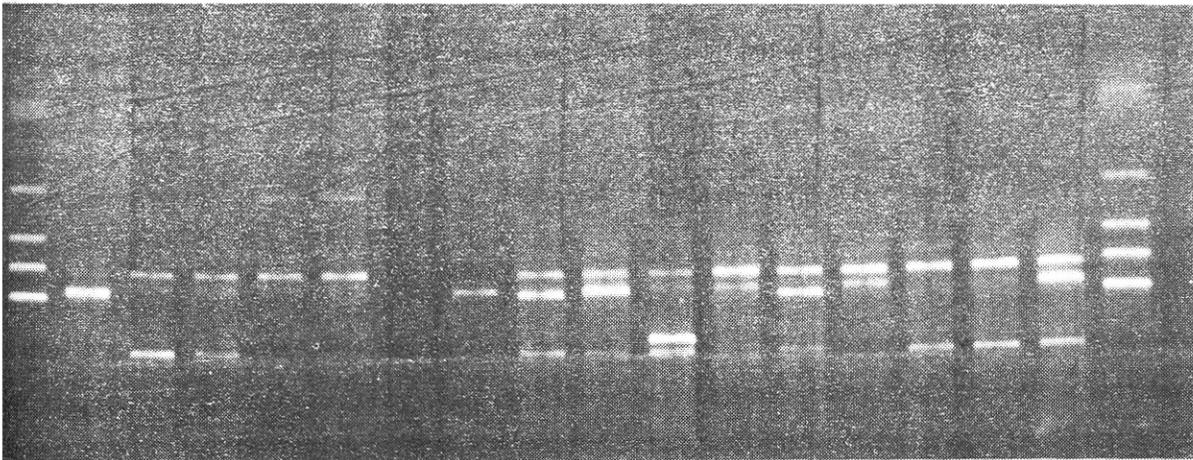
Otra de las técnicas que se está utilizando en el sector pecuario para detectar genotipos con

características sobresalientes de resistencia a enfermedades o para diagnóstico de enfermedades, es la llamada reacción en cadena de la polimerasa uno de los más recientes trabajos en esta última aplicación se ha realizado en México para la detección temprana de *Brucella abortus*. Esta técnica se basa en la amplificación del ADN mediante una reacción cíclica múltiple usando dos secuencias primarias que flanquean el fragmento de ADN a replicar mediante la enzima Polimerasa.

La brucelosis bovina infecta además a ovinos, caprinos y al hombre. En animales propicia daños económicos, ya que provoca abortos, mortandad de crías y problemas reproductivos. El diagnóstico de la brucelosis animal se realiza con pruebas serológicas cuya utilidad es limitada debido a su falta de especificidad y sensibilidad. La prueba serológica más utilizada (aglutinación) no detecta infecciones latentes o tempranas, ni permite diferenciar los anticuerpos de animales vacunados



**Figura 3.** Ciclo térmico para la amplificación del ADN al azar.



**Figura 4.** Fragmentos de ADN genómico de maíz, ampliados al azar mediante la técnica de la reacción en cadena de la Polimerasa, usando como promotor (primer) una ausencia de 10 nucleótidos "MO2" (Operom Company).

de los animales enfermos. En cambio, esta nueva prueba que usa la técnica en cadena de la polimerasa (RPC) ha detectado exitosamente la presencia de *Brucella*, así como la o las especies presentes que causen en la infección (Martínez *et al.*, 1993, y López *et al.*, 1993).

### **Propiedad intelectual, transferencia biotecnológica y bioseguridad**

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

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

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

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

- La seguridad biológica
- La propiedad intelectual

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Debido a las presiones de los países industrializados, América Latina y el Caribe han dedicado grandes esfuerzos para revisar y adecuar sus legislaciones en la materia. Así, por ejemplo, México tiene una nueva Ley de Patentes vigente desde el 27 de junio de 1991, en la cual son patentables las variedades vegetales, los procesos biotecnológicos de obtención de farmacológicos, medicamentos en general, bebidas y alimen-

tos para consumo animal y humano, fertilizantes, plaguicidas o "productos de actividad biológica".

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

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

1. Buscar que sólo se otorgue protección a procesos.
2. Excluir la posibilidad de patentar variedades vegetales o animales. Se recomienda buscar alternativas como adoptar el sistema de la Unión para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) y, en el caso de animales, a nivel internacional hay múltiples dudas sobre el patentamiento por lo que se recomienda mantenerse a la expectativa mientras no haya respuestas satisfactorias a estas preguntas.
3. En el caso de conceder patentes a microorganismos será indispensable exigir la descripción completa y depósito de la cepa (Tratado de Budapest, Abril 1977).
4. Será necesario organizarse a nivel latinoamericano apoyándose en la Organización Mundial de la Propiedad Intelectual (OMPI) y en el Programa Regional de Biotecnología (PNUD/ONUDI/UNESCO) para establecer una red de comunicación eficiente, "a nivel Latinoamericano", (ejem. Correo Electrónico) que dé a conocer la información contenida en la patente.

5. Será requisito indispensable la obligación de explotar industrialmente la patente. Esto permitirá promover el uso de nuevas tecnologías mediante el aprovechamiento concreto de la invención, por lo tanto, no bloqueará el progreso tecnológico.
6. Se recomienda que los gobiernos latinoamericanos se reserven el derecho de otorgar licencias obligatorias.
7. La vigencia de los títulos en los países de América Latina puede ser más corta que en los países industrializados lo que proporcionaría un acceso más libre y rápido al conocimiento.
8. Finalmente, se recomienda a los países latinoamericanos y del Caribe elaborar en forma conjunta un programa de desarrollo en biotecnología que les permita abordar con mayor seguridad los problemas inherentes al cambio propiciado por la revolución tecnológica actual.

### **Bioseguridad**

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

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

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

1. Las plantas modificadas por métodos clásicos de mejoramiento, se juzgan seguras para la evaluación en el campo, sobre la base de las experiencias con cientos de miles de genotipos evaluados en el campo por varias décadas en ese país.  
El Comité enfatiza que los métodos comunes para tomar decisiones acerca de las introducciones de plantas clásicamente mejoradas son completamente apropiadas.
2. Los granos de plantas modificadas por métodos moleculares y celulares no deben poseer riesgos diferentes de aquellos modificados por métodos genéticos clásicos para características similares. Conforme los métodos moleculares sean más específicos, los usuarios de estos métodos estarán más seguros de las características que introducen a la planta.  
Las características que no sean familiares en una planta específica requerirán una evaluación cuidadosa en pruebas a pequeña escala donde las plantas que exhiban fenotipos indeseables serán destruidas.
3. En este momento, en E.U.A. el potencial de las malezas para aumentar sus poblaciones es el principal riesgo ambiental que se percibe con las introducciones de plantas genéticamente modificadas.
4. El confinamiento es la condición primaria para que se tenga seguridad de introducciones en campo de plantas clásicamente modificadas.
5. Dependiendo de las especies cultivadas las opciones probadas de confinamiento incluyen los sistemas biológicos, químicos, físicos de espacio y aislamiento temporal, así como el tamaño de la parcela experimental.

6. Las plantas cultivadas dentro de un confinamiento para propósitos experimentales raramente causan problemas en el ecosistema natural.
7. Las opciones de confinamiento establecidas son tan aplicables a las introducciones en campo de plantas modificadas por métodos moleculares y celulares, como para las introducciones de plantas modificadas por métodos genéticos clásicos.

Como podemos observar a través de un ejemplo de reglamentación, no tenemos porque alarmarnos si establecemos las reglas para que en nuestros países se puedan probar materiales transgénicos.

### CONCLUSIONES

En resumen hemos tratado de dar una panorámica de la utilización de las herramientas biotecnológicas en el Sector Agropecuario, así como sus implicaciones en el contexto legal de Mercadeo, Propiedad Intelectual y Bioseguridad.

Por otro lado y de acuerdo a las posibilidades en cada país así como a la capacidad de colaboración internacional, podríamos concluir de lo anteriormente expuesto que:

1. Es posible la rápida integración de la componente biotecnológica a los procesos de mejoramiento genético en América Latina
2. Es necesaria la integración de los países de América Latina para la elaboración de una legislación común en materia de Propiedad Intelectual y Bioseguridad.
3. El desarrollo armónico de las nuevas técnicas biotecnológicas en América Latina, dependerá de las políticas comunes en la materia que determinen en forma unificada nuestras Naciones (mediante un Programa Cooperativo).

Espero que así como en esta XXXIX Reunión del PCCCMCA, se observa el poder de la organización y la cooperación internacional, en lo

que se refiere al mejoramiento de especies vegetales y animales, muy pronto podamos unir esfuerzos, todos los países de América Latina y el Caribe, para contribuir a la conservación y desarrollo armónico del sector agropecuario en nuestra región bajo esta nueva perspectiva del uso de las herramientas biotecnológicas.

### LITERATURA CITADA

- ALISSA, A.; R. JONARD; H. SERIEYS; P. VINCOURT, 1986. La culture d'embryons isolés in vitro dans un programme d'amélioration du Tournesol C.R. Acad. Sc. Paris t.302, Serie II, no 5, p. 161-164.
- AL-YASIRI, S. A; COYNE D. P. 1966. Interspecific hybridization in the genus *Phaseolus*. Crop. Science 6:59-60.
- ATKINSON, R. G.; GARDER, R. C. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of pepino and regeneration of transgenic Plants. Plant Cell Reports V. 10(4): 208-212.
- AZPIROZ, H. S.; P. VINCOURT; H. SERIEYS; A. GALLAIS, 1987. La culture *in vitro* des embryons immatures dans l'accélération du cycle de selection des lignés detournesol et ses effets morphovégétatifs. Helia 10, 35-38.
- \_\_\_\_\_, P. VINCOURT; H. SERIEYS. 1988 Utilization of in vitro test as an early screening technique for drought stress evaluation in sunflower. Proc. 12th. International Sunflower Conf. Novi Sad, Yugoslavia. pp.207-213.
- BARLEY, D.; DENIS, L.; BACKERT, M. 1989. Comparison of the aptitude for anter culture in some androgenic doubled haploid maize lines. Maydica 34:303-308.
- BOHOROVA, N. E.; HOISINGTON, D. 1991. Maize tissue at CIMMYT. Memorias del Simposio: Actualidades de la Biotecnología Vegetal en México. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A. C. 27-29.
- BOUGUERRA, M. L. 1992. Les virus modifiés: Une nouvelle arme biologique contre les chenilles?. La Recherche No 241, 23: 364-365.

- BULL, A. T.; G. HOLT; M. D. LILLY, 1982. Biotechnology: International Trends and Perspectives, OECD. Paris.
- CLAPHAM, D. 1971. *In vitro* development of callus from de pollen of *Lolium* and *Hordeum* Z. Pflanzenzucht 65; 285-292.
- CORREA, C. M. 1990. Patentes y Biotecnología: Opciones para America Latina. In: Biotecnología y patentes. Revista de Derecho Industrial. No. 34: p. 5-53.
- CONEY, D. P. 1966. Species hybridization in *Phaseolus* J. Hered. 55: 5-6.
- CUYANG T. W.; HU, H.; CHUAG, C. C. ; TSENG, C. C. 1973. Inductions of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. Sci. Sinica 16: 79-95.
- CHU, C. C.; WANG, C. C.; SUN, C. S.; HSU, C.; YIN, K. C.; CHU, C. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin 16. 659-688.
- FISCHER, M. 1990. Aplicaciones de la biotecnología en la mejora de cereales. (Mimeografiado). Colegio de Postgraduados. Montecillo, Méx. p. 48.
- FISCHER, M.; AZPIROZ, S.; Hoisington, D. 1991. Comparison of RFLP and RAPD technologies for analyzing genetic diversity in open-pollinated maize varieties. The International Society for Plant Molecular Biology. Third International Congress Molecular Biology of Plant Growth and Development. Tucson, Arizona.
- FiSCHHOFF, D. A.; BOWDISH, K. S.; PERLAK, F. L.; MARRONE, P. G.; CORMICK, S. M.; NIEDERMEYER, J. G.; DEAN, D. A.; KUSANO-KRETTZEMER, K.; MAYER, E. J.; ROCHESTER, D. E.; ROGERS, S. G.; FRALEY, R. T. 1987. Insect-tolerant transgenica tomato plants. Bio/Technologie 5:807-813.
- FROMM, M.; TAYLOR, L. P.; WALBOT, V. 1985. Expression of genes transferred into monocot and dicot plant cells by electroporation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82: 5824-5828.
- GOULD, J.; DEVEY, M.; HASEGAWA, O.; ULIAN, C. E.; PETERSON, G.; SMITH, R. 1991. Transformation of *Zea mays* L. using *Agrobacterium tumefaciens* and the shoot apex plant. Physiol. 95:426-434.
- GREEN, C. E.; PHILIPS, R. I. 1975. Plant regeneration from tissue culture of maize. Crop Sci. 15:417-42.
- GRIMSLEY, N.; HOHN, Y. T.; DAVIS, J. W.; HOHN; B. 1987. *Agrobacterium* mediated delivery of infections maize streak virus into maize plants. Nature 325: 177-179.
- GRODZCKER, T.; WILLIAMS, J.; SHARP, P.; SAMBROOK, J. 1975. Physical mapping of temperature sensitive mutations of adenoviruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 39:439-446.
- HANNA, W. W.; BASHAW, E. C. 1987. Apomixis: its identification and use in plant breeding. Crop Sc. 27:1136.
- HERRERA-ESTRELLA, L.; DEPICKER, A.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plantcells using a Ti-plasmid derived vector. Nature 303:209-213.
- KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. 1987. *Agrobacterium* mediated plant transformation and its further applications to plant biology. Ann. Rev. Plant Physiol. 38: 487-496.
- KLEIN, T. M.; WOLF, E. D.; WU, R.; SANDORF, J. C. 1987. High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. Nature 327: 70-73.
- KLEIN, T. M.; GRADZIEL, T.; FROMM, M. E.; SANFORD, J. C. 1988. Factors influencing gene delivery into *Zea mays* cell by high-velocity microprojectiles. Biotechnology 6: 559-663.
- LOPEZ, H. M.; J. P. MARTINEZ, 1993. Diferencias genotípicas en diversas especies de *Brucella*, detectadas por la reacción en cadena de la polimerasa. En prensa. Monterrey, Nuevo León.
- MARTINEZ, J. P.; D. S. LEAL; H. BARRERA, E. L.; CAB. 1993. Detección de *Brucella Abortus* por medio de la reacción en cadena de la polimerasa. En prensa. Apdo. postal 3-425. Monterrey, Nuevo León.

- MELCHINGER, A. E.; MESSMER, M. M.; LEE, M.; WOODMAN, W. L.; LAMKEY, K. R. 1991. Diversity and relationships among U. S. maize inbreds revealed by restriction fragment length polymorphisms. *Crop Sci.* 31:669-678.
- NAKATA, K.; TANAKA, M. 1968. Differentiation of embryos from developing germ cells in anther culture of Tobacco. *Jap. J. Genet.* 43; 65-71.
- NATIONAL RESEARCH COUNCIL 1989. Field testing of genetically modified organisms. N.C.R., U.S.A.
- NEWELL, C. A.; ROZMAN, R.; HINCHEE, M. A.; LAWSON, E. C.; HALEY, L.; SANDERS, P.; KANIEWSKI, W.; TUMER, N. E.; HORSCH, R. B.; FRALEY, R.T. 1991. Agrobacterium-mediated transformation of *solanum tuberosum* L. cv. 'Russet Burbank! *Plant cell reports* V 10(1): 30-34.
- RABAKOARIHANTA, A. D.; E. S. MOK; M. C. MOK, 1979. Fertilization an early embryo development in reciprocal interspecific crosses of *Phaseolus*. *Theor. Appl. Genet* 54 (2): 55-59
- RODES, C. A.; LOWE, K. S.; RUBY, K. L. 1988a Plant regeneration from protoplast isolated from embryogenic maize cell cultures. *Biotechnology* 6:56-60.
- , PIERCE, D. A.; METLER, T. J.; MASCARENHAS, D.; DETMER, J. J. 1988b. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 240: 204-206.
- ROGERS, S. G.; HORSCH, R. B.; FRALEY, R. T. 1985. Gene transfer in plants: Production of transformed plants using ti-plasmid vectors. In *Methods for plant molecular biology* (ed). A. Weisbach & H. Weissbach 423-436. Acad. Press New York.
- SAVIDAN, Y. 1986. Apomixis as a new tool to increase grain crop productions in semi-arid tropics, a research proyect. *Agriculture, ecosystems and environment.* 16:285.
- SMITH, J. S. S.; SMITH, O. S. 1991. Restriction fragment length polymorphisms can differentiate among U. S. maize hibrids. *Crop Sc.* 31:893-899.
- SOLLEIRO, J. L. 1990. Patentes en Biotecnología: Oportunidades, amenazas y opciones para América Latina en: *Biotecnología y Patentes. Revista de Derecho Industrial* No. 34. pág. 107-142.
- SOLLEIRO, J. L. 1991. Patentes en Biotecnología: Oportunidades, amenazas y opciones para América Latina y el Caribe. *In: Políticas de la propiedad industrial de inventos biotecnológicos y uso de germoplasma en America Latina y el Caribe.* Ed. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). p. 343-380.
- STEWART, L. M.; M. H. HIRST; M. LOPEZ FEBER; A. I. MENYWEATHER; P. J. CLAYLEY; R. D. POSSEE. 1991. Construction of an improved baculo virus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *nature* vol 352:85-22
- THORPE, T. A. 1980. Organogenesis *in vitro*: structural physiological and biochemical aspects: *Int. Rev. of Cytology, Supplement* 11A: 71-111.
- TOMALSKI, M. D.; L. K. MILLER, 1991. Insect paralysis by baculo virus mediated expression of a mite neurotoxin gene. *nature.* vol. 352:82-85
- TRAN THANH VAN, M. 1980. control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. *Int. Rev. of Cytology Supplement* 11A: 175-194.
- UEMATSU, C.; MURASE, M.; ICHIKAWA, H.; IMAMURA, J. 1991. Agrobacterium-mediated transformation and regeneration of Kiwi fruit: *Plan Cell Reports* V. 10(6/7): 286-290.
- VAN BRUNT, J. 1988. *Molecular Farming: Transgenic animals as bioreactors* *Bioltechnology.* Vol. 6 No. 10 1159-1154. Welsh J. and McClelland M. 1990. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18:7213-7218.
- WELSH, J.; McCLELLAND, M. 1990. Finger printing genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucl. Acids Res.* 18: 7213-7218.
- WILLIAMS, J. G. K.; KUBELIK, A. R.; LIVAK, K. J.; RAFALSKI J, A.; TINGEY, S. W. 1990 DNA polymorphisms amplified by arbitrary primer are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.:* 18:6531-6535.
- WINTON, L. L.; VERHAGEN, S. A. 1977. Shots from Douglas-fir cultures. *Can. J. Bot.* 55: 1246-1250.

ZAMBRYSKI, P.; HERRERA-ESTRELLA, L.; DE BLOCK, M.; VAN MONTAGU, M.; SCHELL, J. 1984. The use of the tiplasmid of *Agrobacterium* to study the transfer and expression of foreign DNA in plant cells; new vectors and methods. *In* Genetic engineering: Principles & Methods. (ed) J. K. Setlow. S. A., Hollaender 6: 253-278. New York/London: Plenum.