

Centro Interamericano de
Documentación e
Información Científica
13 JUL 1994
IICA - C191A

IICA



REQUERIMIENTOS TECNICOS PARA LA INVESTIGACION Y DESARROLLO EN AGROBIOTECNOLOGIAS



IICA
PM-A1/
SC-93-
07

PROGRAMA II
GENERACION Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA

¿QUE ES EL IICA?

El Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA) es el organismo especializado en agricultura del Sistema Interamericano. Sus orígenes se remontan al 7 de octubre de 1942, cuando el Consejo Directivo de la Unión Panamericana aprobó la creación del Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.

Fundado como una institución de investigación agronómica y de enseñanza de posgrado para los trópicos, el IICA, respondiendo a los cambios y a las nuevas necesidades del hemisferio, se convirtió progresivamente en un organismo de cooperación técnica y fortalecimiento institucional en el campo agropecuario. Estas transformaciones fueron reconocidas formalmente con la ratificación, el 8 de diciembre de 1980, de una nueva convención, la cual estableció como los fines del IICA estimular, promover y apoyar los lazos de cooperación entre sus 33 Estados Miembros para lograr el desarrollo agrícola y el bienestar rural.

Con un mandato amplio y flexible y con una estructura que permite la participación directa de los Estados Miembros en la Junta Interamericana de Agricultura (JIA) y en su Comité Ejecutivo, el IICA cuenta con una amplia presencia geográfica en todos los países miembros para responder a sus necesidades de cooperación técnica.

Los aportes de los Estados Miembros y las relaciones que el IICA mantiene con 14 Observadores Permanentes, y con numerosos organismos internacionales, le permiten canalizar recursos humanos y financieros en favor del desarrollo agrícola del hemisferio.

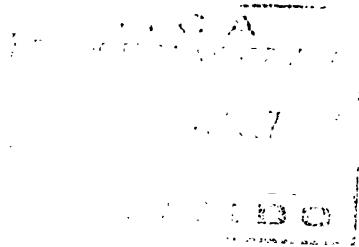
El Plan de Mediano Plazo 1987-1993, documento normativo que señala las prioridades del Instituto, enfatiza acciones dirigidas a la reactivación del sector agropecuario como elemento central del crecimiento económico. En función de esto, el Instituto concede especial importancia al apoyo y promoción de acciones tendientes a la modernización tecnológica del agro y al fortalecimiento de los procesos de integración regional y subregional. Para lograr esos objetivos el IICA concentra sus actividades en cinco Programas que son: Análisis y Planificación de la Política Agraria; Generación y Transferencia de Tecnología; Organización y Administración para el Desarrollo Rural; Comercio e Integración; y Sanidad Agropecuaria.

Los Estados Miembros del IICA son: Antigua y Barbuda, Argentina, Barbados, Belice, Bolivia, Brasil, Canadá, Chile, Colombia, Costa Rica, Dominica, Ecuador, El Salvador, Estados Unidos de América, Grenada, Guatemala, Guyana, Haití, Honduras, Jamaica, México, Nicaragua, Panamá, Paraguay, Perú, República Dominicana, St. Kitts y Nevis, Santa Lucía, San Vicente y las Granadinas, Suriname, Trinidad y Tobago, Uruguay y Venezuela. Funcionan como Observadores Permanentes: Austria, Bélgica, Comunidades Europeas, España, Francia, Israel, Italia, Japón, Portugal, Reino de los Países Bajos, República Árabe de Egipto, República de Corea, República Federal de Alemania y Rumania.

ISSN-0534-5391



REQUERIMIENTOS TECNICOS PARA LA INVESTIGACION Y DESARROLLO EN AGROBIOTECNOLOGIAS



13 JUL 1994

PROGRAMA II
GENERACION Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGIA

IICA
PM A1/SC-93-07
BV-7389

© Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
Febrero, 1993.

Derechos reservados. Prohibida la reproducción total o parcial de este documento sin autorización escrita del IICA.

Las ideas y planteamientos contenidos en los artículos firmados son propios de los autores y no representan necesariamente el criterio del IICA.

El Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola (CIDIA), a través de su Servicio Editorial e Imprenta, es responsable del montaje, fotomecánica e impresión de esta publicación.

Requerimientos técnicos para la investigación y desarrollo en agrobiotecnologías / Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura. Programa de Generación y Transferencia de Tecnología. — San José, C.R. : IICA, 1993.

62 p. ; 23 cm. — (Serie Publicaciones Misceláneas / IICA, ISSN 0534-5391 ; no. A1/SC-93-07)

1. Biotecnología agrícola. I. IICA. Programa de Generación y Transferencia de Tecnología. II. Título. III. Serie.

AGRIS F30

DEWEY 581.15

00000772

RECONOCIMIENTOS

Este documento ha sido elaborado por el Programa de Generación y Transferencia de Tecnología, con base en el informe de consultoría rendido por R.G.H. Downer, E.B. Dumbroff, B.R.Glick, J.J. Pasternak, del Departamento de Biotecnología de la Universidad de Waterloo, en Waterloo, Ontario, Canadá y K. Winter, de la Agriculture Canada Research Station, Charlottetown, P.E.I., Canadá.

INDICE

PRESENTACION.....	7
INTRODUCCION.....	9
1. INFORMACION GENERAL SOBRE LA BIOTECNOLOGIA.....	9
1.1. Biotecnología animal.....	10
1.2. Biotecnología microbiológica.....	10
1.3. Biotecnología vegetal.....	13
2. LINEAMIENTOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SERVICIOS BIOTECNOLOGICOS.....	15
2.1. Introducción y consideraciones generales.....	15
2.2. Técnicas de ingeniería genética.....	19
2.3. Servicio de escalamiento y líneas de salida.....	24
2.4. Servicios analíticos.....	28
2.5. Cultivo de tejido vegetal.....	36
2.6. Instalaciones para la experimentación con plantas.....	40
2.7. Laboratorio de recuperación de embriones/ooцитos y de micromanipulación.....	43
3. CASOS HIPOTETICOS DE APLICACION DE LAS TECNICAS.....	47
3.1. Producción de un microorganismo con técnicas de ingeniería genética.....	48
3.2. Escalamiento progresivo de una proteína producida por un microorganismo recombinante.....	49
3.3. Elaboración de un plan para la producción en cultivo de tejidos de árboles leñosos perennes a escala comercial..	51
4. POSIBLES LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES.....	54
4.1. Liderazgo.....	54
4.2. Mantenimiento de los recursos físicos e intelectuales.....	54
4.3. Estrategia nacional de biotecnología.....	55
4.4. Servicios centralizados y descentralizados.....	56
BIBLIOGRAFIA.....	57



PRESENTACION

La biotecnología, pese a ser una actividad muy novedosa (las primeras aplicaciones comerciales datan de 1976) ha demostrado su capacidad de influir significativamente en la estructura del comercio de productos agrícolas a nivel global. Se prevé además que la agricultura, junto con la salud humana, recibirán el mayor impacto de las nuevas biotecnologías en las próximas tres décadas.

Junto con la telemática, la computación y los nuevos materiales, la biotecnología integra un nuevo paradigma tecnológico capaz de transformar de manera significativa las ventajas comparativas de los países y, por tanto, los flujos de comercio, y también de crear -y destruir- industrias enteras, con base en productos novedosos.

Consciente de la importancia para los países de América Latina y el Caribe (ALC) de incrementar sus capacidades para la planificación de la generación y transferencia de las nuevas agrobiotecnologías, el IICA desarrolla acciones de apoyo a los países por intermedio del Proyecto de Planeación Estratégica y Nuevas Opciones Tecnológicas, adscrito al Programa de Generación y Transferencia de Tecnología.

Este documento se inscribe en las acciones del Proyecto, dirigidas a facilitar a los decisores el acceso a información clave para el desarrollo de las nuevas agrobiotecnologías en ALC. Específicamente, el objetivo del trabajo consiste en proporcionar orientaciones detalladas para los directores de investigación y otras instancias de decisión en ALC, interesadas en el desarrollo de su capacidad de investigación en agrobiotecnología.

Se incluyen orientaciones con respecto a los requerimientos de personal, equipo e instalaciones, necesarias para el establecimiento de diversos servicios y técnicas de la nueva biotecnología.

La publicación que se presenta fue elaborada con base en el informe de consultoría rendido por R.G.H. Downer, E.B. Dumbroff, B.R. Glick, J.J. Pasternak, del Departamento de Biología, de la Universidad de Waterloo, en Waterloo, y K. Winter, de la Agriculture Canada Research Station, en Charlottetown, Canadá. La edición técnica del documento estuvo a cargo de Walter Jaffé, Especialista en Generación y Transferencia de Tecnología.

Dejamos constancia de nuestro agradecimiento a la Agencia Canadiense para el Desarrollo Internacional (ACDI), cuyo apoyo financiero hizo posible la ejecución y publicación de este estudio.

Eduardo J. Trigo
Director
Programa de Generación y
Transferencia de Tecnología

INTRODUCCION

La biotecnología ha sido definida por la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada como la aplicación de la bioquímica, la biología, la microbiología y la ingeniería química a procesos industriales y productos (incluidos los productos para atención de la salud, la energía y la agricultura) y al medio ambiente. En el contexto agrícola, la biotecnología ofrece enormes posibilidades para el mejoramiento de las variedades vegetales y animales, el aumento del rendimiento y el desarrollo de nuevos productos.

Este Informe se basa en una serie de visitas y entrevistas con científicos, directores de investigación, representantes del IICA, funcionarios gubernamentales y representantes del sector privado de México, Costa Rica y Ecuador. Está dirigido más a los directores y administradores de investigaciones que a los científicos en servicio; incluye orientaciones con respecto al personal, el equipo y las instalaciones materiales necesarias para el establecimiento de los diversos servicios de biotecnología. Los costos se han estimado en dólares canadienses y se refieren al año 1990. La tasa de cambio promedio del dólar canadiense y del dólar de Estados Unidos durante ese año fue de aproximadamente 1.15.

Se reconoce que las necesidades y posibilidades locales determinarán la combinación específica de instalaciones en un país o en una región determinada; en consecuencia, se presentan varios ejemplos para demostrar cómo las orientaciones pueden aplicarse a situaciones concretas. El Informe se refiere, además, a las principales limitaciones que deben superarse para aprovechar al máximo los beneficios potenciales de la agrobiotecnología y ofrece algunas recomendaciones concretas.

1. INFORMACION GENERAL SOBRE LA BIOTECNOLOGIA

En este Capítulo se incluyen figuras que muestran características particulares de la biotecnología animal, vegetal y microbiológica en el contexto agrícola. Tienen por objeto ilustrar un conjunto de objetivos potenciales, así como también los recursos metodológicos para alcanzar esos objetivos. Además, los esquemas pretenden ilustrar cómo un método experimental determinado, por ejemplo la ingeniería genética, puede utilizarse para desarrollar diversos productos finales.

Puede señalarse que cualquier grupo de científicos, en determinado momento, tendrá que limitarse necesariamente a un número reducido de objetivos. La representación esquemática no pretende ofrecer un cuadro global de los tres campos de la biotecnología; más bien presenta una aproximación en cuanto a los diversos enfoques que pueden utilizarse en la órbita de la biotecnología animal, vegetal y microbiológica con respecto a la agricultura.

1.1. Biotecnología animal

En el contexto actual, la biotecnología animal comprende la investigación orientada hacia la reproducción de organismos, la manipulación genética de animales completos y de células animales, y la identificación y detección de organismos patógenos (Fig. 1).

En primer término, la investigación sobre reproducción animal puede requerir: 1) la creación y el mantenimiento de bancos de espermatozoides e instalaciones para inseminación; 2) el establecimiento de procedimientos de clonación y trasplante de embriones; 3) medios para preservar el germoplasma.

En segundo lugar, la manipulación genética puede utilizarse para: 1) producir proteínas extrañas a partir de células animales en cultivo; 2) crear animales que lleven un gen extraño que pueda modificar una característica específica, como el ritmo de crecimiento o la resistencia a una determinada tensión impuesta por el medio ambiente.

En tercer lugar, puede ser necesario identificar a patógenos que afectan al ganado. En esos casos, pueden utilizarse estrategias inmunológicas o sondas de ácidos nucleicos para detectar bacterias y virus patógenos. La creación de vacunas que protegen al ganado de microorganismos patógenos es considerada parte de la biotecnología microbiológica.

1.2. Biotecnología microbiológica

La biotecnología microbiológica, en su aplicación a la agricultura, comprende tanto metodologías tradicionales, tales como selección de cepas y mutagénesis, así como también la ingeniería genética (Fig. 2).

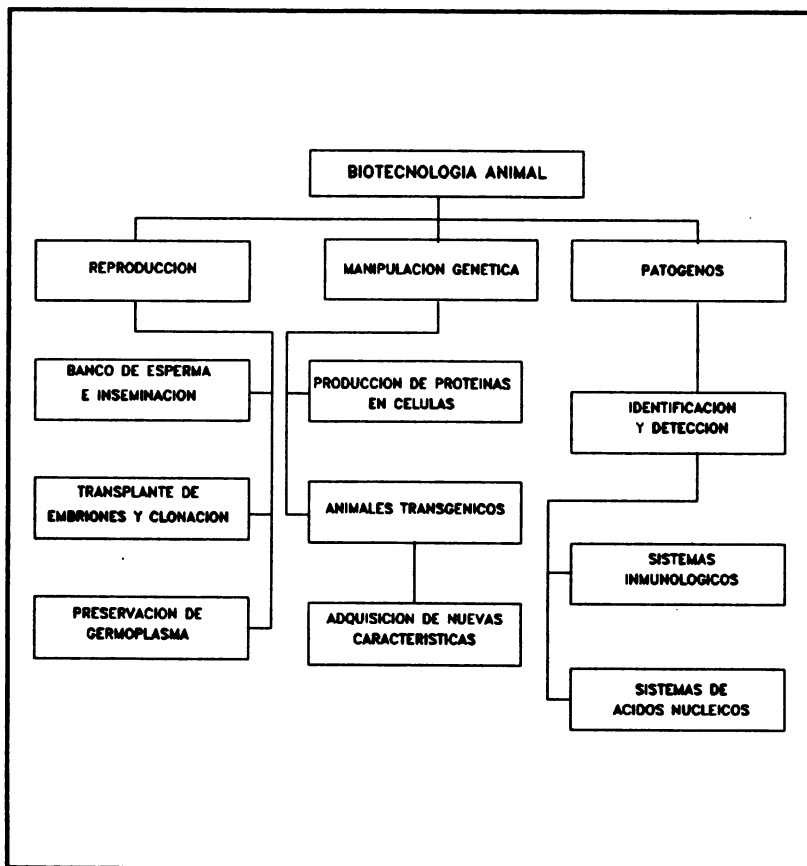


Fig. 1. Alcance de la biotecnología animal

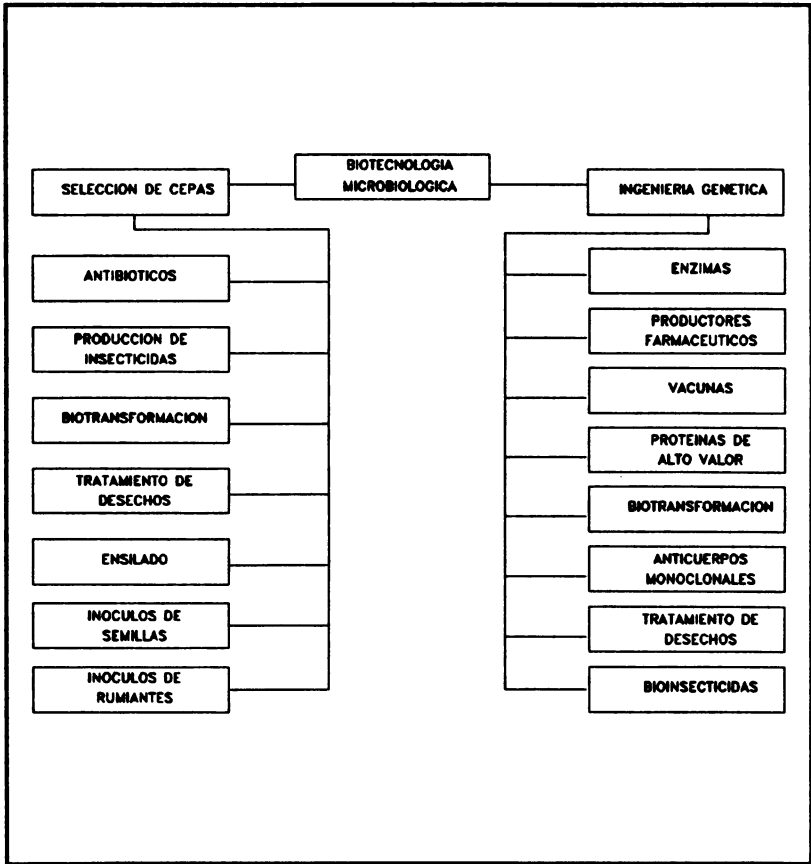


Fig. 2. Alcance de la biotecnología microbiológica

Mediante la biotecnología tradicional los microorganismos pueden seleccionarse y modificarse, y luego utilizarse para: 1) la producción de antibióticos; 2) la producción de insecticidas; 3) la catálisis de la transformación química de moléculas biológicas seleccionadas; 4) el tratamiento de desechos agrícolas y de otras fuentes; 5) la digestión de material ensilado; 6) la inoculación de semillas para estimular el crecimiento de las plantas; 7) la producción de inóculos que ayuden a la digestión de los rumiantes.

Los microorganismos que se modifican mediante el empleo de la Ingeniería genética pueden ser utilizados para: 1) la producción de enzimas; 2) la producción de productos farmacéuticos, tanto conocidos como nuevos, incluidos los antibióticos; 3) el desarrollo y la producción de vacunas; 4) la producción de otras proteínas no enzimáticas y de alto valor; 5) la creación de microorganismos con capacidades metabólicas singulares, incluida la transformación química de moléculas biológicas seleccionadas; 6) la selección y la producción de anticuerpos monoclonales mediante la utilización de un procedimiento descrito recientemente que evita la formación de hibridomas (ver Capítulo 2); 7) la degradación de diversos desechos biológicos y no biológicos; 8) la creación y producción de bioinsecticidas.

1.3. Biotecnología vegetal

De los tres campos de la biotecnología que hemos definido en este documento, la biotecnología vegetal es probablemente la más útil desde el punto de vista del desarrollo de la agricultura en la región de ALC. Por consiguiente, en los diferentes proyectos podrán utilizarse diversas estrategias.

La biotecnología vegetal abarca la investigación sobre la propagación vegetal, el desarrollo de nuevas variedades de plantas, la identificación y detección de organismos patógenos y la identificación y producción de productos naturales (por lo general metabolitos secundarios) a partir de células vegetales (Fig. 3).

En primer lugar, la propagación vegetal comprende: 1) diversas metodologías de cultivo de tejidos que son esenciales para la producción en gran escala de cultivos uniformes y sin agentes patógenos; 2) el establecimiento de bancos de germoplasma.

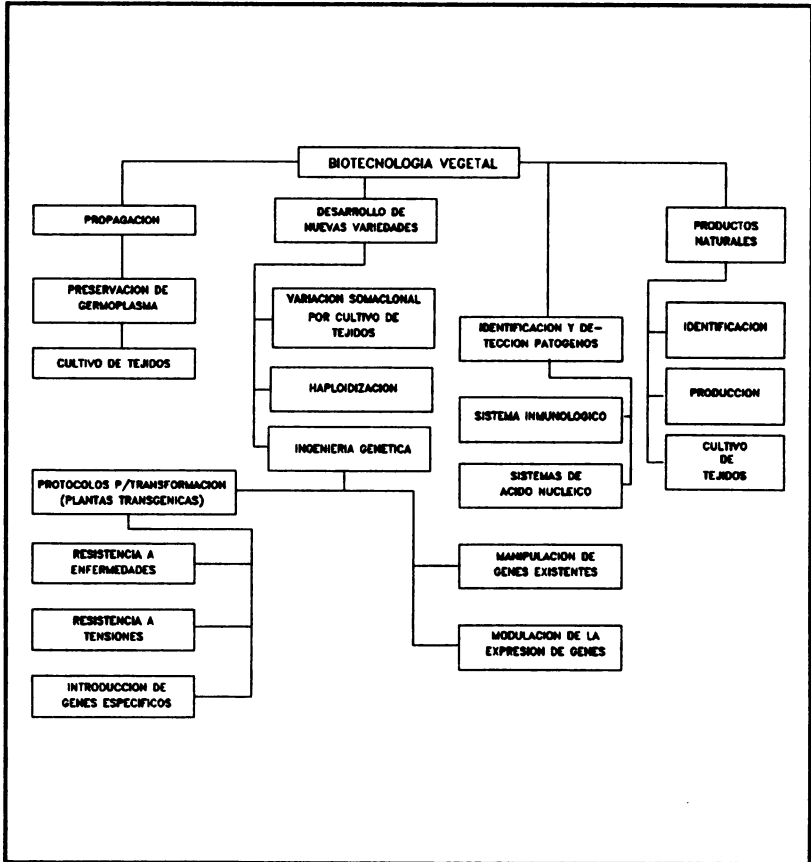


Fig. 3. El alcance de la biotecnología vegetal

En segundo término, es posible desarrollar nuevas variedades de plantas mediante la variación somaclonal, la haploidización o la ingeniería genética. La ingeniería fitogenética puede utilizarse ya sea para manipular el complemento genético existente en una planta o para introducir genes extraños en las plantas. Esa manipulación genética incluye la elaboración de protocolos para la transformación de plantas, es decir la introducción de genes que produzcan cultivos que sean resistentes a las enfermedades, resistentes al estrés, o que posean ciertas características deseables.

En tercer lugar, los organismos patógenos de las plantas pueden ser identificados y detectados por medio de metodologías inmunológicas o sondas de ácidos nucleicos. Por último, para la identificación y la caracterización de metabolitos vegetales biológicamente activos es necesario utilizar un equipo de análisis relativamente complejo; la producción de dichos productos naturales puede lograrse mediante técnicas de cultivo de tejidos vegetales.

2. LINEAMIENTOS PARA EL ESTABLECIMIENTO DE SERVICIOS BIOTECNOLOGICOS

2.1. Introducción y consideraciones generales

Las pautas del presente Informe tienen la finalidad de ayudar a los administradores de investigación a reconocer algunas de las exigencias en cuanto a instalaciones y mano de obra necesarias para realizar investigación y desarrollo en diversas esferas de la biotecnología. Dado que la biotecnología es una actividad diversificada y compleja, no sería razonable ni factible formular un sólo plan general «paso a paso» para la aplicación directa.

Es muy probable que una región o un país determinado, por ejemplo, decida establecer una o varias dependencias funcionales de biotecnología que realicen investigaciones sólo con una parte de las posibilidades existentes. Además de las consideraciones referidas al equipo y el material, deben tomarse en cuenta otros factores que comprenden la mano de obra y la bioseguridad; éstos se abordan específicamente después de la lista de equipos que se requiere para cada servicio. Con estos lineamientos se pretende ayudar a establecer una base de conocimientos mínimos para los administradores de

investigación, a fin de que puedan informarse sobre los requisitos básicos para establecer diversos servicios de investigación en biotecnología.

Se espera que, cuando un administrador de Investigación decida que un grupo de Investigadores debe desarrollar su capacidad de investigación en biotecnología, se hagan consultas más detalladas con respecto a las necesidades materiales y los objetivos potenciales de la investigación. Los equipos e instalaciones esenciales requeridos para establecer diversos servicios de investigación en biotecnología se presentan en listados.

En los casos en que se considere conveniente, se ha proporcionado información con respecto a los costos, los recursos humanos y otros aspectos. En otros casos, debido a la amplia gama de posibilidades, se presentan los componentes esenciales que formarían parte de esos servicios de investigación. Asimismo, cuando se describen las características de un servicio de análisis, se limitan las mismas a un servicio moderadamente amplio, para usuarios y propósitos múltiples.

No se describen por separado las instalaciones necesarias para la producción de anticuerpos monoclonales, sino que figuran como componentes de la unidad que se ocupa de la técnica de ADN recombinante. No se trata de una omisión ni un error, sino que se sigue un trabajo realizado recientemente en el laboratorio de Richard Lerner (1989) en el cual se demostró que los anticuerpos monoclonales pueden producirse en *E. coli*. Esa nueva tecnología ya se ha comercializado y se espera que en muy poco tiempo pueda obtenerse fácilmente. Este método hará innecesario el uso de ratones y el uso del cultivo de células animales para la producción de anticuerpos monoclonales, lo cual reducirá el costo de esta tecnología.

Es fundamental que cada unidad se establezca con el propósito de complementar y no de reemplazar las tecnologías existentes, y que se haga todo lo posible por asegurar que los nuevos núcleos de biotecnología no consuman los fondos de los programas de Investigación ya establecidos. También es importante que las unidades que se establezcan procuren convertirse en centros de excelencia, con el propósito de que puedan atraer a científicos de renombre. Algunos factores son elementales para lograr esos objetivos y deben tenerse en cuenta para el establecimiento de cualquier instalación. Esos factores son los siguientes:

- Para que la unidad tenga éxito es fundamental contar con un líder fuerte y experimentado. El director deberá contar con antecedentes que demuestren su productividad en investigación, su experiencia en investigaciones en biotecnología orientadas al logro de objetivos y su dedicación al logro de los objetivos establecidos.
- Deberán establecerse procedimientos eficaces de administración científica para asegurar un grado de flexibilidad apropiado para la ejecución de proyectos de investigación pura y aplicada, interacción entre los investigadores, procesos participativos bien definidos para la adopción de decisiones y procedimientos de rendición de cuentas y de evaluación claramente establecidos.
- Deberá atribuirse prioridad a la capacitación y contratación de personal científico y técnico. Se debe formar y apoyar a estudiantes de postgrado destacados para que realicen estudios de doctorado y posdoctorado en el extranjero, y se les debe dar incentivos para que posteriormente regresen al servicio. El personal técnico también debe ser contratado entre estudiantes de pregrado y se le debe proporcionar capacitación especializada adecuada para el desempeño de sus obligaciones, por ejemplo en el mantenimiento de los instrumentos.
- Se debe establecer y mantener un enlace efectivo con científicos de otros países. Esto puede promoverse mediante años sabáticos, proyectos de investigación conjunta, cursos prácticos impartidos por científicos extranjeros y viajes a congresos y conferencias.
- Las unidades deben reconocer que, si bien no hay que desatender la importancia de la investigación básica, el objetivo principal es desarrollar un producto o un servicio que beneficie a la industria agrícola; en tal sentido, el servicio debe estar al tanto de los problemas locales y abordarlos. Al respecto, la unidad debe tener en cuenta los méritos que tienen los servicios centralizados o descentralizados.
- Nunca se recalcará demasiado la necesidad de prestar apoyo continuo para la continuación de la unidad una vez que se haya establecido.

- Cada servicio debe disponer de un plan estratégico cuidadosamente elaborado, con proyecciones prácticas en cuanto al flujo de fondos e ingresos previstos.
- La unidad debe establecerse como componente esencial de una estrategia nacional de biotecnología; ello requiere su integración efectiva con el gobierno, el sector universitario y el sector privado, y la creación de los mecanismos apropiados para la transferencia de tecnología. La estrategia nacional de biotecnología debe incluir la coordinación y la supervisión de la investigación del país y la elaboración de leyes y reglamentos relacionados con los derechos de patente, la concesión de licencias, los acuerdos sobre regalías y normas de seguridad.
- En la posible, el servicio deberá estar ubicado cerca de un centro de enseñanza o de investigación, con el fin de obtener beneficios mutuos al compartir recursos intelectuales y materiales.
- Los procedimientos administrativos del servicio deben estructurarse de tal modo que faciliten el logro de los objetivos de la investigación. Al respecto, las políticas y los reglamentos administrativos deberán facilitar la compra e importación de materiales y equipo.
- La unidad debe contar con todos los servicios normales requeridos en todo laboratorio moderno, incluidos los servicios eléctricos, agua desionizada, ventiladores extractores y equipos de computación.
- En el diseño de la unidad se deberá prever la probabilidad de un futuro crecimiento.
- La infraestructura de la unidad debe contemplar una biblioteca y recursos de computación y comunicación adecuados, a fin de que el personal especializado tenga fácil acceso a la información más reciente.
- Se espera que la unidad desempeñe funciones de capacitación, además de realizar investigaciones; por lo tanto, cada sección deberá prepararse para recibir a estudiantes de posgrado, becarios doctorados y científicos visitantes.

2.2. Técnicas de ingeniería genética

La Ingeniería genética o tecnología de ADN recombinante es fundamental en la biotecnología moderna. Esta abarca numerosas técnicas y enfoques que pueden ser utilizados en la manipulación genética de animales, plantas y microorganismos (Fig. 4).

Algunas de las técnicas relacionadas con la ingeniería genética son: 1) elaboración de protocolos para la transformación genética de los organismos huéspedes; 2) desarrollo de vectores para la introducción de ADN extraño en los organismos huéspedes; 3) aislamiento de genes de interés o ADNc; 4) caracterización de genes aislados y sus zonas reguladoras; 5) desarrollo de procedimientos que garanticen una expresión regulada y de alto nivel del gen extraño dentro del organismo huésped; 6) desarrollo de procedimientos para la integración de los genes extraños en el ADN cromosomal del organismo huésped; 7) introducción de alteraciones o mutaciones en el gen extraño o su zona de control, a fin de modificar su actividad o su expresión; 8) síntesis de fragmentos definidos de ADN para ser utilizados ya sea como sondas de ADN, para una mutagénesis específica, o en la síntesis de genes completos.

Cuando los objetivos de la manipulación genética son plantas o animales, es necesario tener acceso a instalaciones para cultivo de tejidos animales o vegetales además de las instalaciones para el ADN recombinante. Esas instalaciones para el cultivo de tejidos se describen más adelante en el presente informe.

Laboratorio para la Tecnología del ADN Recombinante

Possibilidades

- Aislamiento y caracterización de genes
- Aislamiento de plásmidos
- Manipulación y expresión
- Transformación genética
- Desarrollo de vectores
- Mantenimiento de cepas
- Análisis de la expresión genética

Recursos humanos

- | | |
|---|-----------------------------|
| 3 científicos de categoría superior (doctorado) | 3 asistentes de laboratorio |
| | 6 estudiantes de postgrado |

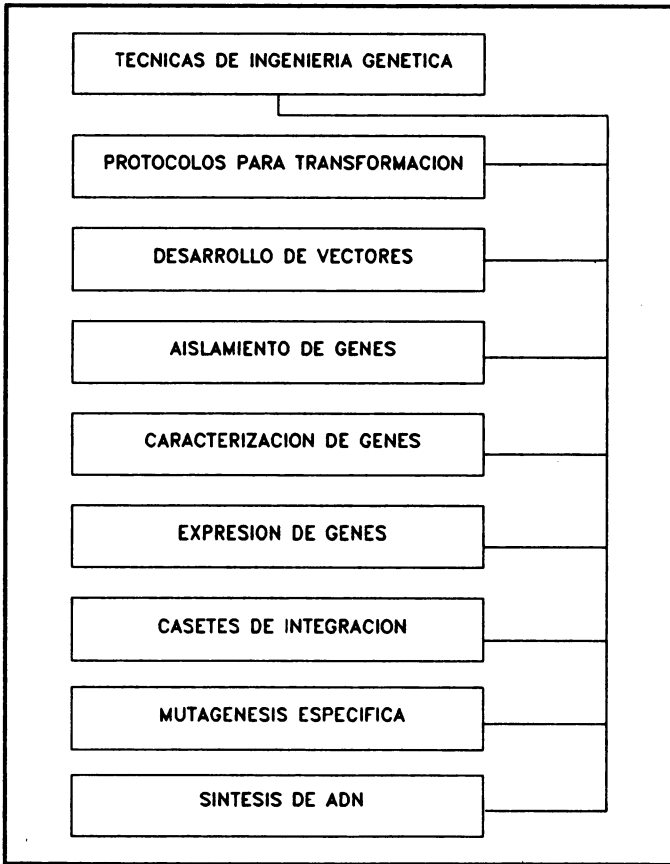


Fig. 4. Uso de técnicas de Ingeniería genética

Equipo

Tipo	Cantidad	Esencial o deseable	Costo estimado (\$ Can)
Centrifugadora Eppendorf	1	E	1 800
Concentrador al vacfo (Speed-vac)	1	E	5 000
Ultracentrifugadora + rotores	1	E	60 000
Centrifugadora de alta velocidad + rotores	1	E	35 000
Incubadora	2	E	4 000
Congelador (-60° C)	1	E	6 000
Refrigeradoras	2	E	2 000
Dispositivo de alumbrado UV + cámara	1	E	4 000
Baño maría con agitador	2	E	6 000
Aparato de geles de agarosa	2	E	1 000
Fuente de poder 500 V	1	E	800
Fuente de poder 3000 V	1	E	2 500
Aparato de geles de secuenciamiento	1	E	1 000
Equipo de autorradiografía	1	D	500
Aparato de geles de proteínas	1	E	1 000
Horno de secado	1	E	1 000
Secadora de geles	1	E	800
Microbalanza	1	E	2 500
Macrobalaanza	1	E	800
Medidor de pH	1	E	1 500
Cámara de flujo laminar	1	E	7 000
Pipetas automáticas	6	E	1 500
Espectrofotómetro UV-Vis	1	E	15 000
Contador Gelger	1	D	700
Congelador (-20° C)	1	E	1 000
Computadora + programas	1	D	3 500
Sintetizador de ADN	1	D	50 000

Tipo	Cantidad	Esencial o deseable	Costo estimado (\$ Can)
Olla de presión grande	2	E	600
Autoclave, tamaño mediano	1	D	30 000
Centrifugadora clínica	1	E	1 800
Máquina de hacer hielo	1	E	2 000
Agitador con calentador	3	E	600
Mezclador Vortex	2	E	1 500
Aparato de baño maría	2	E	1 500
Equipo de electroporación	1	D	3 000
Termociclo PCR	1	D	5 000
Equipo para destilar agua	1	E	2 000

Notas

- Los costos se han estimado en dólares canadienses (\$ Can) aproximados, FOB Waterloo, Ontario, marzo 1990 (Tasa de cambio \$ Can 1.197/ 1 US\$).
- En la lista no se incluyen varias piezas más o menos estándar de equipo microbiológico y bioquímico, tales como pipetas, material de vidrio, termómetros, material de plástico, soportes para los tubos de ensayo y otras. El suministro inicial de este tipo de equipo podría costar de \$ Can. 3 000 a 5 000; se calcula que se necesitarán aproximadamente \$ Can. 1 000 al año para mantener regularmente ese equipo.
- El equipo de autorradiografía y el contador Geiger no serían necesarios si se utilizaran sistemas de marcado con biotina u otros sistemas no radiactivos en lugar del marcado radiactivo.
- La cámara de flujo laminar se utiliza para la contención biológica y también para evitar la contaminación de los cultivos.
- Un sintetizador de ADN puede satisfacer las necesidades de un número relativamente elevado de usuarios. La síntesis de ADN requiere una inversión considerable de suministros químicos costosos.

- El suministro permanente de reactivos y material desechable para un grupo de esta dimensión, como reguladores, componentes de medios, productos químicos finos, material fotográfico, puntas de pipetas, tubos de centrifuga, enzimas de restricción y modificación y otros se ha calculado en \$ Can. 15 000 a 30 000 por año, según los proyectos que se emprendan.

Observaciones generales

1. Un grupo integrado de esta manera podría fácilmente ejecutar de 1 a 4 proyectos diferentes, según la dimensión y el alcance de cada uno de los proyectos.
2. Si se duplica el número de integrantes de este grupo de Investigación, no será necesario duplicar la lista de equipo en su totalidad. Habría que adquirir sólo algunos de los artículos más pequeños; por ejemplo, una sola ultracentrifugadora podría responder sin problema a las necesidades de un grupo más grande.
3. Para que una unidad dedicada a la técnica de ADN recombinante logre sus objetivos, debe iniciar sus investigaciones con un equipo lo más completo posible. Si el equipamiento del servicio está incompleto o si la fuente de abastecimiento o el mantenimiento del mismo es irregular, no tendrá ningún sentido disponer de dicho servicio.
4. Es fundamental que se garantice un nivel básico de financiación para el funcionamiento regular de ese servicio y que esa financiación no dependa únicamente de subvenciones para los proyectos. Al respecto, una financiación estable resulta esencial para asegurar la continuidad del personal capacitado y para mantener el desempeño del servicio en un nivel satisfactorio de investigación.
5. En la medida de lo posible, se deberá capacitar a los investigadores de categoría superior en laboratorios de alto nivel en alguno de los países más desarrollados, como Canadá. Se debe fomentar el establecimiento de contactos y la colaboración con científicos extranjeros, así como también las visitas y evaluaciones anuales por parte de éstos. Además, debe promoverse su participación en reuniones internacionales.

6. Los laboratorios de investigación sobre ADN recombinante deben, en lo posible, estar situados cerca de otros laboratorios o servicios importantes (por ejemplo, bibliotecas). Todos los laboratorios que realizan investigaciones con ADN recombinante en una región determinada, orientadas a los animales, a las plantas o a la biotecnología microbiológica, deberían establecer una red de comunicaciones para mantenerse actualizados y para evitar duplicación de las actividades.
7. Debe tenerse en cuenta la bioseguridad de los experimentos a realizarse. El nivel de contención (tanto física como biológica) dependerá de la naturaleza de los organismos huéspedes, los vectores utilizados y las fuentes biológicas del ADN extraño. Aunque algunos países quizás deseen elaborar sus propias normas o reglamentos para tratar y manipular el ADN recombinante, la formulación de una serie de normas comunes por parte de un grupo de países podría resultar más expeditiva. Entretanto, se podrán aplicar las normas del NIH (EE.UU.).

Además, es necesario elaborar normas referidas a la liberación deliberada en el medio ambiente de microorganismos, plantas y animales genéticamente modificados. Dichas normas ya existen en muchos de los países más desarrollados. El IICA, la OPS (Organización Panamericana de la Salud), la OEA (Organización de los Estados Americanos) y la OIE (Organización Internacional de Epizootias) publicaron en 1988 «Guías para el uso y la seguridad de las técnicas de la Ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante» y, en 1991, el IICA y la OPS publicaron un documento titulado «Guías para la liberación en el medio ambiente de organismos modificados genéticamente». Estas publicaciones tienen como objetivo facilitar el desarrollo de este tipo de normativas en la Región.

2.3. Servicio de escalamiento y líneas de salida

Convendría ubicar este servicio muy cerca de un laboratorio de tecnología de ADN recombinante (en el mismo edificio, por ejemplo) con el fin de: 1) permitir que las dos actividades compartan ciertas piezas del equipo; 2) promover la comunicación y la interacción entre investigadores de ambas actividades; 3) garantizar que todos los investigadores de la

técnica de ADN recombinante reconozcan que existe una meta específica de aplicación para la mayoría de sus proyectos de investigación.

A. Posibilidades:

- Producción experimental en mediana o gran escala de bacterias y hongos recombinantes (pero no células animales ni vegetales)
- Cultivo celular
- Desintegración celular
- Aislamiento y purificación de productos proteínicos.

B. Recursos Humanos:

- 2-3 científicos de categoría superior (doctorado)
- 2-3 asistentes de laboratorio
- 4 estudiantes de posgrado

C. Equipo:

Tipo	Cantidad	Esencial o deseable	Costo Estimado (\$ Can.)
Fermentador 2-5 l	2	E	10 000- 20 000
Fermentador 15-20 l	2	E	40 000- 80 000
Fermentador 100-200 l	1	D	100 000-300 000
Control computadorizado de fermentadores		D	5 000- 20 000
Capacidad para controlar y ajustar pH, temperatura, tasa de agitación y oxígeno disuelto		D	Véase nota
Vapor directo para esterilización		E	5 000- 10 000
Autoclave, tamaño mediano o grande	1	E*	30 000- 50 000

Tipo	Cantidad	Esencial o deseable	Costo Estimado (\$ Can.)
Medidor de pH	1	E*	1 500
Macrobalanza	1	E*	800
Incubadora	1	E*	2 000
Baño maría con agitador	1	E*	3 000
Congelador (-60° C)	1	E*	6 000
Refrigeradora	1	E*	1 000
Cámara de flujo laminar	1	E*	7 000
Espectrofotómetro UV-Vis	1	E*	15 000
Centrifugadora Sharples	1	E**	5 000
Aparato y membranas de filtración de flujo cruzado	2	E**	15 000
Célula de presión (<i>French pressure cell</i>)	1	E***	6 000
Microfluidizador	1	E***	17 000
Sistema HPLC + columnas	1	D	35 000
Colector de fragmentos + Monitor UV	1	E	15 000
Medidor de conductividad	1	E	1 000

Notas

- El equipo que se considera esencial (E) y que se indica con un solo asterisco puede ser utilizado en común con un laboratorio de ADN recombinante cercano (por ejemplo, en el mismo edificio).
- E** indica que se puede utilizar una centrifugadora Sharples o un aparato de filtración de flujo cruzado para el cultivo celular. Si se utiliza el aparato de filtración de flujo cruzado se necesitará por lo menos otro aparato de éstos (posiblemente una unidad más

pequeña) para emplearlo en la concentración y el fraccionamiento del crudo en la mezcla de proteína.

- E*** indica que para la desintegración celular puede utilizarse la célula de presión o el microfluidizador. Si bien los investigadores están más familiarizados con la célula de presión, el microfluidizador tiene capacidad para tratar un volumen mucho mayor de células y, además, está en condiciones de desintegrar eficazmente suspensiones celulares relativamente diluidas, así como también suspensiones celulares más concentradas.
- La cantidad de proyectos diferentes que puede afrontar en determinado momento un grupo de científicos se ve limitada por el número de fermentadores y por la cantidad de equipo disponible para el tratamiento ulterior. Con la cantidad de equipo que figura en la lista, incluido el equipamiento que se indica como deseable (D), se espera que un grupo con esta dimensión pueda emprender hasta 3 ó 4 proyectos diferentes.
- Resulta difícil determinar el costo de los fermentadores en general, debido a que se pueden necesitar diversas combinaciones de mecanismos de control para fines específicos. De manera similar, el costo de la regulación por computadora puede variar considerablemente. Se mencionan rangos de precios de los fermentadores y se indica la gama de posibilidades.

Observaciones generales

1. Los investigadores científicos de categoría superior deben contar con experiencia y capacitación en laboratorios de alto nivel de países desarrollados en materia de ingeniería bioquímica, fisiología microbiana y purificación de proteínas.
2. Es necesario elaborar una serie de procedimientos de operación claramente definidos para la instalación piloto, incluidos protocolos para el tratamiento de desechos y manejo de un volumen relativamente grande de materiales potencialmente peligrosos.
3. En lo posible, se debe fomentar el trabajo por contrato de obra, así como también otras actividades relacionadas con la industria.

Mediante esa interacción se logrará transferir más fácilmente las tecnologías desarrolladas en el orden local.

4. Se debe alentar, en la medida de lo posible, a los investigadores científicos de alto nivel a publicar sus trabajos, a participar en reuniones internacionales y a colaborar con otros científicos fuera de su propia institución.

2.4. Servicios analíticos

Además de la capacidad analítica secundaria que generalmente se asocia con la mayoría de los laboratorios biológicos, convendría establecer un centro de análisis relativamente grande y de finalidades múltiples que pueda proporcionar la gama de servicios de ese tipo requeridos con frecuencia en la amplia esfera de actividades que normalmente desempeñan los programas de biotecnología.

Deberá estar ubicado convenientemente; en la medida de lo posible en un lugar céntrico, en colaboración con una universidad importante o un gran complejo de investigación. Por otra parte, podrían establecerse en varios lugares de América Latina pequeños centros regionales con experiencia analítica en sólo uno o dos campos. Por ejemplo, podría fortalecerse y ampliarse un centro ya establecido de espectroscopia RMN o CG/MS para proporcionar el tipo de servicios necesarios.

En ambos casos, el mandato de la unidad deberá incluir los siguientes puntos: 1) elaboración de protocolos de análisis estándar que puedan ofrecerse a las instituciones asociadas, con lo que se evitarían la duplicación de esfuerzos y muchos de los errores que se cometen en la elaboración de métodos analíticos y en los que se malgasta tiempo y dinero; 2) tratamiento y análisis de muestras que resultan de estudios realizados junto con otras unidades de investigación; 3) capacitación de científicos y asistentes de laboratorio en la metodología analítica y en el mantenimiento y reparación de daños leves de sus propios instrumentos.

También se debe alentar a los científicos que trabajan en la unidad a que realicen sus propios programas de investigación, como actividad complementaria que fortalezca a todo el centro de análisis y sin que el funcionamiento del servicio resulte perjudicado.

Un amplio complejo analítico ubicado en un lugar céntrico tendría ventajas evidentes como centro de capacitación, en especial si se proporcionara alojamiento temporal a los practicantes y a los científicos invitados para impartir cursillos en su respectiva especialidad. Este modelo centralizado facilitaría también un control administrativo eficaz de cada una de las tres funciones antes señaladas, y se podría incorporar gradualmente en alguno de los diversos centros de investigación en donde ya funcionan programas de biotecnología.

Algunas de las desventajas del servicio centralizado son el elevado costo inicial para su establecimiento y la concentración de ese gasto en un solo país. El modelo descentralizado probablemente implique menos gastos de instalación, pues se supone que se establecerá en varios servicios ya existentes. Sin embargo, esa ventaja inicial puede verse contrarrestada por la dificultad de administrar unidades más pequeñas y dispersas como centros eficaces de capacitación.

Cualquiera que sea el modelo que se escoja, el equipo podría adquirirse en varias etapas, con el propósito de amortizar los costos en el transcurso de varios años y anticiparse a posibles cambios en las prioridades. Además, se debe establecer un sistema racional de tarifas a los usuarios que no los haga desistir del uso de los servicios, pero que permita compensar, si no toda, una proporción considerable de los gastos de operación.

Instrumentos recomendados y justificación de su uso

Muchas de las actividades que se incluyen en el ámbito de la biotecnología requieren la separación y, muy a menudo, la identificación de metabolitos específicos de peso molecular alto y bajo. Por ejemplo, en el bioprocesamiento, el objetivo es aislar grandes cantidades de productos altamente purificados sin los contaminantes indeseables y subproductos corrientes en las mezclas de bioprocesamiento. Por tal causa, los procedimientos confiables de análisis y separación son etapas decisivas para que el desarrollo y la continua supervisión de las operaciones a escala comercial sean satisfactorios. Además, si se desea realizar cualquier actividad importante para establecer una gran industria de productos naturales, mediante la identificación de nuevos tipos y fuentes de productos farmacéuticos y agrícolas derivados de la gran diversidad de especies vegetales comunes en América Latina, se requerirán conocimientos analíticos de alto nivel.

De hecho, la experiencia ha demostrado que la realización de operaciones exitosas a escala comercial y basadas en el aislamiento de productos producidos biológicamente tienen, en general, su origen en metodologías elaboradas en el laboratorio analítico. En las recomendaciones siguientes para equipar un laboratorio analítico se indica cuáles son los instrumentos necesarios para adoptar y elaborar métodos confiables y actualizados para la separación y el análisis de una amplia gama de compuestos biológicos.

Tipo de equipo, número de piezas, uso y justificación

1. *Secadoras por congelación*

- Dos unidades para el secado rápido o nuevo secado de muestras sometidas a análisis; por ejemplo, tejidos y extractos vegetales y animales, líquido resultante de la lixiviación del suelo y suspensiones microbianas.
- Costo aproximado: \$ Can. 10 500

2. *Homogeneizadores, molidoras y evaporadores al vacío*

- Uno o más de cada uno.
- Para la preparación, extracción y separación de compuestos de alto y bajo peso molecular obtenidos a partir de tejidos biológicos.
- Usual en prácticamente todos los laboratorios bioanalíticos.
- Costo aproximado del homogeneizador, \$ Can. 4 000
- Costo aproximado de la molidora, \$ Can. 3 500
- Costo aproximado del evaporador, \$ Can. 4 000

3. *Cromatógrafo de gas*

- Dos unidades, cada una con detectores iónicos de llama (sensibilidad de amplio espectro), uno con detector termiónico (selectivo para compuestos de nitrógeno y fósforo) y el otro con un

detector captador de electrones (sumamente sensible, selectivo para halógenos y otros compuestos captadores de electrones).

- Para la separación, identificación y cuantificación de compuestos gaseosos y compuestos fácilmente volatilizados después de una derivación apropiada. Por ejemplo: residuos de plaguicidas; hormonas vegetales y animales, incluidos el etileno, el ácido abscísico y el ácido indolacético; los esteroides y los componentes de las membranas vegetales y animales, incluidos los ácidos grasos y los esteroides.
- Generalmente se necesitan unidades adicionales en los laboratorios de investigación y de tratamiento.
- Costo aproximado por unidad, dos detectores cada uno, \$ Can. 20 000.

4. *Cromatógrafo líquido de alta resolución (HPLC)*

- Dos unidades.
- Detectores intercambiables, incluidos los siguientes: de luz UV y luz visible, de longitud de onda variable (se requieren dos); de fluorescencia (se recomienda uno); electroquímico (se recomienda uno); de colocación de diodos (costoso, se recomienda sólo cuando sea necesario).
- Para la separación, identificación y cuantificación de metabolitos que no requieren derivación y para aquellos compuestos que no son fácilmente volatilizados, por ejemplo, las poliaminas; las hormonas vegetales y animales incluidas las citoquininas, las giberelinas y las aminas biogénicas; los metabolitos secundarios de plantas que tienen un importante valor comercial, incluida la cafeína, la morfina, la efedrina, la quinina y otros alcaloides; los glicósidos cardíacos y esteroides.
- Generalmente se necesitan unidades suplementarias en los laboratorios de investigación y de tratamiento.
- Costo aproximado de los HPLC con sistema de doble bomba, \$ Can. 10 000; detector de colocación de diodos, \$ Can 75 000.

- Costo aproximado del detector de fluorescencia, \$ Can. 16 000; detector electroquímico, \$ Can. 8 000; detector de longitud de onda variable, \$ Can. 15 000.
5. *Aparato para cromatografía rápida y líquida de proteína*
- Una unidad (se recomienda para la elaboración de protocolos estándar, la enseñanza y algunas investigaciones cooperativas).
 - Para la separación, la purificación y la detección de proteínas, polipéptidos y polinucleótidos por medio de la filtración de gel, y columnas de intercambio de iones, de afinidad, de fase inversa y de enfoque (*chromatofocusing*).
 - Costo aproximado, \$ Can. 40 000.
6. *Cromatógrafo de gas acoplado a espectrómetro de masa*
- Una unidad con modalidad de operación para la ionización de productos químicos y electrones, y capacidad de examen confiable. Se recomienda su adquisición para el desarrollo de una industria de productos naturales en plena actividad y crecimiento.
 - Es indispensable tener acceso a una gran base de datos para recuperar e interpretar espectros de masa. Debe considerarse la posibilidad de entablar contactos por computadora o fax con un sistema de servicios similar al disponible en la Oficina de Servicios por Computadora de la Universidad de Cornell, Ithaca, Nueva York.
 - Se utiliza comúnmente para la separación, la identificación positiva y la determinación de la estructura molecular de los compuestos biológicos, por ejemplo los compuestos que fueron aislados e identificados experimentalmente por medio de CG o HPLC.
 - Costo aproximado: \$ Can. 250 000 - 300 000.
7. *Analizador de aminoácidos*
- Una unidad (se recomienda como instrumento para el servicio solamente).

- Para el análisis de conjuntos de aminoácidos libres y de hidrolizados de proteína, y la determinación de secuencias de péptidos cuando se utiliza con el procedimiento de degradación de Edman.
 - Costo aproximado: \$ Can. 85 000.
8. *Espectrómetro de absorción atómica*
- Una unidad con horno de llama y de grafito (se recomienda como instrumento para el servicio solamente).
 - Para la detección y cuantificación de elementos nutrientes y no nutrientes que generalmente están presentes en los tejidos biológicos, los fluidos orgánicos, los líquidos que resultan de la lixiviación del suelo y en los productos farmacéuticos y agrícolas.
 - Costo aproximado: \$ Can. 30 000 (Perkin-Elmer).
9. *Espectrómetro de resonancia magnética nuclear*
- Convendría tener acceso o la posibilidad de utilizar de vez en cuando una unidad de resonancia magnética nuclear.
 - Para determinar la estructura de moléculas orgánicas relativamente pequeñas, que son comunes en los sistemas biológicos.
 - Costo aproximado: \$ Can. 260 000-450 000 (variable), según las necesidades.
10. *Cromatógrafo de gas acoplado a espectrómetro infrarrojo*
- Sería suficiente con tener acceso o la posibilidad de utilizar de vez en cuando este tipo de aparato a menos que se realicen importantes actividades en el campo de la química de los productos naturales.
 - Este equipo se utiliza generalmente junto con el cromatógrafo de gas acoplado a espectrómetro de masa y el espectrómetro de resonancia magnética para definir la estructura absoluta de moléculas biológicas de mediano tamaño.
 - Costo aproximado: \$ Can. 120 000.

11. Colectores de fracciones

- Dos unidades.
- Para la recolección automatizada, durante las 24 horas, de compuestos ya separados sometidos a elución durante la cromatografía a presión baja o alta. Son particularmente útiles para colectar fragmentos de enzimas activas. Muy recomendados.
- Costo aproximado: \$ Can. 15 000.

12. Aparato para cromatografía en capa fina y en papel

- Equipo y material relativamente baratos.
- La cromatografía en capa fina con placas normales y de fase inversa es un mecanismo conveniente y barato para definir los sistemas solventes y mezclas más eficaces durante las separaciones con cromatografía líquida de alta resolución de compuestos seleccionados.
- A la cromatografía sobre papel se le llama a veces la «cromatografía líquida del pobre». Permite utilizar una gran cantidad de muestras relativamente crudas, y algunas secciones del papel que contienen otro compuesto ya separados pueden cortarse y almacenarse fácilmente. Aunque es un poco engorrosa, esta técnica es barata y apreciada aún en laboratorios analíticos ultramodernos.
- Costo aproximado: \$ Can. 800.
- Costo aproximado del escaparate con iluminación UV: \$ Can. 2 200

13. Instalaciones para almacenamiento

- Cámaras frigoríficas y/o congeladores que proporcionen temperaturas de -20 a -70° C.
- Para almacenar muestras recién congeladas y secas, tanto antes como después de la extracción del disolvente. Se sabe que a temperaturas bajas, de -20 a -25° C, ocurren cambios químicos enzimáticos y no enzimáticos en los tejidos y extractos almacenados.

- Costo aproximado: \$ Can. 1 000 (-20^o C) y 6 000 (-60^o C).

14. *Personal*

- Dos químicos analíticos, recomendados para realizar y dirigir los programas de cromatografía de gas, cromatografía líquida de alta resolución y cromatografía de gas acoplada a espectrómetro de masa.
- Un químico orgánico para ejecutar y dirigir los programas de resonancia magnética nuclear y cromatografía de gas acoplada a espectrómetro infrarrojo, si se considera necesaria la adquisición de esos instrumentos.
- Un químico de productos naturales, si la actividad de investigación de productos naturales justifica esa contratación.
- Dos o tres técnicos y asistentes de laboratorio que se ocupen del funcionamiento y la reparación de todo el equipo y del tratamiento de todas las muestras.
- Un número limitado de estudiantes de posgrado y de becarios de posdoctorado que constituyan una futura fuente de especialistas analíticos.

15. *Transporte y comunicación*

- Establecer o contratar un sistema eficiente y bien definido para el transporte de las muestras hacia el centro analítico.
- Asegurar una rápida comunicación entre el centro o los centros analíticos y los laboratorios de biotecnología a su alrededor por medio de sistemas de fax y correo electrónico.
- Establecer un fondo especial para asegurar que la eficacia del centro o de los centros analíticos no se vea afectada por las limitaciones de los sistemas de comunicación y transporte.

2.5. Cultivo de tejido vegetal

Las plantas y sus subproductos constituyen el principal recurso de exportación de la mayoría, si no de todos, los países de América Latina; el uso de cultivos de tejido vegetal tiene el potencial de incrementar la eficacia de la propagación vegetal, la fitogenética y, quizás con el tiempo, la síntesis industrial de fármacos, especias y sustancias aromáticas derivados de las plantas. Los cultivos de tejido se han utilizado con mucho éxito en la industria hortícola durante más de 20 años, como mecanismo para aumentar la propagación vegetativa de muchas especies comercialmente importantes.

Numerosas plantas se producen a partir de: 1) una gran cantidad de células indiferenciadas; 2) una cantidad relativamente reducida de meristemos extraídos que se vuelven a propagar muchas veces en cultivo estéril. Esas opciones constituyen los dos principales métodos de la propagación vegetativa *in vitro*. En la organogénesis (segundo método) los nuevos brotes se producen a partir de los explantes de los meristemos, que luego se separan, se vuelven a cultivar para producir raíces, se trasladan a tubos de suelo y luego se cultivan y se fortalecen en condiciones ambientales cuidadosamente controladas.

En la embriogénesis somática, los fragmentos de callos indiferenciados (tejido esencialmente lesionado) se someten a subcultivo y se induce la producción de raíces y tallos mediante la manipulación de los componentes del medio de cultivo. En una variación de este método, un fragmento de callo se transfiere a un medio nutritivo líquido, se agita para dispersar muchas de las células y se inician subcultivos sin callo.

Estos cultivos líquidos pueden producirse a escala comercial utilizando una tecnología moderna de fermentación, y cada célula teóricamente puede convertirse en una planta cuando se transfiere a un medio apropiado *in vitro*.

Actualmente se desarrollan metodologías para la encapsulación en geles de estos embriones somáticos, con el fin de proporcionar semillas esencialmente artificiales con sus ventajas concomitantes, que son la facilidad y la comodidad para su transporte y almacenamiento.

Además de aumentar la eficiencia de la propagación asexual a escala comercial, la embriogénesis somática ofrece varias ventajas importantes en el ámbito de la biotecnología vegetal:

1. La propagación vegetativa de especies que no es posible propagar fácilmente por medio de mecanismos vegetativos convencionales; por ejemplo, muchas de las coníferas y otras especies madereras más importantes.
2. La producción de plantas sin enfermedades, en especial sin virus, lo cual contribuiría a reducir las restricciones de cuarentena impuestas al traslado de material vegetal a través de fronteras nacionales.
3. Cultivos de embriones de microesporas mediante granos de polen inmaduros que se convierten en embriones haploides. Después de un tratamiento apropiado con colchicina, se producen diploides homocigotas con una expresión completa de características recesivas. Cuando se inducen mutaciones que no son letales en los embriones que se están desarrollando, los genes mutantes se duplican y se expresan. Estas técnicas constituyen un eficaz instrumento genético y ofrecen la posibilidad de producir variedades de plantas con características específicas; por ejemplo, con un mayor nivel de aminoácidos específicos. Además, pueden contribuir a ahorrar muchos años de investigación genética, ya que con estas técnicas se producen líneas genéticamente estables con mayor rapidez que con los métodos tradicionales de autocruzamiento y retrocruzamiento. Además, se evita el problema de la auto-incompatibilidad.
4. La producción de nuevos genotipos mediante la propagación de mutantes producidos durante la embriogénesis. Este método puede servir para la producción de plantas somaclonales con mayor resistencia a las enfermedades, a los metales tóxicos, niveles elevados de sal en el suelo o a los herbicidas comerciales.
5. La posibilidad de obtener nuevos híbridos por la fusión de protoplastos de diferentes especies o variedades y el subsiguiente desarrollo de estos embriones de plantas híbridas en cultivo.

6. La propagación en masa de plantas transgénicas, es decir, las plantas cuyos genomas fueron alterados mediante una de las técnicas que generalmente se utilizan en la biología molecular moderna. El desarrollo de la «planta madre» transformada depende también del cultivo de tejidos, es decir, se logra mediante éste.
7. Los cultivos de células vegetales son, además, una fuente potencial de metabolitos vegetales secundarios de valor comercial, con importantes aplicaciones médicas y agrícolas. Hasta ahora esa posibilidad no se ha materializado en gran escala, pero en varios centros de investigación de todo el mundo se analizan detenidamente los problemas que subsisten al respecto, lo que sin duda abrirá paso a nuevas ideas.

Centros de cultivo de tejidos

Ya existen, y con mucho éxito, en los sectores público y privado de América Latina varios centros de cultivo de tejidos vegetales; su futuro desarrollo comercial dependerá, indudablemente, de los conocimientos especializados con que cuentan.

Si bien el funcionamiento de un laboratorio para el cultivo de tejidos requiere gran intensidad de mano de obra y aunque los gastos de operación no son insignificantes, las instalaciones físicas no son excesivamente costosas en comparación con el costo de un moderno laboratorio analítico o de biología molecular. Los conceptos fundamentales de la metodología son directos, relativamente sencillos, y todos los procedimientos básicos están disponibles en publicaciones científicas.

Sin embargo, los intentos de cultivar nuevas especies generalmente fracasan; muy a menudo ello no se debe a errores en la metodología, sino a la falta de información con respecto a las necesidades fisiológicas de las especies. En esos casos, la composición química del medio de cultivo y las condiciones físicas del cuarto de crecimiento donde se realiza el cultivo son la clave del éxito. Una vez que se cumpla con esos requisitos, el mantenimiento de condiciones asépticas determinará en buena medida el porcentaje de aciertos en los cultivos.

Por lo general, para establecer un centro adecuado para el cultivo de tejidos se requieren tres áreas claramente definidas: 1) un área para

el laboratorio general; 2) un área para la preparación (inoculación) de los cultivos; 3) un recinto o escaparates especiales para la incubación y el crecimiento de los cultivos.

Laboratorio general

- Un espacio para lavar con, al menos, dos fregaderos, y fuentes de agua desionizada y doblemente destilada.
- Grandes cantidades de material de vidrio apropiado.
- Recipientes adecuados para la eliminación del material vegetal y del medio de cultivo ya utilizado.
- Un espacio para la preparación y el almacenaje del medio, bien alejado del espacio para lavar, con el fin de no salpicar con detergente los nuevos medios y las soluciones base.
- Autoclave para la esterilización de todos los utensilios, material de vidrio y medios.

Recinto para preparación del cultivo

- Se recomienda disponer de un ámbito separado con controles de temperatura y con presión positiva del aire que pase a través de un filtro de aire de alta eficiencia (HEPA). Las paredes y los pisos deben estar pintados, limpios y sin polvo.
- Es esencial la instalación de una o más cámaras de flujo laminar con filtros HEPA de gran eficiencia.

Recinto de incubación

- Un ámbito separado, limpio, sin polvo y preferiblemente bajo presión positiva con aire filtrado.
- Se deben controlar todos los factores ambientales, tales como la temperatura, la humedad, el flujo del aire, la luz y el fotoperíodo.
- Los cultivos estáticos deberán colocarse en estantes de metal apilados, cada uno con luces fluorescentes tipo «Gro-Lux» encima.

En los estantes se pueden colocar también cultivos líquidos en agitadores apropiados.

- Además de un ámbito separado para la incubación del cultivo, son apropiadas también las incubadoras construidas especialmente. Se encuentran en el comercio y, por lo general, proporcionan un excelente control de las condiciones ambientales.

Personal

- Un científico y un asistente de laboratorio pueden ocuparse de una pequeña actividad de cultivo de tejidos en la que se mantengan, por ejemplo, algunos cientos de propágulos.

2.6. Instalaciones para la experimentación con plantas

Después de desarrollar el material vegetal seleccionado o transformado genéticamente y su propagación mediante cultivo de tejidos o de callos, es necesario realizar pruebas fuera del laboratorio que simulen situaciones de producción comercial; pueden incluir pruebas en invernadero o en el campo.

Las pruebas en invernadero facilitan la manipulación y el control de la temperatura, el nivel de humedad y el tipo de suelo, así como también la observación continua del desarrollo de la planta y su reacción a los tratamientos y la obtención de muestras de tejido.

Los estudios de parcelas en el campo son esenciales para evaluar la expresión de las nuevas características genéticas en condiciones reales de producción. Si bien la expresión de algunos factores puede evaluarse en la etapa inicial, la prueba final debe realizarse en el campo.

Esto requerirá la realización de estudios bien diseñados de las parcelas, si es posible en varias parcelas de prueba y durante varias temporadas de cultivo.

El nivel de los nutrientes de la planta y otros factores tales como su vulnerabilidad a las enfermedades y plagas de insectos también pueden formar parte de la evaluación de terreno.

Instalaciones de ensayo - Plantas

I. Invernadero con el espacio necesario

1. Instalaciones y equipos

- a. Control de temperatura adecuada y ventilación.
- b. Una sección de aislamiento para el estudio de enfermedades de las plantas.
- c. Secciones aisladas con cedazo para evitar la entrada o salida de insectos.
- d. Abastecimiento de agua (para regar las plantas).
- e. Incinerador para eliminar el material vegetal dañado.
- f. Recinto con cámara de crecimiento y espacio de trabajo; también para el almacenaje de suelo, fertilizantes, herramientas, equipo y otros materiales necesarios.
- g. Balanza para pesar las muestras del suelo, los fertilizantes y otros materiales, con capacidad de hasta 50 kg.
- h. Laboratorio con instalaciones para realizar el tratamiento inicial de la muestra, su identificación y clasificación.
- i. Refrigeradora-congelador para el enfriamiento y/o almacenamiento de muestras.
- j. Balanza analítica, con capacidad de peso de 150 g; apreciación 0,1 mg.
- k. Diversas herramientas y material de vidrio.

2. Personal

Un asistente de laboratorio a tiempo completo y personal de asistencia suplementario cuando aumente la carga de trabajo.

3. *Otros aspectos*

En el diseño y la construcción del invernadero se debe prever la posibilidad de una futura ampliación.

II. *Area de parcelas*

1. *Superficie apropiada para parcelas*

- a. El terreno debe permitir el acceso de equipo para cultivar y cosechar.
- b. Debe existir la posibilidad de restringir el acceso, si fuera necesario.
- c. Una «casa de campo» o lugar adecuado para guardar el equipo, con espacio para desgranar, preparar las semillas, etc.
- d. Abastecimiento de agua para riego, a niveles necesarios para el crecimiento normal o para provocar enfermedades.
- e. Las condiciones del suelo en las parcelas de prueba deben simular, en la medida de lo posible, las condiciones existentes en las zonas en que se pretende producir.
- f. Posiblemente se requieran varias parcelas de prueba para evaluar la reacción de una planta ante diversas condiciones.
- g. Una evaluación completa puede abarcar varias temporadas de cultivo.
- h. Equipo para trillar.
- i. Sección para el almacenaje de semillas con control de temperatura y humedad.
- j. Instalaciones para el secado de semillas y material vegetal completo.

2. *Personal*

- a. Un asistente de laboratorio o más según la naturaleza y el nivel de los estudios.
- b. Personal obrero a tiempo parcial durante los períodos de siembra y cosecha.

2.7. Laboratorio de recuperación de embriones/ocitos y de micromanipulación

Esta información se presenta en varias secciones que abarcan: la preparación de los animales, la recolección de embriones y oocitos, la preparación de recipientes y la micromanipulación y electrofusión. Sólo se cotizan los precios de los artículos mayores. El costo de los diversos materiales de vidrio, cuyo costo es difícil de estimar en cifras exactas, deberá incluirse en cualquier estimación presupuestaria final.

Un recinto para laboratorio de 2 m x 6 m es suficiente. Debe mantenerse lo más limpio posible. Otras sugerencias y consideraciones se señalarán en el momento apropiado. Un criterio importante para que la labor sea satisfactoria en este campo es la preparación de los instrumentos, en general instrumentos de vidrio hechos a partir de diferentes tipos de pipetas.

Preparación de los donantes de embriones y de oocitos. Fármacos Requeridos

La hormona estimuladora de folículos (FSH-P), se presenta en frascos que contienen una dosis de 50 mg. El costo de cada frasco es de aproximadamente \$ Can. 50. Se recomienda la preparación de seis donantes para cada prueba. La prostaglandina F₂-alfa (PG) cuesta aproximadamente \$ Can. 30 por vaca. Por lo general se utilizan cuatro inyecciones de 25 mg cada una: una para sincronizar o controlar el estro al inicio, dos durante el tratamiento de sobreovulación y una después de colectar los embriones. Esta última generalmente no se aplica a los donantes de oocitos porque se les sacrifica.

Recolección de embriones y oocitos

Materiales para la colección de embriones: los frascos para coleccionar pueden prepararse con un soplador de vidrio, aunque están disponibles en el comercio a \$ Can. 75-100 cada uno. Existen también bolsas plásticas esterilizadas para conservar el tapón para la recolección a \$ Can. 2 cada una. Sólo se necesita una por cada día de recolección. Para el período de recolección se necesitan también varios otros tubos y pinzas; deben utilizarse catéteres desechables (\$ Can. 5 cada uno), que pueden emplearse de nuevo después de lavarlos a fondo con agua y esterilizarlos en un gas. Los frascos se limpian y se colocan en la autoclave.

Preparación de los animales receptores

En vacas, se utilizan dos inyecciones de PG, con once días de intervalo; por ejemplo para cada prueba se requiere cerca de 20 animales (Costo: aproximadamente \$ Can. 10 por vaca).

Equipo para micromanipulación y electrofusión y clonación

Un aparato micromanipulador muy bueno (\$ Can. 55 000) incluye accesorios de cámara que pueden colocarse en monitores de video y televisión. Se puede utilizar un sistema menos elaborado. Durante un experimento, se debe contar por lo menos con tres microscopios estereoscópicos con fuente de luces, de unos \$ Can. 5 000 c/u.

Es necesaria una incubadora de CO₂; cuesta \$ Can. 4 300. Además, se utiliza un aparato de electrofusión biotecnológica (Caltec) que cuesta \$ Can. 19 000, para aplicar un electrochoque que fusione el blastómero con el citoplasma del óvulo. Algunos modelos más recientes están disponibles a precios reducidos. Este aparato es acompañado por un micromanipulador que cuesta cerca de \$ Can. 10 000.

Para mantener las temperaturas apropiadas se utilizan hornillas y calentadores. Otro tipo de equipo que ayuda en esta labor incluye: termómetros y balanzas sensibles, medidores de pH y osmómetro. Otros materiales comunes de laboratorio son pipetas de 10 ml y 5 ml; jeringas Pasteur para tuberculina (varios tamaños de tipo desechable); polibulbos; placas de Petri de 100 x 15 mm y 60 x 15 mm; botellas para cultivo de 225 cm³ y 25 cm³, placas para cultivo; tubos para cultivos; filtros Millipore

y filtros adaptables a las jeringas; tubos o mangueras a los cuales se les adapta boquillas para succionar los embriones (algunos utilizan pipetas y jeringas).

Medios necesarios: se utilizan varios tipos de medio; el millar de mililitros cuesta cerca de \$ Can. 25. La gentamicina y la fungizona se utilizan para evitar que se desarrollen microorganismos en el medio. También se utiliza suero bovino fetal. La citocalasina se utiliza para ablandar la zona transparente. El agar se utiliza para fijar los embriones clonados y colocarlos en el oviducto del animal receptor. Se utiliza aceite de parafina para evitar que los embriones se sequen; algunas veces se utiliza manitol y tampones Hepas con fines específicos; por ejemplo, manitol para electrofusión.

Preparación de instrumentos (en su mayoría a partir de micro-pipetas)

Soporte vertical de micropipetas	\$ Can. 3 000
Micro-hornilla	\$ Can. 9 000
Máquina biseladora	\$ Can. 2 000

Con unos \$ Can. 100 000 se puede equipar un laboratorio para clonación.

Instalaciones de experimentación y mantenimiento de los animales

Los animales genéticamente modificados o seleccionados deben someterse a un examen, a fin de asegurar que los factores genéticos deseados se expresen en una situación de producción. Cuando las metas del mejoramiento genético son la producción de leche o las funciones de reproducción, los animales deben permanecer en el sitio hasta la edad adulta y por lo menos durante un ciclo reproductivo. En los casos de resistencia a las enfermedades y los parásitos, la evaluación puede efectuarse al principio del desarrollo, lo cual reduce la necesidad de mantener instalaciones para los animales durante un período prolongado.

Se han considerado dos tipos de instalaciones. En primer lugar, un recinto para un número reducido de animales con corrales individuales y equipado con mecanismos para inmovilizarlos, de tal modo que se puedan obtener muestras de sangre y de tejidos. Además, un laboratorio pequeño donde se puedan tomar, identificar y catalogar las muestras, y

se puedan efectuar algunos tratamientos preliminares, así como almacenarlas de manera apropiada hasta que sean trasladadas al laboratorio analítico.

El otro recinto debería ser más amplio, para acomodar a los animales cuando se requiera información sobre producción y reproducción. Estas instalaciones deberán contar también con varios corrales de aislamiento y un pequeño laboratorio como el ya mencionado.

1. Instalaciones de aislamiento

1. Edificio que posea hasta 24 corrales individuales de aislamiento, de tamaño apropiado para las especies que son objeto de estudio.
 - a. Diseño y materiales que permitan una limpieza y desinfección a fondo.
 - b. Sistema de ventilación controlada. Control de temperatura, si fuera necesario.
 - c. Desagües adecuados; mecanismos para el manejo y almacenaje de estiércol.
 - d. Equipo para inmovilizar a los animales.
 - e. Sala y equipo de operaciones optativo, según las necesidades.
 - f. Laboratorio para identificación, clasificación, preparación inicial y almacenamiento provisional de muestras:
 - Abastecimiento de agua desmineralizada-esterilizada.
 - Refrigeradora-congeladora.
 - Centrifugadora, fuerza mínima 5 000 x G, con rotores adecuados.
 - Otros materiales y material de vidrio.

II. *Instalación de producción*

1. Establo convencional; tamaño, equipo y diseño apropiados para las especies y el número de animales que se han de acomodar.
 - a. Diseño y materiales que permitan limpiar y desinfectar a fondo.
 - b. Sistema de ventilación.
 - c. Equipos que permitan medir el consumo de alimentos de cada animal.
 - d. Desagües adecuados y sistemas de manejo y almacenamiento de estiércol.
 - e. Equipo para inmovilizar a los animales.
 - f. Laboratorio para identificación, clasificación, preparación inicial y almacenamiento provisional de muestras:
 - Abastecimiento de agua desmineralizada.
 - Refrigeradora-congeladora.
 - Centrifugadora, fuerza mínima 5 000 x G, con rotores para satisfacer las necesidades.
 - Otros equipos, reactivos y material de vidrio, según sea necesario.
 - Corrales de aislamiento para los animales enfermos o que necesiten tratamiento. Por lo menos cuatro corrales por 100 animales.

3. CASOS HIPOTETICOS DE APLICACION DE LAS TECNICAS

La lista de los requisitos necesarios para establecer las unidades de investigación no da una idea, necesariamente, de lo que dichos centros pueden lograr. Además, puede suceder que la formulación de enunciados generales con respecto a lo que ciertas unidades pueden lograr no sea útil. Con el propósito de manifestar de una manera

concreta lo que se espera de centros específicos, describimos a continuación tres casos hipotéticos.

Son ejemplos ficticios; sin embargo, contienen una presentación realista de los objetivos, los planes con respecto a las investigaciones potenciales y las necesidades en cuanto a recursos. Los problemas no están diseñados específicamente para el entorno de América Latina, pero tienen en cuenta la capacidad potencial de la investigación en biotecnología y, además, los beneficios que puedan obtenerse de los estudios particulares.

3.1. Producción de un microorganismo con técnicas de Ingeniería genética

Proyecto de investigación

El desarrollo de bacterias de vida libre fijadoras de nitrógeno por medio de técnicas de ingeniería genética, como un fertilizante bacteriano (o bacterias que estimulan el crecimiento de la planta).

Propósito

Sería beneficioso que una bacteria de vida libre fijadora de nitrógeno que, según se ha demostrado, contribuye al crecimiento de la planta, pudiera manipularse genéticamente para obtener una mayor capacidad de supervivencia en el suelo, alrededor de las raíces de la planta objetivo (es decir, en la rizósfera). Para lograr esa finalidad, se ha propuesto mejorar la capacidad de supervivencia de la bacteria de vida libre fijadora de nitrógeno en cuestión, mediante la introducción de uno o más genes extraños. Los genes extraños pueden ser: i) genes que confieren resistencia a los actinomicetes productores de antibióticos en el suelo; ii) copias adicionales de genes para la fijación de nitrógeno; iii) genes que permitan que el organismo introducido utilice material celulósico del suelo como fuente de carbono.

Plan de investigación

En resumen, las medidas necesarias para ejecutar este proyecto incluyen: i) la elaboración de un protocolo de transformación para el organismo objetivo; ii) el aislamiento y la caracterización del gen o genes extraños que han de introducirse en el organismo objetivo; iii) el

desarrollo de un vector apropiado que lleve los genes que se han de introducir; iv) la introducción del vector con el gen o los genes en el organismo objetivo; v) la realización de pruebas para determinar la estabilidad y el funcionamiento adecuado del gen o los genes extraños en el organismo huésped; vi) la evaluación de los efectos fisiológicos de introducir un gen extraño en el organismo huésped; vii) la prueba del organismo huésped recién transformado con respecto a sus propiedades de promotor del crecimiento de plantas (en comparación con la versión no transformada del organismo huésped) en condiciones de laboratorio (es decir, cámara de crecimiento y/o invernadero); viii) las pruebas de campo del microorganismo transformado genéticamente.

Recursos necesarios

Para la ejecución de este proyecto se requiere un científico de categoría superior, un asistente de laboratorio y dos estudiantes de posgrado en el transcurso de cinco años, con un costo estimado de \$ Can. 15 000 por año, sin incluir salarios y suponiendo que se disponga de todo el equipo necesario en el momento de iniciar el proyecto (incluidas las cámaras de crecimiento o el invernadero).

Las últimas pruebas de campo deben realizarse con las precauciones adecuadas y en cumplimiento de las normas para la liberación deliberada en el medio ambiente de microorganismos producidos con técnicas de Ingeniería genética. Después de realizar satisfactoriamente las pruebas de campo, los microorganismos transformados deben cultivarse en grandes cantidades, embalarse y enviarse a los consumidores. El resultado final, en este caso, será un microorganismo producido con técnicas de ingeniería genética que podría aplicarse como cubierta de la semilla y utilizarse para aumentar el rendimiento de los cultivos y, posiblemente, reducir la dependencia de los fertilizantes tradicionales.

3.2. Escalamiento progresivo de una proteína producida por un microorganismo recombinante

Proyecto de Investigación

Creación y aprovechamiento óptimo de un sistema integrado para la producción en gran escala de proteínas a partir de microorganismos recombinantes.

Objetivos

En primer lugar, crear y probar experimentalmente un sistema piloto de fermentación integrada, continua o semicontinua, para la producción, recuperación y purificación de proteínas que son producto de un solo gen y que se producen en un microorganismo recombinante.

En segundo término, desarrollar y probar experimentalmente las diferentes etapas del proceso general y luego integrar esas etapas en un proceso unificado.

Plan de investigación

El microorganismo recombinante será una cepa de *E. coli* que contiene una sola copia de un gen extraño que se integra en el ADN cromosómico como parte de un bacteriófago lambda lisógeno de excisión defectuosa.

Este tipo de constructo evitará cualquier problema de inestabilidad de plásmidos durante el cultivo continuo. El gen extraño se someterá al control de un promotor fuerte y regulable, a fin de que la fermentación pueda dividirse en fases distintas de crecimiento e inducción.

Las etapas del proceso general que se han de examinar y mejorar por separado son: i) composición del medio; ii) mejoramiento de la producción celular y de la actividad y estabilidad de las enzimas; iii) cultivo y concentración de células mediante una filtración de flujo continuo; iv) desintegración celular continua o semicontinua mediante un microfluidizador; v) filtración de flujo cruzado continuo para eliminar los desechos celulares; vi) fraccionamiento, purificación y verificación funcional del producto proteico.

Recursos necesarios

Se espera que este proyecto se ejecute en unos 3-4 años, con 1-2 científicos de categoría superior, 1-2 asistentes de laboratorio y 2 estudiantes de posgrado, a un costo estimado de \$ Can. 10 000-20 000 al año, sin incluir salarios y suponiendo que todo el equipo necesario esté disponible al iniciar el proyecto. El equipo para este tipo de proyecto se estima en un costo de aproximadamente \$ Can. 100 000-150 000. Al concluir este proyecto, se espera que el equipo de

Investigación pueda: i) transferir la tecnología directamente a la industria para la producción a escala industrial de la proteína en cuestión; ii) elaborar protocolos de producción similares para otras proteínas producidas con microorganismos recombinantes.

En el último caso, se prevé que para desarrollar la producción experimental de la segunda proteína se requerirá menos de la mitad del tiempo que se empleó para la primera proteína.

3.3. Elaboración de un plan para la producción en cultivo de tejidos de árboles leñosos perennes a escala comercial

Los actuales conocimientos especializados en el cultivo de tejidos y el gran número de especies vegetales raras que se encuentran en toda América Latina sugieren que es posible desarrollar con éxito una industria ornamental con utilización del cultivo de tejido para producir plantas de follaje tropical y plantas leñosas ornamentales, tales como azaleas, cerezos enanos, cítricos enanos, magnolias, crotones, dracaenas e higos.

Varias empresas comerciales de este tipo han tenido mucho éxito en Canadá y en Estados Unidos. En la mayoría de esos casos, las empresas iniciaron la producción con métodos tradicionales de propagación vegetativa y luego pasaron a utilizar métodos más eficientes basados en las técnicas bien conocidas de la organogénesis y la embriogénesis por medio del cultivo de tejido.

En general, las metodologías para plantas específicas se obtuvieron de artículos publicados en revistas de horticultura, de estaciones de investigación gubernamentales y, cuando se disponía de fondos, de las propias actividades de investigación.

En el siguiente apartado, titulado «Breve descripción de objetivos», se presenta el esquema general utilizado por una de esas compañías para aplicar una nueva tecnología y la elaboración de los protocolos y los medios necesarios para propagar varias especies de plantas leñosas mediante cultivo de tejidos. Si bien gran parte de la investigación preliminar fue realizada en colaboración con científicos universitarios, las pruebas prácticas *in vitro*, en el invernadero y en el campo se realizaron en las instalaciones de la compañía.

El problema de idear el medio de cultivo apropiado, que a menudo toma tanto tiempo y algunas veces resulta desalentador, ha sido simplificado en cierto grado mediante la gran cantidad de publicaciones disponibles sobre el tema, incluida una reciente recopilación de las recetas de más de 2 000 medios para cultivo de tejido que han sido publicadas durante los últimos 50 años (George *et al.* 1987 y 1988).

Breve descripción de los objetivos

1. Elaboración de protocolos para la propagación *in vitro* y el subsiguiente endurecimiento de las plantas leñosas ornamentales y las plántulas de árboles forestales. Con respecto a este objetivo general, existen los siguientes objetivos específicos:
 - a. Desarrollar y perfeccionar técnicas para el cultivo *in vitro* de varias especies leñosas de valor comercial, incluidas las coníferas. Se espera que el cultivo de tejido sea el método que se elija para la reproducción vegetativa de la mayoría de plantas leñosas ornamentales comercializadas por la compañía. Aunque su cultivo resulta más difícil que para muchas plantas herbáceas, la organogénesis y la embriogénesis de varias especies leñosas ahora se realizan habitualmente.
 - b. Reducir los costos de almacenamiento y de mantenimiento mediante una drástica reducción del número de plantas madre que actualmente se requieren para los métodos tradicionales de propagación. Con el cultivo *in vitro*, el meristemo producirá una gran cantidad de plantas, contrariamente a lo que sucede con el método común de «una estaca por planta vendible» utilizado en la práctica tradicional.
 - c. Satisfacer las demandas de temporada más fácilmente, con el ahorro de trabajo, tiempo y espacio.
 - d. Producir plantas sin enfermedades, más vigorosas para la venta y la exportación, en un período de tiempo más corto.
 - e. Elaborar procedimientos para el endurecimiento de las plantas cultivadas, después de que se transfieren a macetas en los invernaderos de la compañía.

- f. **Elaborar los métodos necesarios para el escalamiento progresivo de la producción de cultivo de tejido y para reducir los costos de mano de obra, en lo posible mediante la automatización.**
 - g. **Definir las temperaturas óptimas, las condiciones del suelo, las intensidades de luz y los fotoperíodos para el mantenimiento del vigor de la planta, con la subsiguiente preparación de recomendaciones escritas que se entregarán al cliente en el momento de la venta.**
- 2. *Desarrollo de nuevas especies y variedades.* Los objetivos específicos son los siguientes:**
- a. **Definir las características de interés: resistencia a enfermedades, insectos, herbicidas y estrés.**
 - b. **Examinar visualmente todas las series de producción para la variación somacional. Inducir la variación somacional mediante mutagénesis física y química durante estudios de cooperación con científicos de universidades y del gobierno. Examinar todas las plantas, con el propósito de seleccionar características provechosas mediante la aplicación de determinadas presiones de selección; por ejemplo, temperaturas extremas, intensidades de luz altas y bajas, fotoperíodos diferentes o sequía.**
 - c. **Iniciar actividades conjuntas de investigación con biólogos moleculares de los laboratorios de investigación de universidades y del gobierno, con el propósito de desarrollar nuevas variedades de plantas mediante las técnicas de fusión de protoplasto y transformación de plantas que implican la inserción de una secuencia específica de ADN en el genoma de una planta.**

En resumen, el objetivo de la compañía es utilizar el cultivo de tejidos para incrementar la producción de una gran variedad de plantas más sanas y más atractivas en menos tiempo, con utilización de menos mano de obra y menos espacio que en los métodos más tradicionales de propagación vegetativa, utilizados corrientemente en la horticultura ornamental.

4. POSIBLES LIMITACIONES Y RECOMENDACIONES GENERALES

4.1. Liderazgo

Como se indicó en la sección 2.1., la contratación de un líder científico es de suma importancia para determinar el éxito y la contribución definitiva de cualquier centro de investigación en biotecnología. El director de un centro o unidad debe tener la credibilidad científica necesaria para atraer a personal de renombre y obtener apoyo para la investigación por parte de organizaciones y empresas nacionales e internacionales. Además, debe tener perspicacia en materia científica y comercial para definir objetivos científicos que se ajusten a la realidad, y empuje para asegurar el logro de esos objetivos.

Son pocas las personas que tienen esas cualidades; aunque se cuenta con algunos científicos excelentes en los países de ALC, preocupa en cierta medida que el plantel de posibles directores sea limitado. También es motivo de preocupación que, debido a la inminente crisis de mano de obra en la biotecnología a nivel universitario e industrial en América del Norte y en Europa, algunos de los mejores científicos de ALC posiblemente se vean tentados a abandonar la Región.

A la luz de estas consideraciones, se recomienda atribuir la mayor prioridad a la identificación y la contratación del director de investigación; sería ideal que un comité multinacional de renombrados científicos de ALC apoyara esa tarea.

Debe reconocerse también que quizás sea necesario ofrecer a los directores salarios mucho más elevados que los que normalmente se pagan en los países de ALC y/o incentivos de participación en los beneficios o derechos de patente con respecto a los productos comerciales que han resultado o resulten de sus actividades de investigación. Hay que reconocer, además, que la calidad del líder es más importante que la nacionalidad; por lo tanto, si no es posible contratar a un líder adecuado de la región de ALC, deberá considerarse la posibilidad de nombrar a un científico renombrado de otro país.

4.2. Mantenimiento de los recursos físicos e intelectuales

Evidentemente, es indispensable que cada centro cuente con un apoyo continuo con respecto a la infraestructura, para poder hacer frente

a los gastos normales de operación, gastos de mantenimiento y reparación, y para mantener los recursos intelectuales desde el punto de vista de los recursos de personal y del material de biblioteca.

A menudo, cuando se establecen nuevas instalaciones se hace caso omiso de estas consideraciones; por lo tanto, se recomienda insistentemente que en el establecimiento de cada centro la elaboración de un plan financiero estratégico con proyecciones realistas de los costos e ingresos normales constituya una medida esencial.

Se podrían considerar varios modelos de financiación, entre ellos el establecimiento de un fondo de dotación, compromisos a largo plazo de donaciones anuales por parte de organizaciones nacionales o internacionales y/o asistencia mediante la imposición de un impuesto de investigación a las multinacionales y/o aquellos integrantes del sector privado que probablemente se benefician del centro.

La creación de un equipo de científicos sumamente calificados y dedicados es también fundamental para el éxito de cualquier servicio; como se señala en la sección 4.1., se debe asegurar que no se pierda el personal científico en la competencia con los países desarrollados que se prevé con respecto a recursos humanos calificados. Por lo tanto, se recomienda insistentemente que los científicos cuenten con salarios que sean competitivos en relación con los que se pagan en otros países y que exista, además, flexibilidad para emprender iniciativas científicas, un ambiente estimulante desde el punto de vista intelectual y amplias posibilidades de participar en el proceso de adopción de decisiones del centro.

4.3. Estrategia nacional de biotecnología

Para que los diversos centros o unidades puedan contribuir eficazmente al mejoramiento de la práctica de la agricultura en un país determinado, es necesario que formen parte de una estrategia nacional de biotecnología. El desarrollo de dicha estrategia debe comprender un análisis intensivo entre representantes gubernamentales, universidades y el sector privado; asimismo, deben incluir una declaración de objetivos claramente definidos, que incluyan productos nuevos o mejorados, mercados potenciales y la financiación de alguna oportunidad comercial resultante (capital de riesgo). Es importante que la estrategia propuesta

se ajuste a la realidad y se base en un examen detenido de los recursos existentes y los previstos.

Se recomienda que el país que considere la posibilidad de establecer un centro de biotecnología lo haga en el marco de una estrategia nacional de biotecnología, cuidadosamente formulada, en la que se defina claramente la función que se espera que desempeñe y la contribución del centro. La naturaleza de los centros que ya se han establecido también estará determinada por estas consideraciones.

4.4. Servicios centralizados y descentralizados

Si se dispone de suficientes recursos financieros, cada país, y quizás cada una de las regiones de un país, merece el establecimiento de centros independientes de biotecnología que se concentren en problemas y oportunidades locales específicos. Sin embargo, la realidad económica, junto con la escasez prevista de personal científico, son argumentos fuertes en favor de cierta centralización, o sea que un sólo centro atienda a las necesidades de varias regiones o países.

Es evidente que con una instalación centralizada se hacen economías, puesto que no hay duplicación y los beneficios científicos probablemente surgen como resultado de la concentración en un sólo lugar de una masa crítica de científicos creativos. Sin embargo, al establecer una instalación centralizada, en particular una que satisfaga las necesidades de varios países, es importante que cada país integrante participe estrechamente en la organización y en el proceso de adopción de decisiones del centro.

Un modelo útil que demuestra cómo puede funcionar eficazmente un centro multinacional es el Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en Costa Rica. Todos los países miembros muestran un sentimiento de pertenencia con respecto al Centro y tienen plena participación en sus decisiones. Se recomienda que algunos centros o unidades de biotecnología descritos en el presente Informe sean instalaciones compartidas, centralizadas, y que se desarrolle una estructura organizativa apropiada que permita mitigar cualquier problema político que pueda surgir.

BIBLIOGRAFIA

- ANON. 1985. Agricultural Research. Where is USA Industry Spending Time and Money? *Agric. Eng.* 66 (11): 14-15.
- _____. 1988. Six Promising R&D Thrusts. *Agric. Eng.* 69 (5): 26-27.
- BATES, D.M. 1988. The Potential for New Crops. *Angew. Bot.* 62 (1-2): 31-40.
- BROUSSOLLE, C.; BRULE, G. 1988. Biotechnologies in Brittany, France. Current Situation and Prospects for Development in the Food and Agricultural Industry. *Sci. Agron. Rennes.* 2: 1-25.
- BUHLER, T.J. Agricultural Technology: Can it Recapture Export Markets? *Foreign Agric.* 24 (9): 4-8.
- BUTTEL, F.H.; KENNEY, B.; KLOPPENBURG, J. Jr. 1984. The International Agricultural Research Centers and the Development and Application of Biotechnologies in Developing Countries. Inter-Center Seminar on International Agricultural Research Centers and Biotechnology. Manila, Filipinas. Abril 23-27, 1984. International Rice Research Institute, Manila, Filipinas. pp. 383-394.
- CHANG, W.T.H.; TEIN, W. 1989. Biotechnology in Taiwan Domestic Markets and Beyond. *Trends Biotechnol.* 7 (8): 201-205.
- FOX, J.L. 1986. Cuba's Eager Plunge into Biotechnology. *Chem. Ind. (Lond.)* 0 (8), 258-259.
- GEORGE, E.F.; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. 1987. Plant Culture Media. Vol. 1. Formulations and Uses. 567 p. Exegetics, Inglaterra.
- _____; PUTTOCK, D.J.M.; GEORGE, H.J. 1988. Commentary and Analysis. Vol. 2, 420 p. Exegetics, Inglaterra.
- GERE, T. 1987. Opportunities of Using Biotechnology in Animal Production. *Allattenyesz Takarmanyozas* 36 (2): 115-124.

- GLICK, B.R. 1990. Are Hybridomas Obsolete? *Biotech. Adv.* (en prensa).
- _____ ; PASTERNAK, J.J. 1989. Isolation, Characterization and Manipulation of Cellulase Genes. *Biotech. Adv.* 7: 361-386.
- _____ ; SKOF, Y.C. 1986. Environmental Implications of Recombinant DNA Technology. *Biotech. Adv.* 4: 261-277.
- _____ ; WHITNEY, G.K. 1987. Factors Affecting the Expression of Foreign Proteins in *Escherichia coli*. *J. Ind. Microbiol.* 1: 277-282.
- GREENSHIELDS, R. (Ed.) Resources and Applications of Biotechnology. The New Wave. Stockton Press, Edison, New Jersey, EE.UU. MacMillan Press Ltd., Hampshire, Inglaterra.
- JAIN, H.K. 1988. Plant Genetic Resources and Policy. *Trends Biotechnol.* 6 (3): 73-77.
- LAND, T. 1986. European Program Targets New Technology Stimulation. *Genet. Eng. News* 6 (7): 7.
- LERNER, R. 1989. *Science* 246: 1275-1281
- MARX, J.L. (Ed.) A Revolution in Biotechnology. Cambridge University Press, Nueva York, EE.UU. y Cambridge, Inglaterra.
- MAZZOLA, V. 1987. Trichinosis Research Goes Commercial. *Agric. Res.* (Washington, D.C.) 35 (2): 15.
- MILLER, D.A. 1987. Pesticide R&D Seeks Practical Solutions. *Agric. Eng.* 68 (4): 40.
- MUROMTSEV, G.S. 1987. Development of Agricultural Biotechnology in the USSR. *IZV Akad. Nauk SSSR Ser. Biol.* 0 (4): 485-491.
- PASTERNAK, J.J. 1989. Utilization of Ti Plasmid for Plant Genetic Engineering. *Frontiers Appl. Microbiol.* 3: 1-14.

- _____; J.J.; GLICK, B.R. 1987. Assessing the Environmental Consequences of Genetically Engineered Organisms. *Alternatives 14*: 38-43.
- PRICE, H.S. 1985. Climatic Considerations in Agricultural Biotechnology Development. 190th American Chemical Society National Meeting. Chicago, Illinois, EE.UU. Sept. 8-13.
- PUROHIT, S.S. (Ed.) *Advances in Agricultural Biotechnology. Hormonal Regulation of Plant Growth and Development.* Martinus Nijhoff, Dr. W. Junk Publishers, Dordrecht, Netherlands. Boston, Mass., EE.UU.
- RATNER, M. 1989. Crop Biotech 89. Research Efforts are Market Driven. *Bio-Technology (N.Y.) 7 (4)*: 337-341.
- RIMMINGTON, A. 1989. Biotechnology in the Eastern Bloc. *Bio-Technology (N.Y.) 7 (2)*: 133-136.
- TINDALL, B. 1986. Building a Business out of Biotechnology. *Farm. Chem. 149 (9)*: 20-24.
- VON, A.H.J. 1986. Agricultural Biotechnology and Environment. *Ceres 19 (2)*: 36-40.
- WAGNER, T.E. 1986. Biotechnology and Agricultural Economic Development. 95th Annual Meeting of the Ohio Academy of Science. Toledo, Ohio. April 25-27. *Ohio J. Sci. 86 (2)*: 49.
- WEBER, J. 1986. Agricultural Companies Find Biotechnology Patent Application Process a Thorny Issue. *Genet. Eng. News 6 (7)*: 3.

**Esta edición se terminó de imprimir
en la Sede Central del IICA
en Coronado, San José, Costa Rica,
en el mes de febrero de 1993,
con un tiraje de 500 ejemplares.**





Este documento, elaborado por el IICA en el marco de sus esfuerzos para apoyar a los países de ALC para incrementar sus capacidades de generación y transferencia de agrobiotecnologías, proporciona orientaciones detalladas para los directores de investigación y otras instancias de decisión en ALC, interesadas en el desarrollo de su capacidad de investigación en esta temática. Se incluyen orientaciones con respecto a los requerimientos de personal, equipo e instalaciones, necesarias para el establecimiento de diversos servicios y técnicas de la nueva biotecnología.