

APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA EN LOS RECURSOS GENÉTICOS FORESTALES

R. Martínez-Ruiz¹; H. S. Azpiroz-Rivero²; J. L. Rodríguez-de la O³; V. M. Cetina-Alcalá⁴; M. A. Gutiérrez-Espinosa⁵

¹Universidad Autónoma Indígena de México. (UAIM). Facilitadores Educativos. Los Mochis, Sinaloa, México. Correo-e: ruizrosa@colpos.mx

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias. Km. 38.5 Carretera México-Texcoco, Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. Correo-e: s_azpiroz@yahoo.com

³Depto. de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México. C. P. 56230. Correo-e: jrguez@taurus1.chapingo.mx

⁴Programa Forestal, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. C. P. 56230. Correo-e: vicmac@colpos.mx

⁵Programa de Fruticultura, Colegio de Postgraduados, Montecillos, Estado de México. C. P. 56230. Correo-e: alexge@colpos.mx ¹Autor responsable

RESUMEN

A medida que aumenta la población y sus demandas de productos forestales, las tierras disponibles para la producción disminuyen, por lo que se necesitan esfuerzos coordinados para conseguir la sostenibilidad de la producción forestal. Aunque los sistemas tradicionales de silvicultura y mejoramiento genético continúan siendo importantes en las actividades forestales actuales, los programas convencionales de mejoramiento genético se ven limitados por el largo ciclo de desarrollo de los árboles forestales y la dificultad para distinguir siempre entre la expresión genotípica y los efectos ambientales. La biotecnología ofrece nuevas técnicas que complementan a las metodologías tradicionales del mejoramiento genético forestal. Los avances importantes de la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la biología molecular que han tenido lugar en las dos últimas décadas se encuentran en la base del desarrollo de campos como la crioconservación y la regeneración masiva de plantas (expresión de la totipotencia celular), los marcadores de ADN, la genómica de árboles y la transformación genética. En el ámbito de los recursos genéticos, los marcadores de ADN permiten caracterizar la naturaleza, amplitud y distribución de la variabilidad genética de especies vegetales, y por tanto, facilitan la toma de decisiones sobre qué y cómo preservar. La crioconservación y la regeneración de plantas *in vitro* se están utilizando para conservar y micropropagar material vegetal específico, a fin de llevar a cabo la conservación *ex situ* y permitir el desarrollo de la silvicultura clonal. En este trabajo se realiza una revisión de las aplicaciones de estos campos a las especies forestales. En este contexto se aporta información sobre la actividad de la biotecnología forestal en las diferentes áreas de investigación.

PALABRAS CLAVE: cultivo *in vitro*, crioconservación, mejoramiento genético, marcadores moleculares, ingeniería genética, silvicultura, plantaciones.

APPLICATION OF BIOTECHNOLOGY IN FORESTAL GENETIC RESOURCES

SUMMARY

As population increases, along with its demands on forest products, the land available for production decreases. Thus, coordinated efforts are required to achieve the sustainability of forest production. Although the traditional systems of silviculture and genetic improvement of trees are still important in current forestry activities, the existing conventional programs of genetic improvement and production are limited by the long growth cycle of the trees and the constant difficulty in distinguishing between genotypical expression and environmental aspects. Biotechnology offers new techniques, which complement traditional methodologies of forest genetic improvement. The important advances in techniques of plant tissue culture and molecular biology that have taken place in the last two decades are the basis of the development of fields such as cryoconservation and plant regeneration (expression of cellular totipotency), DNA markers, genomics of trees and genetic transformation. In the realm of genetic resources, DNA markers are making it possible to characterize the nature, extension and distribution of the genetic variability in plant species, therefore facilitating decisions of what and how to preserve. Cryoconservation and *in vitro* plant regeneration are being employed to conserve and micropropagate specific plant material for carrying out *ex situ* conservation and for the development of clonal silviculture. In this study, applications of these fields to the forest species are reviewed. In this context, information is provided on forest biotechnological activity in the different areas of investigation.

KEY WORDS: *in vitro* cultivation, cryoconservation, genetic improvement, molecular markers, genetic engineering, forestry, plantations.

INTRODUCCIÓN

La demanda mundial de productos forestales está aumentando rápidamente, y se espera para principios de este siglo previsiones de escasez. Aunque el ritmo de crecimiento demográfico está disminuyendo progresivamente, el aumento del número absoluto de personas que hay que satisfacer de materias primas puede ser tal que podría alcanzarse pronto la capacidad de carga de las tierras forestales. Por lo que la menor disponibilidad de tierras apropiadas para plantaciones de especies forestales y frente a la demanda de ejecución de prácticas ecológicas correctas, hay una urgente necesidad que la investigación sobre aspectos forestales sea dirigida al aumento de la productividad (turnos cortos y alto índice de producción) y la calidad (maderas superiores, forma y uniformidad del fuste óptima resistencia a plagas, enfermedades y al estrés ambiental) de los árboles que tienen una importancia económica. Se espera que el sector forestal abastezca de materias primas a una población humana en aumento, que se prevé alcanzará los 8,000 millones de habitantes para el año 2020, 6,700 millones de ellos en los países en desarrollo. Si bien los programas tradicionales de mejoramiento genético de plantaciones están pagando dividendos en el mundo industrializado, los esfuerzos se han retrasado en los países en desarrollo, precisamente donde se sentirán las penurias más graves (Difazio *et al.*, 1999).

Por otro lado, México es reconocido como un país megadiverso y ocupa el cuarto lugar entre los 12 países que albergan entre el 60 y el 70 % de la diversidad biológica total del planeta. Se estima que en los países tropicales es urgente formar bancos de germoplasma de especies en peligro de extinción antes de que sean destruidas por la deforestación. En México se calcula una pérdida de 678 mil ha anuales, por lo que ocupamos el segundo lugar en deforestación a nivel mundial (SEMARNAT/CONAFOR, 2001).

En la actualidad resulta clara la importancia de conocer los componentes de la biodiversidad para definir estrategias y planificar las acciones sobre su conservación y uso sostenible. En este sentido, México posee información biológica de buena calidad, sobre todo, en lo referente a la diversidad de ecosistemas, al número de especies presentes en el país y a su distribución en el territorio. Sin embargo, existen grandes lagunas en cuanto a conservación y diversidad genética, es aquí donde la investigación biotecnológica podría participar coadyuvando a identificar, proteger, conservar y multiplicar diversas especies importantes para el país (SEMARNAT/PROCYMAF, 2000).

Si bien las prácticas tradicionales de la silvicultura y del mejoramiento de árboles siguen siendo importantes para las actividades forestales actuales, los programas convencionales existentes se ven limitados por el largo ciclo

de vida de los árboles forestales y la dificultad del mejorador de distinguir siempre entre la expresión fenotípica y los efectos ambientales. Por lo cual la biotecnología desempeña un papel importante en el tratamiento de estos problemas. A nivel mundial se están desarrollando métodos biotecnológicos para complementar los programas convencionales de mejoramiento genético forestal en un contexto comercial, a fin de obtener incrementos continuos en la producción sin aumentar la utilización de tierras o mediante el uso de suelos marginales (Burdon, 1994).

La investigación sobre mejoramiento de especies arbóreas se divide en dos categorías: la investigación complementaria, como por ejemplo, la recolección de datos sobre biología reproductora y genética, necesarios para llevar a cabo una selección eficaz; y la investigación estratégica, cuya finalidad es elaborar nuevos métodos para la producción de especies mejoradas. Según Burdon (1999) muchos proyectos de investigación estratégica relacionados con la biotecnología se han realizado a expensas de otras actividades necesarias de mejoramiento de especies arbóreas. Lógicamente, es importante establecer el orden de prioridad de los objetivos y recurrir a la biotecnología sólo si se posee un profundo conocimiento de las especies en que se realizan los experimentos. No obstante, si se dispone de información y conocimientos biológicos básicos, y existen programas idóneos de mejoramiento de especies forestales, la biotecnología puede ser un instrumento muy valioso.

La biotecnología ofrece nuevas herramientas que se suman a las clásicas de la silvicultura, para cumplir dos objetivos básicos de la gestión forestal actual: mantenimiento de la diversidad de los bosques naturales para la conservación y la utilización de los recursos genéticos, y mejoramiento genético en las plantaciones forestales.

LA APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA A LOS PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO, PRODUCCIÓN Y CONSERVACIÓN FORESTAL

En su sentido más amplio, la biotecnología es el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad e incluye los métodos convencionales de fitomejoramiento y cultivo. Además, la nueva biotecnología ofrece una serie impresionante de técnicas para superar las limitaciones biológicas convencionales debidas a las grandes dimensiones de los árboles y a los procesos sexuales retardados, comunes a las especies leñosas. Estas técnicas incluyen: cultivo de células y micropropagación, selección genotípica *in vitro*, conservación *in vitro* y un gran número de nuevas tecnologías en el campo de la genética molecular (Sánchez *et al.*, 1999).

Hay muchas definiciones para describir la

biotecnología. En términos generales, biotecnología es el uso de organismos vivos o de compuestos obtenidos de organismos vivos para obtener productos de valor para el hombre. Como tal, la biotecnología ha sido utilizada por el hombre desde los comienzos de la historia en actividades tales como: la preparación del pan y de bebidas alcohólicas o el mejoramiento de cultivos y de animales domésticos. Históricamente, biotecnología implicaba el uso de organismos para realizar una tarea o función. Si se acepta esta definición, la biotecnología ha estado presente por mucho tiempo en procesos tales como: el compostaje, el cual aumenta la fertilidad del suelo permitiendo que microorganismos del mismo descompongan residuos orgánicos, la producción y uso de vacunas para prevenir enfermedades humanas y animales, la producción de cerveza, vino, queso o yogurt que implican el uso de bacterias o levaduras con el fin de convertir un producto natural en otro producto de fermentación más apetecible (Sánchez, 2000).

Una definición más exacta y específica de la biotecnología “moderna” es “la aplicación comercial de organismos vivos o sus productos”, que involucra la manipulación deliberada de las moléculas de ácido desoxiribonucleico (ADN). Ésta definición implica una serie de técnicas de laboratorio que, durante las últimas décadas, han sido responsables del tremendo interés científico y comercial en biotecnología, la creación de nuevas empresas y la reorientación de investigaciones en universidades (Pena y Seguin, 2001).

La biotecnología consiste de un gradiente de tecnologías que van desde las técnicas de la biotecnología tradicional largamente establecidas, ampliamente conocidas y utilizadas (fermentación de alimentos, control biológico), hasta la biotecnología moderna, basada en la utilización de las nuevas técnicas del ADN recombinante (llamadas de ingeniería genética) así como los nuevos métodos de cultivo *in vitro* de células y tejidos (Difazio *et al.*, 1999).

La ingeniería genética vegetal es una extensión de la tradición de modificar las plantas, con una diferencia muy importante: la biotecnología vegetal permite la transferencia de una mayor variedad de información genética de una manera más precisa y controlada (Mayer, 2001).

Al contrario de la manera tradicional de modificar las plantas que incluyen el cruce incontrolado de cientos o miles de genes, la ingeniería genética vegetal permite la transferencia selectiva de un gen o unos pocos genes deseables. Con mayor precisión, esta técnica permite que los mejoradores puedan desarrollar variedades con caracteres específicos deseables y sin incorporar aquellos que no lo son (Dale *et al.*, 2002).

En la base de las nuevas biotecnologías de plantas

desarrolladas, están las técnicas de aislamiento de células, tejidos y órganos de plantas y el crecimiento de éstos bajo condiciones controladas (*in vitro*). Existe una variedad considerable de técnicas disponibles que difieren ampliamente en sofisticación y en el tiempo necesario para producir resultados útiles (Sánchez *et al.*, 1999).

Las técnicas de cultivo *in vitro*

Se considera que el cultivo de tejidos es una tecnología importante para los países en desarrollo con vistas a la producción de material vegetal de calidad y libre de enfermedades.

El inicio del cultivo de tejidos vegetales se desarrolló durante las primeras décadas del siglo XX. Los estudios moleculares completos y rigurosos solamente se iniciaron hacia 1970. Aunque se realizaron intentos de cultivar células y tejidos vegetales aislados desde 1902, estudios formales, organizados y detallados comenzaron en la década de 1930 los cuales estuvieron fuertemente influenciados por el descubrimiento en 1935 de la primera sustancia natural reguladora del crecimiento vegetal, la auxina ácido indolacético. Las bases científicas para el desarrollo de los sistemas de cultivo de células y tejidos vegetales se fundamentan en la teoría celular de Schleiden y Schwann la cual enuncia que células individuales en un organismo tienen la ‘capacidad de vida independiente’ y en el concepto Darwiniano de regulación hormonal del crecimiento vegetal. (Sánchez, 2000).

Simultáneamente Philip White en los Estados Unidos, Roger Gautheret y Pierre Nobercourt en Francia comenzaron sus experimentos que llevaron al crecimiento ilimitado de raíces de plantas en 1934 y células en cultivo en 1939 (Smith y Wood, 1998). Durante el transcurso de su trabajo con el cultivo de células de raíces de plantas de tomate infectadas con virus, White también observó que raíces subcultivadas frecuentemente se encontraban libres de virus. Esta observación llevó posteriormente al uso de cultivos de meristemos para la eliminación de virus y estableció las bases para el trabajo actual de micropropagación industrial a nivel mundial (Smith y Wood, 1998).

El descubrimiento de las citocininas y el hallazgo de que éstas, en combinación con las auxinas que regulan la morfogénesis de brotes, fue una piedra angular importante en el desarrollo de técnicas para la regeneración de plantas a partir de células en cultivo. Al mismo tiempo se describió la formación de embriones somáticos a partir de cultivos de callos y células en suspensión provenientes de zanahoria. Aunque ya se podía obtener regeneración de plantas a partir de células, solamente hasta 1965 se presentó evidencia inequívoca de la totipotencia de células vegetales completamente aisladas (Smith y Wood, 1998).

Hasta alrededor de 1980 la regeneración de plantas estuvo limitada a algunas especies dicotiledóneas como modelo, y la mayoría de especies de leguminosas, monocotiledóneas y leñosas continuaban siendo recalcitrantes al crecimiento sostenido y regeneración en cultivo *in vitro*. Estos problemas se fueron superando eventualmente mediante el uso cuidadoso y adecuado de los reguladores y de las condiciones de crecimiento (Timmis, 1998).

El aislamiento en 1969 y fusión en 1970 de protoplastos vegetales, y la regeneración de plantas a partir de ellos en 1971, generó mucho optimismo para el mejoramiento vegetal mediante la producción de híbridos somáticos (Rivera *et al.*, 1998). A pesar de los esfuerzos realizados, no se han obtenido híbridos novedosos de utilidad comercial de ningún cultivo de importancia. Sin embargo, los protoplastos han demostrado su utilidad para la introducción directa de ADN llevando a la obtención de plantas transgénicas y para estudios básicos de regulación de genes (Rivera *et al.*, 1998).

La producción de plantas a partir de cultivos de anteras en 1964 y posteriormente de microsporas fue recibida como un gran éxito dirigido hacia la obtención rápida de líneas homocigotas para el mejoramiento vegetal. Esta tecnología, igual que la fusión de protoplastos, no ha respondido a las expectativas iniciales aunque se han obtenido algunas variedades útiles de arroz y de algunos otros cultivos. De manera similar, la presunción de que la variación generada en el cultivo (variación somaclonal) podría ser útil y explotada para ampliar la base genética de los cultivos, ha sido descartada y dejada a un lado después de intensos trabajos con resultados pobres (Smith y Wood, 1998).

El cultivo de tejidos comprende la micropropagación, el aislamiento y cultivo de embriones, la regeneración a partir de callo o de suspensiones celulares, el cultivo de protoplastos, anteras y microsporas. Estas técnicas se están utilizando en particular para la multiplicación de plantas en gran escala. La micropropagación ha resultado especialmente útil en la producción de material de plantación de gran calidad y libre de enfermedades de una amplia variedad de cultivos (Smith y Wood, 1998).

Al principio se intentó a partir de protoplastos, pero resultó laborioso y no funcionó con muchas plantas. Pero en los últimos 10 años se realizó mejor: el éxito consiste en extraer porciones de tejidos inmaduros (explantes), que siguen conservando su potencial morfogénico (totipotencia) y cultivarlos en medios nutritivos suplementados con mezclas de dos tipos de hormonas vegetales: auxinas (que tienden a inducir crecimiento de raíces) y citocininas (inducen caulogénesis). Lo que se obtiene en principio es un cultivo embriogénico que forma el llamado embrión somático, éste retiene el potencial

morfogénico durante mucho tiempo. De este embrión se puede a su vez regenerar plantas completas normales y fértiles. Esto ha permitido que actualmente se puedan regenerar casi todas las plantas (Merkle y Dean, 2000).

La aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en especies forestales

A) Almacenamiento *in vitro* y crioconservación.

Estas biotecnologías comprenden el mantenimiento de células, tejidos u órganos de cultivos en los que se reduce la velocidad del crecimiento (por ejemplo disminuyendo la luz, la temperatura o los nutrientes) o se suspende (mediante inmersión en nitrógeno líquido). La crioconservación entraña muchas dificultades técnicas, especialmente en la posterior regeneración de las plantas procedentes de los cultivos crioconservados, pero los últimos resultados son en general alentadores. Se ha logrado regenerar plantas a partir de tejidos crioconservados en más de 70 especies vegetales, incluyendo el coco, el hule, el cacao y el café, así como otras especies arbóreas (Sánchez, 2000). Estos resultados permiten confiar en que las tecnologías de conservación de germoplasma puedan tener diversas aplicaciones en el mejoramiento y conservación de las especies forestales (Sánchez, 2000).

Aunque el almacenamiento *in vitro* y la crioconservación se utilizan cada vez más para el almacenamiento de germoplasma amenazado de especies agrícolas (Donnan, 1996), respecto a las especies forestales tienen poca aplicación. Los acervos génicos de casi todas las especies industriales establecidas están bien conservados en rodales *in situ* y *ex situ*, y en bancos de semillas (Burke, 2001). Sin embargo, la diversidad genética de muchas especies arbóreas está seriamente amenazada, sobre todo, latifoliadas tropicales y especies no industriales. No se conocen bien ni la distribución geográfica de estas especies ni sus características biológicas y taxonómicas (Merkle y Dean, 2000). Los principales obstáculos para la conservación de germoplasma de especies arbóreas forestales son la insuficiencia de recursos económicos disponibles para el estudio, recolección y caracterización necesarios antes de almacenar cualquier germoplasma, y la poca estabilidad a largo plazo de muchas de las instalaciones existentes para el almacenamiento de semillas (Sánchez, 2000). Si se tratase de especies recalcitrantes (es decir, especies que producen semillas difíciles de almacenar) se debería dar prioridad al establecimiento de plantaciones *ex situ*, lo que facilitaría la urgente necesidad de la evaluación de los individuos. A más largo plazo, la crioconservación y el almacenamiento *in vitro* podrían tener alguna aplicación como estrategia complementaria de conservación, pero sólo en el caso de poblaciones bien estudiadas y recalcitrantes (Burke, 2001).

El mejoramiento genético de los árboles tiene que enfrentar el conflicto entre maximizar los beneficios genéticos y minimizar la erosión genética (Mann y Plumner, 2002). Además, la variación genética debe ser amplia para permitir aumentos en las generaciones y selecciones futuras para ambientes, sistemas de ordenación o enfermedades cambiantes. Esto, junto con el largo ciclo de desarrollo de los árboles, resultó en la actualidad, la utilización de grandes cantidades de tierras para el almacenamiento de genotipos "potencialmente útiles" por parte de la industria forestal. Además, a veces algunos de estos genotipos se pierden debido a peligrosos acontecimientos ambientales (Mann y Plumner, 2002). En la silvicultura forestal, la pérdida del germoplasma o del material de producción puede ocurrir también en otros tipos de operaciones. Por ejemplo, en el caso de las industrias que están utilizando técnicas de micropropagación como parte de sus programas de producción, los cultivos *in vitro* y/o los propágulos a veces alcanzan un grado deseable para el trasplante o el transporte antes de que estén disponibles, la mano de obra necesaria para las manipulaciones requeridas o el espacio necesario en el invernadero, o antes de que el mercado o los consumidores estén preparados para aceptarlos (Barrett *et al.*, 1999). Estos problemas pueden ser superados mediante el almacenamiento del germoplasma de interés *in vitro* bajo un sistema de almacenamiento de crecimiento mínimo (temperatura inferior a 10 °C, aprovisionamiento reducido de oxígeno, nutrientes reducidos, etc.) y/o la crioconservación (Barrett *et al.*, 1999).

El sistema de almacenamiento de mínimo crecimiento proporciona sólo una solución a corto plazo para el almacenamiento del material vegetal a medida que los cultivos pierden la capacidad de regeneración después de pocos meses. En el caso del eucalipto, se han almacenado cultivos bajo condiciones de mínimo crecimiento (medio muy bajo de nutriente a 4 °C) por seis meses, sin pérdida de la sobrevivencia (Berjak, 1999). Sin embargo, bajo la crioconservación (a -196 °C) los procesos metabólicos y la deterioración biológica se detienen y (teóricamente) el material biológico puede ser almacenado indefinidamente (Burke, 2001). Debido a que sólo partes muy pequeñas de material biológico puede sobrevivir al estrés de congelación, las partes de plantas utilizadas para la crioconservación incluyen yemas axilares, trozos de callos, alícuotas de cultivos de células en suspensión y polen. Antes de la inmersión y almacenamiento en el nitrógeno líquido, los explantes tienen que ser preparados. Esto generalmente implica el pre-cultivo en un medio (elevado potencial osmótico) apropiado, deshidratación a bajo contenido de humedad, sin la pérdida de la viabilidad y tratamiento con crioprotectores (por ejemplo, el glicerol, el sulfóxido de metilo y la sacarosa) (Diez y Gil, 1999).

La supresión de los procesos de crecimiento implica también el mantenimiento del estado fisiológico de

maduración alcanzado por los tejidos hasta ese momento, sin la incertidumbre que acompaña a otras estrategias de sustitución como la poda repetida o la propagación vegetativa. Por consiguiente, la crioconservación merece mucha más atención como medio de mantener la fase juvenil durante la realización de ensayos clonales simultáneos y en consecuencia, aprovechar las ventajas genéticas que ofrece la aplicación de técnicas de propagación clonal con especies industriales. Esta tecnología se puede aplicar esencialmente cuando existen programas adecuados de mejoramiento, cuando la aplicación de las técnicas clonales a la silvicultura es un objetivo realista, y cuando el rejuvenecimiento es difícil, especialmente en el caso de las coníferas (Rivera *et al.*, 1998).

La crioconservación de germoplasma comienza a ser una herramienta de gran utilidad para la conservación de recursos fitogenéticos. Ya que las técnicas basadas en el cultivo *in vitro* se están haciendo imprescindibles para la conservación *ex situ* y el intercambio de germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente o que tienen semillas recalcitrantes (Toribio *et al.*, 2000). Más de cuarenta géneros y sesenta especies de plantas leñosas han sido objeto, en los últimos diez años, de intensos estudios para lograr protocolos viables de crioconservación. El paso más crítico para lograr un protocolo viable es reducir el contenido de humedad del material a conservar y/o evitar la formación de cristales de hielo (Toribio *et al.*, 2000).

En general, las semillas, los embriones y los ejes embrionarios se crioconservan previa deshidratación por aire, los ápices y meristemas se someten a un proceso de vitrificación o encapsulación-deshidratación, y los callos y cultivos en suspensión se tratan con un proceso de vitrificación (Gartland *et al.*, 2000)

El material más habitual para crioconservar es el de las especies que se propagan vegetativamente, pudiendo interesar la conservación de clones específicos con características de interés. Es el caso de genotipos de *Populus alba*, en los que se ha desarrollado un protocolo de crioconservación de yemas axilares utilizando la técnica de vitrificación como elemento crioprotector que logra porcentajes de supervivencia del 90 % (Caccavale *et al.*, 1998).

Especies que se propagan habitualmente por semilla, pero que se encuentran amenazadas por alguna causa y con riesgo de extinción, son también objeto de prácticas de crioconservación. Un caso es la especie *Juglans cinerea*, que en Norteamérica está catalogada como en peligro debido a la enfermedad del hongo *Sirococcus clavignenti-juglandacearum*; para esta especie se han desarrollado protocolos de conservación utilizando ejes embrionarios sometidos a desecación lenta (Beardmore y Vong, 1998).

Se están desarrollando también protocolos para especies con semillas recalcitrantes, en el caso del género *Quercus* se ha logrado recuperar el crecimiento de ejes embrionarios en *Q. suber* y *Q. ilex* encapsulados en cápsula de alginato (González *et al.*, 1999a).

En diversas especies se han puesto a punto métodos de crioconservación para mantener material valioso procedente de cultivo *in vitro*. En la especie tropical *Guazuma crinita* se ha logrado la recuperación tras inmersión en nitrógeno líquido de explantes consistentes en agrupamientos de yemas adventicias, mediante tratamiento previo de encapsulación vitrificación (Maruyama *et al.*, 1998).

La aplicación actual más importante de la crioconservación en especies forestales es la que incluye estrategias de control del cambio de fase, para desarrollar la denominada forestación clonal de alto valor. Es una forma particular de conservación de recursos genéticos para su utilización en programas de mejoramiento. Esta aplicación se debe a dos factores. Por una parte, al hecho de que, en la gran mayoría de especies forestales, el cambio de fase entre las condiciones de juvenilidad y madurez condiciona fuertemente las capacidades morfogénicas, llegando a hacer prácticamente imposible la propagación vegetativa de árboles adultos. Por otra parte, las malas correlaciones entre caracteres de interés en estados juvenil y adulto impide la selección precoz (Park *et al.*, 1998). La crioconservación, como parte del desarrollo de la forestación clonal, se basa en la buena aptitud de los embriones somáticos y de los cultivos embriogénicos para soportar el almacenamiento en nitrógeno líquido, así como en su gran capacidad de multiplicación posterior, aplicándose actualmente de forma preponderante en el caso de las coníferas (Park *et al.*, 1998). A partir de semillas procedentes de cruzamientos controlados (que son caras, escasas y en las que ya se puede obtener una determinada ganancia genética), se generan con facilidad líneas embriogénicas de las que se pueden obtener plantas clónicas. Mientras dichas plantas procedentes de muchos clones se plantan para evaluación en ensayos clonales, las respectivas líneas embriogénicas se introducen en crioconservación. Al cabo de los años, cuando ha concluido la evaluación, se dispone del material base para iniciar una multiplicación rápida de los mejores clones debido al mantenimiento del pleno potencial embriogénico (Diez y Gil, 1999).

B) Regeneración de plantas. La regeneración *in vitro* de plantas se está utilizando como un medio para lograr la multiplicación rápida de individuos que se encuentran en poblaciones amenazadas, a fin de iniciar su conservación *ex situ*. La intensa presión que han sufrido en las últimas décadas las regiones tropicales ha conducido a la desaparición de algunas especies forestales y a poner a otras en peligro de extinción. Se están llevando a cabo

trabajos con especies tales como *Santalum album* y *Pterocarpus santalinus* para lograr su regeneración *in vitro*, como medio de multiplicación con fines de conservación (Murugesh *et al.*, 1999).

La regeneración se puede lograr por dos vías: organogénesis y embriogénesis somática. La primera vía es la más clásica, habiéndose publicado cientos de trabajos desde los inicios del cultivo *in vitro*, siendo estas técnicas las que han llevado a las plantas ornamentales al ámbito comercial. La forma más común de regeneración, y la que presenta mayores garantías de estabilidad genética, es la inducción del desarrollo de yemas axilares, seguida del enraizamiento de las mismas (Frampton *et al.*, 1998; Deshpande *et al.*, 1998).

Diversos grupos de investigación han abordado esta vía de regeneración con diferentes especies y con objetivos tanto de propagación clonal como de regeneración después de transformación genética. Se han tratado las siguientes especies: *Eucalyptus globulus* (Villar *et al.*, 1999), *Castanea sativa* y el híbrido *C. sativa x crenata* (Ballester *et al.*, 1999), *Quercus robur* (Gartland *et al.*, 2000), *Fagus sylvatica* y *F. orientalis* (Cuenca, *et al.*, 1999), *Ulmus minor* y el híbrido *U. minor x pumilla* (Diez y Gil, 1999), *Pinus pinea* (Ordás y Humara, 1999) y *Azadirachta indica* (Martínez *et al.*, 1999) entre otras.

La embriogénesis somática se está configurando como la opción más apropiada para la regeneración de plantas con especies forestales. En primer lugar presenta unas elevadas tasas de multiplicación mediante embriogénesis secundaria o recurrente (Ishii *et al.*, 1999) lo que asegura la rápida amplificación de individuos seleccionados. Por otra parte, los cultivos embriogénicos suelen presentar una aceptable capacidad para la crioconservación, manteniendo todo su potencial de propagación (Park *et al.*, 1998) y buena estabilidad genética (Barrett *et al.*, 1999). En la actualidad existen publicados protocolos de regeneración por embriogénesis somática en varias especies forestales, tanto coníferas (Haggman *et al.*, 1999; Filonova *et al.*, 2000) como frondosas (Endemann y Wilhelm, 1999). Se ha tratado esta vía de regeneración en algunas especies, entre ellas *Quercus suber* (Celestino *et al.*, 1999), *Quercus robur* (Cuenca *et al.*, 1999), *Pinus nigra* (Radojevic *et al.*, 1999) y *Azadirachta indica* (Martínez, *et al.*, 1999).

Los problemas más importantes de esta vía de regeneración, con la que se prevé alcanzar la automatización del proceso, radican en la necesidad de lograr cultivos sincrónicos, mejorar el proceso de maduración y lograr la inducción en tejidos procedentes de árboles adultos (Burke, 2001). En la actualidad, la especie más desarrollada en relación a estas técnicas es la palmera de aceite (*Elaeis guineensis*), de la que existen plantaciones productivas (Khaw *et al.*, 1998). Otras

especies, principalmente coníferas, como *Pinus radiata*, *Pseudotsuga menziesii*, *Picea glauca* y *Picea abies* (Timmis, 1998), pero también algunas frondosas, como *Hevea brasiliensis* (Carron *et al.*, 1998), tienen establecidos desde hace unos años ensayos clonales. En los últimos años están apareciendo trabajos que indican la posibilidad de obtener embriogénesis somática a partir de individuos adultos (Toribio *et al.*, 2000). Ello abrirá la posibilidad para la conservación *ex situ* de individuos que tienen dificultades de reproducción sexual y presentan riesgo de extinción.

Actualmente, se está logrando una mayor producción de genotipos seleccionados (superiores), en parte utilizando la micropropagación. Han sido desarrollados protocolos de producción y rentabilidad para numerosas líneas puras e híbridos de *Eucalyptus* sp. (Gartland *et al.*, 2000) que tienen valor industrial. En el caso de *Eucalyptus* sp., los explantes son seleccionados de las semillas (pruebas de procedencia), de las plantas para setos o de las plantas adultas en macetas y luego son inducidos a multiplicarse y a generar entre 10 y 40 brotes por explante inicial, dependiendo del genotipo de los padres y del protocolo adoptado. La producción de raíces puede ser inducida *in vitro* o *ex vitro* y la subsiguiente aclimatización (fortalecimiento) se logra con éxito en el invernadero (Gartland *et al.*, 2000).

Los resultados de los ensayos de campo durante cuatro años sobre los clones de *Eucalyptus* (Villar *et al.*, 1999) indican que la velocidad de crecimiento, uniformidad y calidad de las plantas micropropagadas es comparable o superior a las que muestran los individuos del mismo genotipo producidos a través de la micropropagación convencional (estaquillas enraizadas). Además, si las mayores velocidades de crecimiento observadas hasta la fecha de las plantas tisulares de cultivo (en comparación a sus equivalentes estaquillas enraizadas) se mantiene, podría ser posible cortar los árboles antes de los siete años, periodo estándar de rotación completa para los árboles de eucalipto en Sudáfrica (Villar *et al.*, 1999).

Además del uso de la micropropagación como medio directo de producir propágulos para el establecimiento de plantaciones, las técnicas *in vitro* pueden ser utilizadas más selectivamente en asociación con un programa de macropropagación de producción. Por ejemplo, el cultivo de tejidos puede ser utilizado para la producción de existencias o material para jardines clonales, de los cuales se cortan estacas para el establecimiento de plantaciones. A este propósito y documentado para otras especies de árboles, se ha encontrado que las estacas de los *Eucalyptus* sp. y de los híbridos micropropagados muestran un mayor número de raíces y, en algunos casos, producen más brotes que las fuentes adultas convencionales (Ishii *et al.*, 1999). En el caso de *E. grandis*, una sola planta en un seto donante produce desde 12 a 15 estacas con un 50 a 62 % de éxito de enraizamiento, cada tres o cuatro

semanas. Dependiendo del clon, estos valores aumentan hasta 35 estacas y a un 85 % de éxito de enraizamiento, si las estacas proceden de plantas micropropagadas. Asimismo, se han conseguido éxitos con algunos clones de híbridos como *E. grandis* x *E. nitens* (Ishii *et al.*, 1999).

La embriogénesis somática, o la producción de estructuras como embriones de células somáticas, ofrecen una serie de mejoras respecto a la micropropagación por vía de la proliferación de la yema axilar, con respecto a las especies de árboles sódico (Mann y Plummer, 2002). El beneficio más significativo de la embriogénesis somática es que resulta en unidades que contienen tanto un meristemo de raíz como de brote. Esto significa que, mientras el sistema de enraizamiento producido mediante la ruta organogénica es adventicio, los propágulos desarrollados de los embriones somáticos tienen sistemas de raíz principal. Otras ventajas son el potencial para producir grandes números de propágulos regenerados, el potencial para la inducción del reposo vegetativo y del almacenamiento a largo plazo y la posibilidad de encapsulación de embriones somáticos en cápsulas de alginato de sodio (Mann y Plummer, 2002). En este caso, por ejemplo, al silvicultor le será dada semilla sintética o artificial, un producto probablemente más fácil de manejar que los propágulos enteros.

Aunque en la literatura existan protocolos para la producción de embriones somáticos de embriones inmaduros sexualmente, se ha observado que este tipo de explante es inapropiado para una situación comercial -los embriones inmaduros están disponibles sólo en determinados periodos del año y son difíciles de quitar de la semilla- (Campbell *et al.*, 2001). Además, es importante seleccionar material de los individuos maduros, cuya respuesta a los factores ambientales es conocida, y donde los rasgos de calidad gobernados por los efectos genotípicos y ambientales han sido identificados (Campbell *et al.*, 2001). Al respecto se han emprendido investigaciones preliminares con *Pinus pátula* (Espinel *et al.*, 1999), pero en este caso los embriones fueron utilizados como los explantes.

C) Cultivo de células en suspensión. Un cultivo de células en suspensión consiste en dividir rápidamente células activas homogéneas y metabólicamente activas dispersas y que crecen en un medio de cultivo líquido. Este tipo de cultivo representa una herramienta excelente ya sea para las aplicaciones teóricas o prácticas. Las aplicaciones documentadas de cultivos de células en suspensión, con importancia para la silvicultura, incluyen su uso como recipientes para la inserción e integración de genes ajenos, almacenamiento del germoplasma y como sistemas para el aislamiento *in vitro* de líneas mutantes y la selección de fenotipos resistentes/tolerantes al estrés (Campbell *et al.*, 2001). Además, la producción a través de biorreactores a gran escala de embriones

somáticos, procedentes de los cultivos de células en medios líquidos, representa un camino potencial para la multiplicación vegetal a bajo costo (Gartland *et al.*, 2000) y un modo de superar el problema del desarrollo asíncrono de los embriones, que se encuentra cuando se utiliza un medio sólido (Barrett *et al.*, 1999). Sin embargo, comparado con las cosechas agrícolas, los cultivos de células en suspensión no han sido muy utilizados como herramienta para el mejoramiento de árboles. No obstante, este método ha sido empleado para la propagación de *Pinus strobus* y la transformación genética del tulipán (Baucher *et al.*, 1998) y la criopreservación de *Picea sitchensis* (Ishii *et al.*, 1999), entre otros. Se ha establecido y mantenido estos cultivos de células para una variedad de eucalipto puro y líneas híbridas (Byrne, 1999). Las aplicaciones actuales de las investigaciones incluyen la producción de embriones somáticos, producción de callos, fuente de material para los estudios de conservación y transformación genética.

Ingeniería genética

Con el desarrollo de sistemas eficientes para la regeneración de plantas a partir de cultivo de células, se han venido presentando avances muy significativos en los sistemas de transferencia de genes seleccionados a células vegetales y en la producción de plantas transgénicas. Los inicios de estos logros se remontan al descubrimiento de la arquitectura tridimensional del ADN por Watson y Crick en 1953, complementada 20 años más tarde por el aislamiento de las enzimas de restricción y el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante (Rivera *et al.*, 1998). La habilidad de obtener moléculas de ADN recombinante, de identificar y clonar genes, fue articulada con los trabajos pioneros de Braun en 1941 sobre la agalla de la corona causada por *Agrobacterium tumefaciens* (Ordás y Humara, 1999). Esta combinación eventualmente llevó a la utilización de este patógeno del suelo como natural para la transformación genética de plantas por parte de DeBlock y de Horsch en 1984 (Campbell *et al.*, 2001). Más recientemente, el sistema de aceleración de partículas (biolística) desarrollado por Sanford en 1988 ha mostrado ser una herramienta valiosa para la transformación genética de plantas. Estos dos métodos son los más utilizados actualmente, y dan cuenta de la mayoría de plantas transgénicas producidas, incluyendo muchas especies de cultivo importantes, en las cuales se han integrado establemente genes de importancia agronómica (Ordás y Humara, 1999).

Durante el siglo XX, los sistemas convencionales de mejoramiento han permitido incrementos importantes en productividad vegetal, lo cual ha evitado que millones de hectáreas de bosques, pastizales y áreas silvestres, que sustentan biodiversidad y ecosistemas vitales, sean convertidas en tierras de cultivo. Sin embargo, el mejoramiento de cultivos por hibridación convencional es lento y está restringido a un suministro de genes reducido,

debido a las barreras naturales para el cruzamiento entre géneros. Los avances han permitido superar estas barreras y han hecho posible la transferencia de genes seleccionados a los principales cultivos alimenticios, entre ellos cereales, papa, leguminosas, yuca, así como muchas hortalizas y frutas. El fondo común global de genes -ya sean de plantas, de animales, bacteria o virus- se han hecho accesibles para el mejoramiento vegetal. Los primeros genes integrados a especies cultivadas suministran resistencia a herbicidas, o a algunas plagas o enfermedades (Davies, 2001).

La obtención de plantas transgénicas (manipuladas por ingeniería genética) depende de la introducción (normalmente en cultivos de tejidos de ADN foráneo en su genoma) seguido de la regeneración de la planta completa y la subsiguiente expresión de los genes introducidos (transgenes). Normalmente, para que un gen pueda funcionar en la planta, hay que hacer *in vitro* una "construcción genética artificial": para ello se suele colocar delante de la parte codificadora que interesa una porción de ADN que permite esa expresión (promotores, intensificadores de la transcripción). Algunos promotores inducen la expresión en casi todos los tejidos de la planta, de forma continua (constitutiva), otros logran que el transgén se exprese sólo en determinados órganos o tejidos, o bajo el efecto inductor de alguna sustancia química (Rivera *et al.*, 1998).

El término *biotecnología* se asocia a menudo enteramente a la transformación genética, la más controvertida de todas estas tecnologías por cuanto supone la introducción de genes extraños seleccionados en el genoma de la planta. Se utilizan genes bien caracterizados de especies de otros géneros, lo que suele conducir a la manifestación de un rasgo nuevo en un contexto genético nuevo. Para introducir el gen o los genes se recurre a la «biolística» (introducción del ADN en el núcleo de la célula sobre pequeñas partículas de metal mediante técnicas de proyección a alta velocidad) o a microorganismos vectores que llevan el gen específico que interesa. Naturalmente, también es esencial la manifestación a largo plazo o suficiente del gen en la planta genéticamente modificada (GM), a lo que se ha llamado estabilidad genética (Nuez y Carrillo, 2000).

El florecimiento de la ingeniería genética vegetal se debe principalmente a dos grandes avances de la década de los 80: protocolos experimentales para la regeneración de plantas completas fértiles a partir de cultivos de células o tejidos *in vitro*; métodos para introducir el ADN exógeno, bien sea de modo directo o indirecto, seguido de su inserción en el genoma y su expresión (Sánchez, 1999).

Métodos de transformación genética

I) Biolística, pistola o cañon de micropartículas

Perlitas microscópicas de oro o tungsteno se recubren del ADN de interés, y se disparan a gran velocidad con una pistola a presión. Las células en la línea directa del proyectil pueden morir, pero a su alrededor muchas células captan el ADN sin daños. Incluso se pueden transformar cloroplastos con este sistema. Sirve para plantas que son difíciles de cultivar sus tejidos como lo son los cereales y leguminosas, aunque tiene el inconveniente de que el ADN puede insertarse en copias, y puede ser inestable (Smith y Wood, 1998).

II) Electroporación

El ADN se mezcla con protoplastos, y se aplican corrientes elevadas, lo que provoca la entrada del ADN al romperse la pared celular (Smith y Wood, 1998).

Este método ha permitido alcanzar frecuencias de transformación superiores a las obtenidas por cualquiera de los otros métodos mencionados, y adicionalmente, hizo posible la transformación estable de arroz y maíz, que no había podido lograrse previamente (Kingsman y Kingsman, 1988).

III) Cocultivo de células o tejidos con *Agrobacterium tumefaciens*

Agrobacterium tumefaciens del suelo que lleva haciendo ingeniería genética por su cuenta con las plantas desde hace millones de años. Se ha aprendido a aprovechar sus extraordinarias habilidades. La bacteria es un patógeno de plantas, que induce una malformación llamada "tumor de la agalla". El tumor es una especie de fábrica de sustancias para el sólo beneficio de *Agrobacterium*. La bacteria es atraída por sustancias que la planta excreta en sus zonas abiertas por pequeñas heridas. Por allí se introduce, quedando en los espacios intercelulares, y es entonces cuando transfiere a la célula vegetal un trozo de su material genético: una porción de un plásmido (ADN circular extracromosómico bacteriano), que se integrará en alguna zona del genoma de la planta (Smith y Wood, 1998).

Los métodos de transformación de plantas basadas en *A. tumefaciens* explotan la capacidad natural de esta bacteria fitopatógena de transferir parte de su información genética a las células vegetales que infecta, en las que es incorporada al genoma y expresada de manera estable (De Wilde, 2002).

El crecimiento desmedido (tumoral) del tejido infectado, se debe a que el microorganismo contiene un plásmido conocido como Ti (inductor de tumores), que transfiere parte de su ADN, el llamado ADN-T (ADN transferible), a las células vegetales que infecta. El ADN-T

codifica para la síntesis de reguladores de crecimiento, específicamente ácido indolacético e isopenteil adenina, cuyos niveles elevados de producción son los responsables del crecimiento anormal del tejido que tipifica a la enfermedad (Ebinuma, 1998).

Además de los reguladores de crecimiento, el ADN-T es responsable de la síntesis de compuestos nitrocarbonados, denominados opinas, que sirven como fuente de carbono y nitrógeno para las bacterias infectantes y han sido base para la clasificación de las diferentes cepas de *Agrobacterium* (Pullman *et al.*, 1998).

Diferentes estudios demostraron que existen dos tipos básicos de plásmidos Ti, los de tipo nopalina, como el PTiC58, que transfiere su T-ADN como un fragmento simple de 23 Kb, y los de tipo octopina, representados por el pTiAch5, que puede transferir segmentos compuestos de dos fragmentos de 13.2 y 7.9 Kbo un sólo T-ADN formado por alguno de los dos segmentos (Walter *et al.*, 1998).

Análisis genéticos de diferentes plásmidos Ti, demostraron la existencia de dos elementos indispensables para la transferencia o integración de ADN en el genoma vegetal de plantas infectadas; la región *vir* y las secuencias bordes de T-ADN (Davies, 2001).

La región *vir* altamente conservada en los diferentes tipos de plásmidos Ti, contiene seis genes: cuatro cuyos productos procesan el T-ADN para su transferencia (*vir* A, B, D y G), y dos para expresarse (*vir* C y E) que potencian el fenómeno. Todos ellos están regulados para expresarse únicamente en presencia de células susceptibles y son funcionales en *trans*, es decir, aún contenidos en un plásmido distinto al que porta el T-ADN (Cervera *et al.*, 1999).

Aplicación de la transformación genética con especies forestales

La mayoría de las especies arbóreas están todavía muy próximas de sus antecesores silvestres y tienen altos niveles de variación genética para la mayoría de los rasgos de interés. De ahí que, para ser valiosos, los árboles genéticamente modificados (GM) deban ostentar rasgos únicos que no puedan producirse económicamente mediante programas de mejora genética convencional, y que puedan compensar los costos y el tiempo invertidos en poner a punto la tecnología.

En los últimos años ha habido una serie de informes de expresión exitosa transitoria de genes introducidos en varios sistemas de cultivo de eucaliptos. Sin embargo, comparados con las cosechas agronómicas, importantes desde un punto de vista económico, los éxitos se han limitado a las especies forestales por lo que se refiere a la

producción de plantas obtenidas genéticamente y al aislamiento de genes funcionales y económicamente útiles, se ha emprendido un trabajo preliminar en este campo, v. gr. la transformación de las hojas de eucalipto y cultivos de células utilizando procedimientos mediante *Agrobacterium* (Ebinuma, 1998).

Se ha contemplado la modificación genética de las especies arbóreas forestales para obtener características como resistencia a los virus, resistencia a insectos, contenido de lignina y tolerancia a herbicidas. Insertar en una nueva especie los genes que rigen estas características constituye una empresa difícil; el mayor obstáculo reside actualmente en los escasos conocimientos disponibles sobre el control molecular de las características. Esto adquiere particular importancia cuando las características dependen de toda una gama de genes; tal es el caso de las que revisten mayor interés para la producción forestal, como la tasa de crecimiento, la adaptabilidad, y la calidad del tronco y de la madera. No existen informes de una producción comercial de árboles forestales modificados genéticamente, aunque, según Yamamoto (1998) se realizaron 116 ensayos de campo en 17 países que utilizaron por lo menos 24 especies arbóreas, dentro de las cuales destacan, Acacia, Eucalipto, Olmo, Teca, Abedul y Pinos. Se reconoce que es necesario considerar atentamente los aspectos relacionados con la bioseguridad de los árboles modificados genéticamente, sobre todo, a causa del tiempo prolongado que tardan los árboles en crecer y de la posibilidad de que su polen y semillas se dispersen a través de grandes distancias.

Los rasgos que hasta ahora se han tomado en consideración para la modificación genética potencial de diversas especies de árboles son; resistencia a herbicidas, floración reducida o esterilidad, resistencia a insectos y química de la madera. Si bien los programas convencionales de mejora genética han prestado atención a la resistencia a insectos y la calidad de la madera (pero no a muchos de los aspectos específicos de la química de la madera), probablemente tendrán poca capacidad para incorporar rasgos como resistencia a herbicidas o floración reducida.

Resistencia a herbicidas. La resistencia a herbicidas en los álamos es probablemente la tecnología mejor desarrollada de modificación genética en árboles forestales. La primera preocupación respecto a las plantas GM resistentes a herbicidas es el hecho de que se desarrolla la resistencia en la propia cizaña. El riesgo puede ser bastante menor en la silvicultura que en la agricultura, ya que los herbicidas se aplican sólo por corto tiempo y menos veces durante el período inicial de la plantación. Además, en las plantaciones forestales no es necesario eliminar por completo las malas hierbas, de manera que hay menos presión selectiva en favor de la resistencia en las malas hierbas (Nuez y Carrillo, 2000).

La introducción de la resistencia a herbicidas es probablemente la modificación genética más factible y más aplicada en los árboles. Sin embargo, sólo es adecuada para pocas especies bien desarrolladas en ciertas situaciones, tales como plantaciones intensivas de álamos en las que los herbicidas son a veces un instrumento de gestión aprobado.

Floración reducida o esterilidad. La floración reducida en árboles forestales puede ser deseable para dirigir los productos de la fotosíntesis hacia la producción de madera y no hacia tejidos reproductivos. No obstante, como esta reasignación de recursos no está bien cuantificada en este punto, la principal justificación para promover la floración reducida o la esterilidad es reducir sustancialmente el caudal genético a poblaciones silvestres adyacentes de la misma especie. Así se puede promover una mayor aceptación de plantaciones intensivas de árboles GM contiguas a bosques naturales. Aunque se están haciendo importantes investigaciones sobre mecanismos de floración, la estabilidad en el tiempo del gen de esterilidad tendrá que confirmarse en pruebas sobre el terreno durante el tiempo de rotación previsto (Davies, 2001).

Resistencia a insectos. Es ya común el desarrollo de cultivos genéticamente modificados con resistencia a los insectos, pero tales cultivos dan lugar también a algunas de las situaciones ecológicas de más complejo tratamiento. La primera pregunta inquietante es la posible toxicidad de los compuestos producidos en plantas GM resistentes a los insectos cuando se cultivan específicamente para consumo humano o para animales como parte de cadenas alimentarias. En segundo lugar, los ecologistas se preocupan por el cruce con parientes silvestres y por la evolución de la resistencia en las propias plagas, como respecto a la resistencia a herbicidas. Un grave problema adicional en la silvicultura es que el largo tiempo de crecimiento de los árboles da a muchas generaciones de poblaciones de insectos la posibilidad de desafiar el mecanismo de resistencia (Nuez y Carrillo, 2000).

El método de modificación genética más desarrollado para la resistencia a insectos en la silvicultura, como en la agricultura, ha sido el uso de genes de un agente patógeno natural transmitido por *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Los álamos están de nuevo entre las especies arbóreas con las que más ha avanzado la tecnología. Está en marcha la investigación y el desarrollo de otros compuestos para no tener que depender del grupo relativamente reducido de toxinas naturales *Bt*. Dadas las complejas implicaciones ecológicas y las preocupaciones públicas en torno a las plantas GM resistentes a insectos, serán precisas muchas pruebas de laboratorio y de campo con una buena base científica.

Química de la madera. Ya es técnicamente posible alterar genéticamente la química de la lignina en los árboles

para fabricar pasta con más facilidad y de manera más ecológica. Se han modificado genes importantes en el proceso de formación de la lignina en la madera para producir una composición única de la madera en árboles muy jóvenes. Sin embargo, se han encontrado también genes de efectos relativamente más amplios sobre la química de la madera (p.ej. un importante gen recesivo en el pino taeda), de modo que las propiedades de la madera pueden modificarse también por selección y mejora genética convencionales. Hay que tener en cuenta muchas de las mismas consideraciones ecológicas y económicas, con o sin tecnología de transformación genética (Ordás y Humara, 1999). Dos cuestiones importantes que subsisten para el desarrollo de variedades o clones con lignina modificada son el valor económico que tendrían las plantaciones de esos árboles y la posibilidad de que la madera alterada sea vulnerable a las presiones medioambientales. Si la respuesta a la última cuestión fuera afirmativa, es probable de nuevo que hubiera que incorporar genes de floración reducida o esterilidad al material utilizado en gran escala cuando sea importante minimizar el flujo de genes hacia las poblaciones silvestres contiguas (por ejemplo, zonas de conservación *in situ*) (Ordás y Humara, 1999).

Marcadores moleculares

La utilización de marcadores moleculares implica la identificación, mediante técnicas bioquímicas muy perfeccionadas, de la variación de moléculas celulares como el ADN y las proteínas. Contrariamente a las características fenotípicas de los individuos en estudio, como el vigor, la calidad del tronco y diversos aspectos morfológicos, los marcadores moleculares ofrecen la ventaja de que no cambian por efecto del medio ambiente, ni por la fase de desarrollo de la planta, y además son muy numerosos. Estos atributos han hecho posible la aplicación de los marcadores moleculares al mejoramiento genético de los árboles (Rivera, *et al.*, 1998).

A últimas fechas se han ido aplicando al ámbito forestal diferentes marcadores que revelan polimorfismos en la secuencia de bases del ADN, permitiendo por tanto abordar la variación a nivel del genoma. A continuación se describen algunas de sus aplicaciones relacionadas con la conservación de recursos genéticos:

Las técnicas de huellas digitales. Por sus atributos inherentes, los marcadores moleculares son mucho más precisos que los rasgos morfológicos que ayudan a establecer la identidad de un determinado árbol o para analizar su interacción genética con otros árboles. Los marcadores moleculares tienen aplicaciones importantes en la investigación relacionada con los programas avanzados de mejoramiento de especies industriales, especialmente en lo que se refiere al control de la calidad. Se usan para la comprobación de la identificación clonal,

la contaminación de los huertos por individuos no deseables y las modalidades de entrecruzamiento. También tienen una aplicación inmediata en la investigación complementaria sobre especies latifoliadas tropicales y especies no industriales, y en estudios taxonómicos e investigaciones sobre sistemas de reproducción (Smith y Wood, 1998).

La biotecnología ofrece para la caracterización de especies forestales dos tipos de marcadores fundamentales: Polimorfismo del ADN amplificado al azar (RAPDs) y Amplificación de fragmentos de ADN de longitud polimórfica (AFLPs). Los RAPDs se han usado para caracterizar clones, en especies de los géneros *Populus* y *Salix* (Frewer, 2000). De igual manera, se han determinado marcadores RAPD para la distinción de clones de diversas especies de *Populus*, así como para identificar a diferentes árboles de *Populus tremula* procedentes de distintas localidades (Sánchez *et al.*, 1999). Como ejemplos de la utilización de marcadores AFLPs se pueden citar la caracterización de especies, variedades y cultivares de *Castanea* (Yamamoto *et al.*, 1998), y la caracterización de clones y determinación de la variabilidad en *Salix* (Barker *et al.*, 1999). Usando estos últimos marcadores se han caracterizado catorce clones de *Populus*, con los AFLPs revelados no se ha podido encontrar diferencias entre los clones I-214 y Campeador, sugiriendo los autores que podría tratarse del mismo genotipo (Agúndez *et al.*, 1999).

Ambos tipos de marcadores se basan en la PCR (reacción en cadena de la polimerasa) (Pullman *et al.*, 1998); los RAPDs pueden usarse en la identificación positiva de los clones, la construcción de mapas genómicos (Cervera *et al.*, 1999) y estudios sobre valoración de importantes rasgos cuantitativos en los clones de interés, entre otros. Algunos científicos (De Wilde, 2002) han ya establecido que los perfiles de RAPD son idóneos para estas técnicas aplicadas, como diferenciación entre los clones y verificación de los genotipos de *Eucalyptus* y *Pinus*. Esta es la aplicación más inmediata de la técnica en los programas de mejora y de selección de genotipos superiores.

En el mejoramiento y selección de los genotipos, los errores de muestreo y etiquetado son difíciles de detectar mediante una inspección visual de los árboles. Por lo que los marcadores isoenzimáticos pueden ser utilizados para detectar estos errores. Se sabe que dichos marcadores son afectados por las condiciones ambientales y las diferentes etapas de desarrollo de la planta y no siempre prevén la distinción entre los genotipos. Por el contrario, los marcadores basados en el ADN superan estas desventajas y toman en consideración la diferenciación, o la dactiloscopia, de los genotipos individuales (Sánchez *et al.*, 1999).

Un aspecto particular de la caracterización de clones

es la utilización de marcadores para la detección precoz de variación somaclonal. La variación somaclonal puede aparecer cuando se utilizan técnicas de cultivo *in vitro* como medio de propagación vegetativa, sobre todo cuando se siguen vías adventicias a través de callos (Cervera *et al.*, 1999). Para revelar la posible incidencia de esta variación a nivel genético se han usado tanto marcadores tipo RAPD, en *Picea abies* y *Quercus suber* (Jiménez, 1999a), como tipo AFLP en *Carya illinoensis* (Vendrame *et al.*, 1999) y en *Quercus suber* (Hornero *et al.*, 2000). Otro proceso que precisa de la evaluación de la estabilidad genética es la criopreservación. A este respecto se han detectado variaciones en el patrón de marcadores RAPD en material criopreservado de *Picea glauca*, posiblemente generadas durante la preparación para la congelación o durante el proceso de descongelación (DeVerno *et al.*, 1999).

La Cuantificación de la variación genética. Los marcadores moleculares son útiles para identificar caracteres genéticos tales como el vigor y la forma del fuste, ya que la variación causada por el ambiente puede, con frecuencia, inducir a errores de selección (es decir, no está claro si tales caracteres se deben a causas genéticas o a factores ambientales). Se han utilizado marcadores para comparar la variación dentro de una población y entre poblaciones de diversas especies de árboles. La cuantificación de la variabilidad genética, como apoyo a las estrategias de muestreo para promover la conservación genética y mejorar las poblaciones de nuevas especies industriales y no industriales, es una aplicación potencialmente útil de los marcadores moleculares. Sin embargo, éstos pueden dar lugar a una subestimación de la variación genética en lo que respecta a caracteres (como el vigor y la calidad del fuste) más expuestos a la presión evolutiva, por lo que será preciso utilizarlos con precaución (Daniell, 2002).

Selección con ayuda de marcadores moleculares. Esta técnica consiste en una selección indirecta, basada en marcadores evidentemente asociados con caracteres genéticos importantes desde el punto de vista comercial. No siendo influidos por el medio ambiente y la fase de desarrollo, los marcadores moleculares ofrecen la posibilidad de realizar una selección temprana y eficaz (por ejemplo, la selección de individuos en calidad de madera en la fase de plántula), que es desde hace tiempo la esperanza de los silvicultores. Aunque estas posibilidades resultan muy atractivas, existen limitaciones que impedirán la aplicación a corto o mediano plazo. En primer lugar, el análisis de los marcadores es, en la actualidad, demasiado caro para que se puedan seleccionar grandes cantidades de plántulas. En segundo lugar, las asociaciones entre marcadores y rasgos económicamente importantes deben establecerse por separado para cada familia. Por consiguiente, incluso cuando se dispone de marcadores más baratos, la selección con ayuda de marcadores se utiliza sobre todo en programas de mejoramiento

avanzados y complejos, es decir, programas en los que no existan problemas financieros para costear la creación y mantenimiento de estructuras genealógicas apropiadas y la aplicación de técnicas de clonación a la silvicultura. En lo que respecta a la mayoría de las especies, es preferible utilizar los recursos disponibles para conseguir que los programas de reproducción alcancen la fase avanzada anteriormente mencionada, en lugar de destinarlos al fomento de la selección con ayuda de marcadores moleculares (Cervera *et al.*, 1999).

Los marcadores moleculares tienen, en la actualidad, un valor considerable en la investigación estratégica a largo plazo: los estudios sobre estos marcadores están contribuyendo considerablemente a aumentar el conocimiento sobre los mecanismos genéticos y su organización genómica a nivel molecular. En lo que respecta a las especies arbóreas forestales, el estudio de los caracteres cuantitativos será en el futuro el centro de esas actividades, las cuales deberán concentrarse en unas pocas especies prototípicas, como podría ser el caso del pino de incienso (*Pinus taeda*) (Park *et al.*, 1998; Espinel, 1999).

Determinación de la magnitud y localización de la variabilidad. En este ámbito se han publicado un gran número de trabajos, uniéndose a los marcadores bioquímicos clásicos, fundamentalmente isoenzimas, los marcadores de ADN tales como el polimorfismo del largo de los fragmentos de restricción (RFLPs), RAPDs y secuencias simples repetidas (SSRs). Utilizando isoenzimas se han realizado estudios sobre la variabilidad de diferentes especies ibéricas tales como *Quercus suber* (Barreneche *et al.*, 1998; Jiménez *et al.*, 1999a) y *Pinus pinaster* (González *et al.*, 1999b). Este último trabajo incluye la comparación entre la variación detectada mediante los marcadores y la observada para caracteres como supervivencia, forma del tronco y crecimiento en ensayos de procedencias, mostrando gran divergencia.

Mediante RAPDs se han estudiado las relaciones genéticas de la población de *Pinus radiata* del País Vasco con las de California, así como su variabilidad; se ha determinado que la población local descende probablemente de la californiana, observándose una coherencia en los resultados entre rendimiento en el campo, características fisiológicas y análisis de marcadores (Espinel *et al.*, 1999). Usando también este tipo de marcadores se ha determinado la diversidad genética en nueve poblaciones de *Pinus halepensis*, y se ha construido un mapa de ligamiento para la especie que será la base para la determinación de QTLs (Gómez *et al.*, 1999a). Utilizando microsatélites (SSRs) se ha estudiado la diversidad genética dentro y entre rodales semilleros de *Quercus robur* y *Quercus petraea*, lo que permitirá un mejor conocimiento y control del material para reproducción (Olalde *et al.*, 1999). También mediante el análisis de

microsatélites de cloroplasto, de individuos procedentes de seis poblaciones de *Pinus halepensis*, se ha estudiado la distribución de la variabilidad de la especie en España, detectándose hasta nueve haplotipos, lo que ha permitido postular la historia de dichas poblaciones (Gómez *et al.*, 1999b).

Otros marcadores de ADN como los de tipo AFLP se han empleado también con el propósito de caracterizar la variabilidad. Así, por ejemplo, en *Moringa oleifera*, un árbol con múltiples aplicaciones introducido en África desde la India a principios de siglo, estos marcadores han revelado diferencias muy significativas entre regiones de procedencia y poblaciones (Muluvi *et al.*, 1999). La reconstrucción de bosques en Europa central con especies autóctonas, pero utilizando progenies de individuos seleccionados, plantea el problema de establecer la máxima variabilidad con fines de conservación. A estos efectos se han utilizado marcadores tipo RAPD y AFLP para evaluar la variabilidad en árboles seleccionados de *Quercus petraea* (Barreneche *et al.*, 1998).

Estudios filogenéticos. El análisis de ADN de cloroplastos, mediante marcadores tipo AFLP, después de amplificaciones con la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), está sirviendo para establecer las relaciones filogenéticas y filogeográficas en las especies del género *Quercus* (Manos *et al.*, 1999). Los robles blancos en España se están estudiado aplicando esta metodología, habiéndose encontrado 14 haplotipos pertenecientes a cuatro linajes maternos, y que *Quercus faginea* es la especie que muestra mayor diversidad (Herrán *et al.*, 1999). En *Quercus suber* se han estudiado 33 poblaciones, encontrándose introgresión de *Quercus ilex* (Jiménez *et al.*, 1999b). El análisis de PCR-RFLPs de cloroplasto también se ha aplicado a especies de otros géneros, como es el caso del género *Pistacia*, mostrando que es un género de lenta evolución (Badenes y Parfitt, 1998).

Marcadores RFLP nucleares se han utilizado asimismo para determinar la filogenia en diversas especies y subespecies de *Eucalyptus* en Australia, sugiriendo los resultados que se trata de una única especie muy variable y ampliamente distribuida (Byrne, 1999).

Desarrollo sustentable. El desarrollo sustentable de los bosques es una estrategia atractiva, ya que trata de combinar la conservación de la biodiversidad y variabilidad con intereses económicos y fines sociales. La gestión de las poblaciones naturales de una especie presuponen el mantenimiento del dinamismo demográfico y de su estructura genética, así como de las interacciones con otras especies del ecosistema. Para ello, los estudios que versen sobre la autoecología de la especie son muy necesarios, especialmente los que tratan aspectos de la dinámica demográfica y del movimiento de alelos. La caracterización de los niveles de variabilidad y de la estructura genética,

así como el conocimiento de la dinámica del movimiento de alelos, proporciona las bases necesarias para la consecución de estrategias que tratan de maximizar el aprovechamiento, al tiempo que se controla el proceso para hacerlo sostenible. Por ello resultan imprescindibles las estimaciones de índices de diversidad, grado de heterocigosidad, número de alelos por locus, etc. Marcadores tipo isoenzimas, RAPDs y microsatélites (SSRs) proporcionan una ayuda fundamental (Rajora, 1999).

Otro aspecto de interés en la gestión sostenible es la comparación de parámetros genéticos, utilizando marcadores apropiados, entre poblaciones naturales y bosques de aprovechamiento, a fin de identificar cambios genéticos potencialmente deletéreos que pudieran ocurrir como consecuencia de la gestión forestal. Un ejemplo de estudios de este tipo es el llevado a cabo con *Pinus caribea* utilizando isoenzimas y RFLPs de cloroplastos, en el que demostraron niveles similares de variabilidad, pero mayores niveles de consanguinidad en explotaciones comparándolas con masas naturales (Zheng y Ennos, 1999).

Conservación de especies o poblaciones amenazadas. En los últimos años, la protección de la diversidad genética se ha establecido como un objetivo prioritario en los planes de conservación mundial. Se trata, a largo plazo, de mantener la viabilidad evolutiva de las especies y para ello maximizar las posibilidades de supervivencia en un entorno cambiante. Por ello son de gran interés los estudios que evalúan poblaciones naturales para detectar variantes genéticas únicos y/o centros de variabilidad genética para conservar especies amenazadas, diseñando actividades de conservación *in situ* y *ex situ*, y para proteger la integridad de reservas genéticas nativas. En este último caso, se deben establecer reservas naturales que pudieran tener variantes genéticas únicas como consecuencia de un flujo de genes reducido (aislamiento), pequeños tamaños de población y regímenes particulares de selección natural que ocasionará una diferenciación de otras poblaciones. Tal es el caso de *Caesalpinia echinata*, una especie sobreexplotada en Brasil, que se considera amenazada en la costa atlántica; el estudio de pequeñas poblaciones naturales mediante RAPDs ha permitido determinar claras correlaciones entre distancias genéticas y geográficas, identificando áreas de diversidad necesarias para diseñar planes de conservación (Cardoso *et al.*, 1998).

Evaluación de la dispersión de polen y semillas. Los marcadores de ADN se están utilizando en estudios sobre la dispersión de polen y semillas. Esta característica, tiene relaciones con las progenies, tiene una fuerte influencia sobre la estructura genética de las especies. Con este fin se han desarrollado marcadores SSR en especies tales como *Camellia japonica* (Ueno *et al.*, 1999). En la

especie *Calycophyllum spruceanum* se han revelado marcadores AFLP para estudiar el reparto de la variación dentro y entre poblaciones mediante análisis de la varianza molecular (AMOVA), tratando de encontrar una estructuración ligada a distancias geográficas y determinada por la dispersión de polen y semillas (Russell *et al.*, 1999).

PERSPECTIVA DE LA APLICACIÓN DE LA BIOTECNOLOGÍA FORESTAL

Los beneficios potenciales de la biotecnología son aún mayores en la silvicultura que en la agricultura, ya que en algunos casos existe la posibilidad de ganar tiempo en los procesos de mejoramiento de especies arbóreas. Los problemas de producción o de rendimiento, ya sea de madera o de otros productos, con que tropiezan los silvicultores no son menos urgentes que los que enfrentan los agricultores.

Prioridades del mejoramiento de árboles

El objetivo general de un programa de mejoramiento genético debe ser el manejo sostenible de la variación genética con el fin de producir, identificar y multiplicar genotipos bien adaptados de la calidad deseada para su plantación. Esta ordenación suele incluir los elementos siguientes:

- Establecimiento de poblaciones iniciales, incluidos ensayos de procedencias y especies, y el fomento de poblaciones destinadas al mejoramiento y a la conservación de genes;
- Mejoramiento de las poblaciones, que con frecuencia implica ciclos periódicos de selección y de combinación de especies;
- Derivación y multiplicación de individuos superiores que se utilizarán en la práctica.

En principio, cuanto antecede puede aplicarse tanto a las especies industriales (es decir, especies maderables bien conocidas y manejadas en gran escala) como a las no industriales, pero en práctica existen ciertas diferencias. Recientemente se han examinado la situación actual del mejoramiento de árboles y las tendencias de la investigación (Kanowski, 1997). Se han realizado importantes avances genéticos en programas de mejoramiento de especies industriales establecidas, y la intensificación de los esfuerzos en este ámbito dará resultados notables. Los principales límites a un mejoramiento rápido de la mayoría de las especies forestales establecidas son (Barrett *et al.*, 1999):

- El largo intervalo generacional, asociado con la baja

correlación entre formas juveniles adultas (es decir, que las características de los árboles jóvenes no son necesariamente indicadores precisos de las características de los adultos) y la prolongada fase juvenil con respecto a la fase de floración;

- la reducida eficacia de la selección en lo que respecta a muchos caracteres, debido a la baja heredabilidad o a la dificultad para realizar una evaluación;
- el hecho de que sólo se explote una parte de la variación genética disponible debido a la utilización de huertos de polinización libre.

Las principales prioridades de la investigación sobre especies forestales industriales establecidas deberían ser el ulterior perfeccionamiento de métodos para la propagación de familias de hermanos completos (es decir ejemplares procedentes de una sola pareja macho-hembra conocido) o clones, la disponibilidad de métodos de selección temprana y más precisa y el estímulo de la floración precoz. A fin de utilizar una mayor variedad de condiciones ecológicas y suministrar productos que normalmente se obtienen mediante la explotación de bosques naturales, es probable que en una parte considerable de las nuevas plantaciones se introduzcan especies tropicales que actualmente no son explotadas en gran escala. Algunas de estas especies pueden ser objeto de mejoramiento, mientras que otras presentan problemas de floración y producción de semillas, y son posiblemente susceptibles a insectos y enfermedades. La distribución y los usos potenciales de muchas especies no se conocen bien, y es probable que sus acervos génicos estén amenazados. La implementación de programas de mejoramiento genético será una prioridad importante para estas especies. La experimentación con especies potencialmente útiles, la descripción de sistemas de reproducción, los estudios de procedencias, el establecimiento de ensayos en diferentes ambientes, la aplicación de medidas de conservación de la diversidad genética y el inicio de otras actividades del mejoramiento genético plantean importantes trabajos a desarrollar.

Algunos taxones no industriales son sumamente heterogéneos y presentan una floración temprana y prolífica que favorece un rápido mejoramiento por medios tradicionales. Sin embargo, las características fenotípicas de muchas especies no industriales, potencialmente valiosas, siguen siendo en gran medida desconocidas. Ciertos acervos génicos están amenazados. Aunque se ha llevado a cabo una labor de selección en algunos programas, la mayor parte de las especies no industriales están aún en una fase de evaluación y experimentación. El mejoramiento genético de las especies no industriales es similar al de las especies industriales y algunas de sus limitaciones son similares, especies particulares presentan dificultades debido a los siguientes factores:

- La necesidad de establecer plantaciones en una gran diversidad de ambientes, muchos de los cuales son marginales o de difícil acceso;
- La diversidad de los criterios de selección (por ejemplo, calidad de la leña o de la producción de la biomasa [velocidad de crecimiento]);
- La variabilidad de los criterios de selección entre los diversos genotipos;
- El reducido valor de los productos forestales en algunos sistemas; y
- La dificultad de transferir los resultados de la investigación en mejoramiento genético a plantaciones bajo condiciones reales, como en los lugares donde los productores tienen un fuerte incentivo económico para producir su propio material de plantación.

La labor que implica la selección de las especies más promisorias es ardua y, por las razones antes citadas, puede que sea difícil justificar una mejora, en el caso de muchos árboles no industriales, más allá de la experimentación de especies y procedencias. Los objetivos prioritarios del mejoramiento de especies no industriales serán probablemente los estudios taxonómicos de la variación; los ensayos de especies y procedencias; la evaluación de las características reproductivas; y las actividades relacionadas con la conservación de la variabilidad genética.

PRIORIDADES DE LA INVESTIGACION EN BIOTECNOLOGÍA FORESTAL EN MÉXICO

Investigación complementaria

El análisis anterior permite indicar que las posibles aplicaciones a corto plazo de la biotecnología como apoyo a la silvicultura son las siguientes:

- Utilización de marcadores moleculares con fines de control de calidad en programas avanzados de reproducción para especies industriales establecidas. Por ejemplo, para comprobar la caracterización de los clones, la contaminación de los huertos y las ganancias de reproducción entre individuos mediante la técnica de la huella digital;
- Utilización de marcadores para estudios e investigaciones taxonómicas;
- Utilización de marcadores para cuantificar la variación genética como ayuda en la formulación de estrategias de muestreo relacionadas con la conservación de genes y el establecimiento de colecciones de poblaciones destinadas a programas de mejoramiento de «nuevas» especies industriales y no industriales.

Investigación estratégica

Las prioridades de la investigación estratégica en biotecnología para el mejoramiento de árboles pueden clasificarse en tres grandes grupos según (DiFazio *et al.*, 1999):

Investigación genérica a largo plazo. Esta investigación es más eficaz cuando se realiza con un pequeño número de especies prototípicas, para evitar la duplicación de recursos y esfuerzos. Es preciso conceder una alta prioridad a los objetivos siguientes:

- Ingeniería genética para determinar la esterilidad, en la que se basarán muchas de las aplicaciones finales;
- Utilización de marcadores moleculares y técnicas de transformación del ADN para investigar procesos genéticos a nivel molecular, en particular, los relacionados con rasgos complejos como el crecimiento, la adaptación y la calidad del tronco y la madera. Esta labor es importante sobre todo para las especies de árboles industriales, pero también facilita la aplicación de la biotecnología a especies arbóreas no industriales;
- Estudios moleculares del estado de maduración de especies industriales de plantación.

Investigación específica a largo plazo. Las dos áreas prioritarias son las siguientes:

- Ingeniería genética para caracteres útiles, incluida la reducción de la lignina en especies destinadas a la obtención de pasta para papel; tolerancia al frío, especialmente en eucaliptos; y resistencia a insectos, por ejemplo en álamos y tal vez meliáceas (cuando existan programas adecuados de reproducción). La transformación con genes apropiados (introducción de varios genes en el caso de la resistencia a insectos) podrá conseguirse a corto o mediano plazo (digamos en un plazo de cinco a diez años), pero será necesario tal vez un período de diez años de experimentación de campo antes de que se pueda recomendar su distribución comercial;
- Selección de especies con ayuda de marcadores respecto de las cuales existan programas avanzados de reproducción y sea posible costear la creación y mantenimiento de estructuras de población apropiadas. Probablemente habrán de transcurrir diez años antes de que esta técnica se pueda poner en práctica.

Investigación a corto y mediano plazo. Se deberá prestar atención a las áreas siguientes:

- Estudio de las correlaciones genéticas entre la capacidad regenerativa y los rasgos importantes desde el punto de vista comercial (alta prioridad);

- Desarrollo de métodos de crioconservación como medio para mantener la fase juvenil en programas avanzados de reproducción de especies industriales (alta prioridad);
- Apoyo a la crioconservación como método complementario para la conservación de especies que cuenten con programas de mejoramiento y que se haya demostrado que las semillas son difíciles de almacenar (prioridad moderada);
- Elaboración de técnicas sencillas de micropropagación de especies para las cuales no estén todavía disponibles dichas técnicas (prioridad de baja a moderada).

CONCLUSIONES

El bosquejo presentado trata de mostrar el potencial de las técnicas biotecnológicas en especies forestales. Estas herramientas biotecnológicas aplicadas en especies forestales deben ser fundamentales para los nuevos programas de mejoramiento genético en México.

En la actualidad la Biotecnología en México es un área poco desarrollada. Los recursos económicos son escasos y difícilmente podrá haber un avance que represente la debida aplicación de esta ciencia los recursos genéticos de México

Parece evidente que los avances en mejoramiento genético de especies forestales, necesarios para satisfacer la demanda de productos maderables y no maderables en nuestro país, sólo será posibles gracias a la incorporación de técnicas biotecnológicas y de los avances proporcionados por la investigación genómica.

Es importante y de manera prioritaria la aplicación de estas herramientas en el sector forestal de México como una estrategia para el manejo sostenible de sus recursos forestales.

LITERATURA CITADA

- AGÚNDEZ, D.; CERVERA, M. T.; ALBA, N.; MARTÍNEZ, J. M.; GRAU, J. M. 1999. Genetic identification of commercial clones of *Populus* based on isozymes and AFLPs. In: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 549-552.
- BADENES, M. L.; PARFITT, D. E. 1998. Phylogeny of the genus *Pistacia* as determined from analysis of the chloroplast genome. NUCIS-Newsletter 7: 25-26.
- BALLESTER, A.; VIDAL, N.; FERNÁNDEZ, J. L.; VIEITEZ, A. M. 1999. Anatomical and biochemical events during the rooting *in vitro* of microcuttings from juvenile and mature phases of chestnut. Annals of Botany 83: 619-629.
- BARKER J., H. A.; MATTHES, M.; ARNOLD G., M.; EDWARDS K., J.; AHMAN, I.; LARSSON, S.; KARPA, A. 1999. Characterisation of genetic diversity in potential biomass willows (*Salix* spp.) by RAPD and AFLP analyses. Genome 42: 173-183.
- BARRENECHE, T.; BODENES, C.; LEXER, C.; TRONTIN J., F.; FLUCH, S. 1998. A genetic linkage map of *Quercus robur* L. (pedunculate oak) based on RAPD, SCAR, microsatellite, minisatellite, isozyme and 5S rDNA markers. Theor. Appl. Genet. 97:1090-1103.
- BARRETT, C.; ROCHE, T.; DEAN, C.; WILLIAMS G., A.; DOYLE, O. 1999. Impact and awareness of biotechnology in academic and commercial sectors. Horticulture and Landscape: 9-19.
- BAUCHER, M., MONTIES, B.; VAN MONTAGU, M.; BOERJAN, W. 1998. Biosynthesis and genetic engineering of lignin. Critical Reviews Plant Science 17: 125-197.
- BEARDMORE, T.; VONG, W. 1998. Role of the cotyledonary tissue in improving low and ultralow temperature tolerance of butternut (*Juglans cinerea*) embryonic axes. Canadian Journal of Forest Research 28: 903-910.
- BERJAK, P. 1999. Strategies for *in vitro* conservation of hydrated. En *In vitro* conservation of plant growth genetic resources. De. M.N. Normah, IPGRI. 5-10 p.
- BURDON R., D. 1994. The role of biotechnology in forest tree breeding. Forest Genetic Resources 22: 2-5.
- BURDON R., D. 1999. Risk-management issues for genetically engineered forest trees. New Zealand Journal of Forest Research, 29: 375-390.
- BURKE W., S. 2001. Responding to new trees and to the issues at hand: the Institute of Forest Biotechnology. Proc 1st Int'l Symp on Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations, Oregon State University, 62-69.
- BYRNE, M. 1999. High genetic identities between three oil mallee taxa, *Eucalyptus kochii* ssp. *kochii*, ssp. *Plenissima* and *E. horistes*, based on nuclear RFLP analysis. Heredity 82: 205-211.
- CACCAVALE, A.; LAMBARDI, M.; FABBRI, A.; SCANNERINI, S.; BAKER, A.; CHARLWOOD B., V.; DAMIANO, C.; FRANZ, C.; GIANINIZZI, S. 1998. Cryopreservation of woody plants by axillary bud vitrification: a first approach with poplar. Acta Horticulturae 457: 79-83.
- CAMPBELL F., T.; ASANTE O., R. 2001. GE trees: proceed only with caution. Proc 1st Int'l Symp on Ecological and Societal Aspects of Transgenic Plantations, Oregon State University, 158-167.
- CARDOSO M., A.; PROVAN, J.; POWELL, W.; FERREIRA P., C. G.; OLIVEIRA D., E. 1998. High genetic differentiation among remnant populations of the endangered *Caesalpinia echinata* Lam. (Leguminosae Caesalpinioideae). Molecular Ecology 7: 601-608.
- CARRON M., P.; LARDET, L.; DEA B., G. 1998. *Hevea* micropropagation by somatic embryogenesis. Plantations, Recherche, Developpement 5: 187-192.
- CELESTINO, C.; FERNÁNDEZ, B.; HERNÁNDEZ, I., MOLINAS, M.; PUIGDERRAJOLS, P.; MARTÍNEZ, I., HORNERO, J.; GALLEGO F., J.; MANJÓN J., L.; DíEZ, J.; TORIBIO, M. 1999. Somatic embryogenesis in cork oak (*Quercus suber* L.). En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 195-197.
- CERVERA M., T.; PLOMION, L.; MALPICA, C. 1999. Molecular markers and enzyme mapping in woody plants. Molecular Biology of Woody Plant, vol. 1: 375-394
- CUENCA, B.; JOSÉ M., C.; MARTÍNEZ M., T.; BALLESTER, A.; VIEITEZ A., M. 1999. Somatic embryogenesis from stem and leaf explants of *Quercus robur* L. Plant Cell Reports 18: 538-543.

- DALE P., J.; CLARKE, B., FONTES M., G. 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20: 567-572.
- DANIELL, H. 2002. Molecular strategies for gene contained in transgenic crops. *Nature Biotechnology* 20: 581-586.
- DAVIES K., G. 2001. What makes genetically modified organism4s so distasteful? *Trends in Biotechnology* 19:424-427.
- DE VERNO L., L.; PARK Y., S.; BONGA J., M.; BARRETT J., D. 1999. Somaclonal variation in cryopreserved embryogenic clones of white spruce (*Picea glauca* (Moench) Voss.). *Plant Cell Reports* 18: 948-953.
- DE WILDE, R. 2002. Regulatory issues of GMOs: the sociology and science of GMOs. Amsterdam Maastricht Summer University Digital Reader 1-14.
- DESHPANDE S., R.; JOSEKUTTY P., C.; ASENAN, G. 1998. Plant regeneration from axillary buds of a mature tree of *Ficus religiosa*. *Plant Cell Reports* 17: 571-573.
- DIEZ, J.; GIL, L. 1999. Culturing of elm cell tissues within the Spanish breeding programme against Dutchelm disease. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 307-311.
- DIFAZIO S., P.; LEONARDI, S.; CHENG, S.; STRAUSS S., H. 1999. Assessing potential risks of transgene escape from fiber plantations. *Gene Flow and Agriculture: Relevance for Transgenic Crops*, 72: 171- 176.
- DONNAN, A. 1996. Determining and minimizing production cost of plant propagation by *in vitro* culture. *Hort Science*. 14: 34-45.
- EBINUMA, H. 1998. Development of a [Genetic] Transformation System for Woods. *Japan Tappi Journal* 52 (1): 72-76
- ENDEMANN, M.; WILHELM, E. 1999. Factors influencing the induction and viability of somatic embryos of *Quercus robur*L. *Biologia Plantarum* 42: 499-504.
- ESPINEL, S.; ARAGONÉS, A.; RITTER, E. 1999. Application of RAPD markers to analyse genetic relationships and variability of *Pinus radiata* populations. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 107-114.
- FILONOVA L., H.; BOZHKO V., V.; ARNOLD S., V. 2000. Developmental pathway of somatic embryogenesis in *Picea abies* as revealed by time-lapse tracking. *Journal of Experimental Botany* 51: 249-264.
- FRAMPTON L., J.; AMERSON H., V.; LEACH G., N. 1998. Tissue culture method affects *ex vitro* growth and development of loblolly pine. *New Forests* 16: 125-138.
- FREWEN B., H.; CHEN G., H. 2000. Quantitative trait loci and candidate gene mapping of bud set and bud flush in populus. *Genetics* 154:837-845
- GARTLAND J., S.; MCHUGH A., T.; BRASIER C., M.; IRVINE R., J.; FENNING T., M.; GARTLAND K., M. A. 2000. Regeneration of phenotypically normal English elm (*Ulmus procera*) plantlets following transformation with an *Agrobacterium tumefaciens* binary vector. *Tree Physiology* 20:901-907.
- GÓMEZ, A.; ARAVANOPOULUS P., A.; ALÍA, R.; BUENO M., A. 1999a. *Pinus halepensis* RAPD markers: Linkage and genetic diversity. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 143-146.
- GÓMEZ, A.; BUENO M., A.; ALÍA, R.; VENDRAMIN G., G. 1999b. Aleppo pine populations history in Spain revealed by cpSSRs. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 137-140.
- GONZÁLEZ M., E.; HERRADON, E.; MARTÍN, C. 1999a. The development of a protocol for the encapsulation desiccation and *in vitro* culture of embryonic axes of *Quercus suber* L. and *Q. ilex* L. *Silvae Genética* 48: 25-28.
- GONZÁLEZ S., C.; ALÍA, R.; GIL, L. 1999b. Genetic differentiation in 19 native populations of *Pinus pinaster* Ait.: A comparison of molecular and quantitative traits. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 115-117.
- HAGGMAN, H.; JOKELA, A.; KRAJNAKOVA, J.; KAUPPI, A.; NIEMI, K.; ARONEN, T. 1999. Somatic embryogenesis of Scots pine: cold treatment and characteristics of explants affecting induction. *Journal of Experimental Botany* 50: 1769-1778.
- HERRÁN, A.; ESPINEL, S.; GOICOECHEA P., G. 1999. Utilización del polimorfismo del ADN de cloroplastos para definir regiones de procedencia materna en los robles blancos de la Península Ibérica. *Investigación Agraria; Sistemas y Recursos Forestales* 8: 139-150.
- HORNERO, J.; MARTÍNEZ, I.; CELESTINO, C.; GALLEGOS F., J.; TORRES, V.; TORIBIO, M. 2000. Early checking of genetic stability of cork oak somatic embryos by AFLP analysis. *International Journal of Plant Sciences*.
- ISHII, K.; THAKUR R., C. 1999. RAPD detection of narrow-leaf phenotypes in the regenerated plantlets of hybrid poplar. *Abstracts of Forest Biotechnology '99*. Oxford, UK. P.10-25.
- JIMÉNEZ, P.; AGÚNDEZ, D.; ALÍA, R.; GIL, L. 1999a. Genetic variation in central and marginal populations of *Quercus suber* L. *Silvae Genética* 48: 278-284.
- JIMÉNEZ, P.; GIL, L.; PETIT R., J. 1999b. Analysis of cpDNA variation in *Quercus suber* and *Q. ilex* populations. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics*. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 141-142.
- KANOWSKI, P.J. 1997. Forest genetics and tree breeding. *Plant Breed. Abstr.*, 63: 717-726.
- KHAW C. H.; NOG S. K.; DREW R. A. 1998. Performance of commercial scale clonal oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) plantings in Malaysia. *Acta Horticulturae* 461: 251-258.
- KINGSMAN S., M.; KINGSMAN A., J. 1988. Genetic engineering an introduction to gene analysis and exploitation in eukaryotes. Blackwell Scientific Publications. USA. 522 p.
- MANN C., C.; PLUMMER M., L. 2002. Forest biotech edges out of the lab. *Science* 295:1626-1629.
- MANOS P., S.; DOYLE J., J.; NIXON K., C. 1999. Phylogeny, biogeography, and processes of molecular differentiation in *Quercus* subgenus *Quercus* (*Fagaceae*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 12: 333-349.
- MARTÍNEZ R., R.; RODRÍGUEZ DE LA O., J.; J. J. VARGAS, H.; BERMEJO V., B. 1999. Organogénesis y embriogénesis somática *in vitro* en Nim, *Azadirachta indica* A. Juss. (Un árbol de uso multiple). *Revista Chapingo. Serie Ciencias forestales y del ambiente* 5(2):115-166.
- MARUYAMA, E.; ISHII, K.; KINOSHITA, I. 1998. Alginate encapsulation technique and cryogenic procedures for long-term storage of the tropical forest tree *Guazuma crinita* Mart. *in vitro* cultures. *Japan Agricultural Research Quarterly* 32: 301-309.
- MAYER, S. 2001. International regulation and public acceptance of GM trees: demanding a new approach to risk evaluation. *Proc*

- 1st Int'l Symp on Ecological & Societal Aspects of Transgenic Plantations, Oregon State University, 105-110.
- MERKLE S., A.; DEAN J., F. D. 2000. Forest biotechnology. *Biotechnology* 11: 298-302.
- MULUVI G., M.; SPRENT J., I.; SORANZO, N.; PROVAN, J.; ODEE, D.; FOLKARD, G.; MCNICOL J., W.; POWELL, W. 1999. Amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis of genetic variation in *Moringa oleifera* Lam. *Molecular Ecology* 8: 463-470.
- MURUGESH, M.; PARTHIBAN K., T.; SURENDRAN, C.; BUVANESWARAN, C. 1999. Tissue culture a tool for the conservation of endangered tree species. *Advances in Horticulture and Forestry* 6: 187-191.
- NUEZ, F.; CARRILLO, A. 2000. Los marcadores genéticos en la mejora vegetal. Universidad Politécnica de Valencia. Madrid España. 579 p.
- OLALDE, M.; HERRÁN, A.; LÓPEZ H., U.; ESPINEL, S.; GOICOECHEA P., G. 1999. Molecular biodiversity of white oaks in the Iberian peninsula. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 49-50.*
- ORDÁS R., J.; HUMARA J., M. 1999. Transformation studies in stone pine. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 353-368.*
- PARK Y., S.; BARRET J., D.; BONGA J., M. 1998. Application of somatic embryogenesis in high-value clonal forestry: deployment, genetic control and stability of cryopreserved clones. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 34: 231-239.
- PENA, L.; Seguin, A. 2001. Recent advances in the genetic transformation of trees. *Trends in Biotechnology* 19:500-506.
- PULLMAN G., S.; CAIRNEY, J.; PETER, G. 1998. Clonal Forestry and Genetic Engineering: Where We Stand, Future Prospects, and Potential Impacts on Mill Operations. *TAPPI Journal* 81(2).
- RADOJEVIC, L.; ÁLVAREZ, C.; FRAGA M., F.; RODRÍGUEZ, R. 1999. Somatic embryogenic tissue establishment from mature *Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* embryos. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 35: 206-209.
- RAJORA O., P. 1999. Molecular biology in sustainable forest management. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 29-39.*
- RIVERA B., R.; I. P.; TORRES, J.; GARZÓN, A.; HERRERA L., E. 1998. Introducción a la biología molecular e ingeniería genética de plantas. SARH-INIFAP-CINVESTAP. 222 p.
- RUSSELL J., R.; WEBER J., C.; BOOTH, A.; POWELL, W.; SOTELO, C.; DAWSON I., K. 1999. Genetic variation of *Calycophyllum spruceanum* in the Peruvian Amazon Basin, revealed by amplified fragment length polymorphism (AFLP) analysis. *Molecular Ecology* 8: 199-204.
- SÁNCHEZ, N.; GRAU, M.; MANZANERA J., M.; BUENO M., A. 1999. RAPD markers for the identification of *Populus* species and *P. tremula* clones. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 125-128.*
- SÁNCHEZ, O. 2000. Micropropagación de algunas leñosas nativas. Editorial Trama. Universidad de Concepción, Chile. 322 p.
- SEMARNAP/PROCYMAF. 2000. Proyecto de Conservación y Manejo Sustentable de Recursos Forestales en México (PROCYMAF). Balance de tres años de ejecución. 29 pp.
- SEMARNAT/CONAFOR. 2001. Programa Nacional Forestal 2001-2006. 118 pp.
- SMITH, C.; WOOD J., E. 1998. *Biología molecular y biotecnología*. Addison Welsley Longman. España. 247. p.
- TIMMIS, R. 1998. Bioprocessing for tree production in the forest industry: conifer somatic embryogenesis. *Biotechnology Progress* 14: 156-166.
- TORIBIO, M.; CELESTINO, C.; GALLEGO, J.; MARTÍNEZ, I. 2000. Induction of somatic embryogenesis in tissues from mature oak trees. In: *Development of Integrated Systems for large-scale Propagation of elite Plants using In Vitro Techniques*. Ó Riordáin, F., ed. COST Action 822: Report of activities, 1998. European Communities, EUR 19237. pp. 236-237.
- UENO, S.; YOSHIMARU, H.; TOMARU, N.; YAMAMOTO, S. 1999. Development and characterization of microsatellite markers in *Camellia japonica* L. *Molecular Ecology* 8: 335-338.
- VENDRAME W., A.; COCHERT, G.; WETZSTEIN H., Y. 1999. AFLP analysis of variation in pecan somatic embryos. *Plant Cell Reports* 18: 853-857.
- VILLAR, B.; OLLER J., J.; TEULIERES, C.; BOUDET A., M.; GALLEGO P., P. 1999. *In planta* transformation of adult clones of *Eucalyptus globulus* spp using an hypervirulent *Agrobacterium tumefaciens* strain. *En: Proceedings of Application of Biotechnology to Forest Genetics. Biofor 99. Espinel S., Ritter E. (Ed.). 22-25 September, Vitoria-Gasteiz, Spain. pp. 373-385.*
- WALTER, C.; GRACE, L.; WAGNER, A.; WHITE, D.; WALDEN, A.; WALDEN, A.; DONALDSON, S.; HINTON, H.; GARDNER, R.; SMITH, D. 1998. Stable Transformation and Regeneration of Transgenic Plants of *Pinus radiata* D. Don [Radiata Pine]. *Plant Cell Reports* 17 (6/7): 460-468l.
- YAMAMOTO, T.; SHIMADA, T.; KOTOBUKI, K.; MORIMOTO, Y.; YOSHIDA, M. 1998. Genetic characterization of Asian chestnut varieties assessed by AFLP. *Breeding Science* 48: 359-363.
- ZHENG Y., Q.; ENNOS R., A. 1999. Genetic variability and structure of natural and domesticated populations of Caribbean pine (*Pinus caribaea* Morelet). *Theoretical and Applied Genetics* 98: 765-771.