

S238
38
(S)



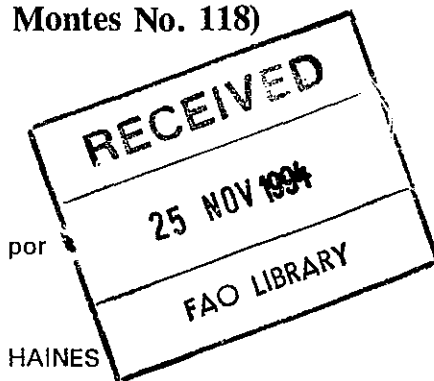
Nor 418
C.2
FOL

RESUMEN DEL DOCUMENTO

EL PAPEL DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL MEJORAMIENTO DE LAS ESPECIES FORESTALES

con referencia a los países
en desarrollo

(Estudio FAO Montes No. 118)



R.J. HAINES

BECARIO FAO ANDRÉ MAYER

CONTENIDO

Prólogo

Resumen del documento, "Biotechnology in Forest Tree Improvement"
(Estudio FAO:Montes 118)

Índice del Estudio FAO:Montes 118

Referencias

PRÓLOGO

El presente documento resume los resultados de un estudio preparado bajo los auspicios de la beca de investigación André Mayer, asignada por FAO en 1991. El mismo informa sobre el estado actual y el potencial futuro de la biotecnología en el mejoramiento de especies forestales con recomendaciones especialmente dirigidas a los países en desarrollo. El estudio completo se publicó en 1994 como Estudio FAO:Montes 118, "Biotechnology in Forest Tree Improvement" (disponible solamente en inglés¹).

A través de programas de selección y mejoramiento genético, es posible aumentar considerablemente la adaptación ambiental y la productividad de las plantaciones forestales, así como también de los árboles plantados fuera de los bosques en ayuda directa a la agricultura o con propósitos de protección. Muchas esperanzas han sido puestas en el mejoramiento rápido, sobre todo en las áreas de adaptación y rendimiento, mediante el uso de las tecnologías tradicionales y nuevas tecnologías de avanzada en las áreas de genética y en el mejoramiento de especies forestales, sobre todo basadas en experiencias exitosas, pero también en proyecciones optimistas.

El documento reafirma que las nuevas tecnologías ofrecen posibilidades futuras que facilitarán considerablemente el trabajo del mejorador forestal. Sin embargo, también enfatiza que el potencial de las poderosas técnicas biotecnológicas, únicamente podrán ser aprovechadas si se aplican conjuntamente con los programas de mejoramiento de árboles ya existentes, y que estén además basadas en conocimientos silvícolas básicos de las especies de interés.

El documento esta dirigido a productores y silvicultores profesionales con

¹ Ver también: Haines, R. (1994). La biotecnología en el mejoramiento de especies arbóreas forestales: tendencias y prioridades de la investigación. Unasylva 45 (177):46-52 (disponible en español, inglés y francés).

conocimientos previos del tema, sin embargo al final del documento se incluye un glosario breve con los términos científicos utilizados. Se espera, que la información suministrada ayudara a los colegas de los países miembros de la FAO a valorar el potencial actual y las limitaciones de la biotecnología en el mejoramiento de especies forestales, y que el mismo sirva para promover las aplicaciones serias de estas nuevas y excitantes alternativas que nos ofrecen estas tecnologías.

RESUMEN DEL DOCUMENTO:

"EL PAPEL DE LA BIOTECNOLOGÍA EN EL MEJORAMIENTO DE LAS ESPECIES FORESTALES"²

El campo de la biotecnología vegetal es una de las áreas de investigación científica sobre plantas en la cual se han registrado los avances mas rápidos durante los últimos años. Muchas oportunidades han sido identificadas para el uso de la biotecnología en la propagación de especies vegetales, la mayoría de ellas han sido aplicadas a los problemas mas urgentes en el mejoramiento de los cultivos agrícolas en los países en desarrollo. Este trabajo está enfocado a la definición del alcance que puede lograr la biotecnología en los programas de mejoramiento de especies forestales, con especial referencia a los países en desarrollo.

SITUACIÓN ACTUAL EN EL MEJORAMIENTO DE LAS ESPECIES FORESTALES

La larga historia de la selección y el mejoramiento de muchos cultivos agrícolas contrasta con la de las especies forestales, en las cuales el cambio de la explotación a la domesticación es mucho mas reciente. Un manejo adecuado de los recursos genéticos forestales es crítico para la optimización de los esfuerzos de reforestación, tanto para las especies industriales como para las no industriales. Por conveniencia, "industriales" se refiere en este caso a plantaciones en gran escala dirigidas a la producción comercial de madera, mientras plantaciones "no industriales" incluyen aquellas con propósitos múltiples y en las cuales el enfoque es menos comercial. Se debe tomar en consideración que el limite entre ambas definiciones no está claramente delimitado.

² Estudio FAO:Montes 118, FAO Roma 1994; disponible solamente en Inglés ("Biotechnology in Forest Tree Improvement").

Existen aproximadamente 100 millones de hectáreas plantadas a nivel mundial con especies forestales industriales (Mather 1990, Gauthier 1991). El método mas utilizado para el mejoramiento de estas especies con un amplio espectro genético, es la selección recurrente dentro de las poblaciones. En el caso de *Eucalyptus grandis* se han concluido la selección de cuatro generaciones y tres en algunas especies de *Pinus*, sin embargo muy pocos programas están tan avanzados como éstos. El uso de huertos semilleros de polinización abierta utilizando varias combinaciones, es el método mas común para identificar y fijar las ventajas genéticas, mientras que unos pocos programas avanzados se caracterizan por la utilización de familias de hermanos completos o clones. Los procesos biológicos reproductivos, así como los patrones de variabilidad, están bien documentados para las especies industriales mas conocidas. El vigor, la forma y la calidad de la madera, son en la mayoría de los programas, los principales criterios de selección (dándole importancia solo en algunos casos a la resistencia a enfermedades y virus). Lo anterior contrasta notablemente con el cultivo de otras especies agrícolas, en las cuales predominan como criterio de selección la resistencia a enfermedades y virus. El álamo es una especie industrial excepcional por muchos aspectos, la hibridación y selección clonal en poblaciones reducidas han sido los métodos tradicionales para el mejoramiento, y debido a esto la resistencia a enfermedades es uno de los criterios de selección mas importantes en esta especie. Se han logrado avances genéticos significativos, en particular para las especies de largos ciclos de rotación, sin embargo, hasta la fecha solo ha producido un impacto mínimo en la calidad genética de las plantaciones. Las principales limitantes para un mejoramiento rápido de la mayoría de las especies industriales establecidas se indican a continuación:

- * El largo ciclo generacional asociado con la baja correlación entre las formas juveniles y adultas, así como la prolongada fase juvenil previa a la de floración.
- * La reducida eficacia en la selección de muchos caracteres genéticos, debido a su bajo carácter hereditario y a la dificultad para realizar sus evaluaciones.

- * A través del uso de huertos de polinización abierta, solo se explota una parte de la variabilidad genética disponible.

Las prioridades de investigación para las especies industriales establecidas deberán centrarse en el perfeccionamiento de métodos para la propagación de familias de hermanos completos y clones; la disponibilidad de métodos de selección más precisos y a más temprana edad, y el estímulo de la floración precoz. Estas acciones deben acompañarse con esfuerzos para optimizar el establecimiento y las prácticas de manejo en las plantaciones, de tal forma que se conviertan en realidad los logros potenciales de la investigación.

Mientras que solamente una pequeña parte de los programas de mejoramiento para plantaciones industriales esta situada en países desarrollados, la mayoría de la superficie adicional que se requerirá mundialmente para cubrir la demanda futura, estimada en unas 100 millones de hectáreas, estarán situadas en las áreas tropicales. Probablemente, muchas de las especies industriales bien conocidas y ya establecidas, serán usadas en la mayoría de las plantaciones en estas superficies adicionales. Un objetivo práctico importante para el mejoramiento de árboles forestales será el establecimiento de programas bien establecidos destinados a estas nuevas plantaciones.

Con el fin de utilizar un número mayor de sitios adecuados para las plantaciones y suministrar de esta forma los productos que normalmente se obtienen mediante la explotación de los bosques naturales, es probable que en una parte considerable de las nuevas plantaciones se utilicen especies tropicales que actualmente no son explotadas en gran escala. El criterio para la selección de estas "nuevas" especies industriales será similar al que es utilizado actualmente para las especies ya establecidas. Algunas de estas especies pueden ser fácilmente mejoradas, mientras que otras pueden presentar problemas como por ejemplo el de la floración, la producción de semillas, y posiblemente sean susceptibles a insectos y enfermedades. La distribución y los usos potenciales de estas nuevas especies, en términos de adaptación y de sus características fenotípicas y genéticas, no son bien conocidas, y puede ser también probable que este

acervo genético este amenazado. La implementación de programas de mejoramiento genético para especies forestales, será una prioridad importante para estas especies. La experimentación con especies potencialmente útiles, plantea importantes desafíos, especialmente en lo que se refiere a: la descripción de sistemas de reproducción, los estudios de procedencia, el establecimiento de ensayos, la aplicación de medidas de conservación de la diversidad genética y al inicio de actividades orientadas al mejoramiento genético de las especies.

Existe una necesidad global para la implementación de grandes programas de plantaciones de especies no industriales, con una cobertura por lo menos igual a la superficie que ocupan actualmente las plantaciones de especies industriales situadas en su mayoría en los países en vías de desarrollo. Los programas de mejoramiento para las especies no industriales difieren ampliamente a las de especies industriales, en lo que se refiere a criterios de selección, complejidad y amplitud de la variedad. Algunos de los taxa son sumamente heterogéneos y presentan características genéticas que los hacen particularmente adaptables a un rápido programa de mejoramiento por métodos tradicionales. Sin embargo, las características fenotípicas de muchas especies no industriales, potencialmente valiosas, siguen siendo en gran medida desconocidas. Aunque no han sido bien estudiadas algunas de estas reservas genéticas, están amenazadas y algunas especies presentan patrones de variabilidad impredecibles, como resultado del manejo a que han sido sometidas por el hombre. A pesar de que en algunos programas se ha llevado a cabo una labor de selección, la mayor parte de las especies no industriales están aún en fase de experimentación. La necesidad de establecer plantaciones en una gran diversidad de ambientes, muchos de los cuales son marginales o de difícil acceso, implica que las plantaciones no industriales condicionan su futuro en el número substancial de las miles de especies potencialmente útiles. Se ha realizado un trabajo formidable en la selección de las especies mas prometedoras. El mayor énfasis para el mejoramiento de las especies no industriales estará dirigido probablemente hacia su explotación, colección, estudios taxonómicos en relación a su variabilidad genética, ensayos de especies y de procedencia, evaluación de las características reproductivas, y las actividades relacionadas con la conservación de la variabilidad

genética. La hibridación interespecífica podrá ser de valor considerable para varios taxa. En aquellos casos donde se pueden definir criterios de selección compatibles a nivel regional y las especies arbóreas sean consideradas suficientemente importantes, los programas de selección clonal serán de gran valor para las especies que se propagan fácilmente en forma vegetativa y también para aquellas que se propagan por semillas. Sin embargo programas de mejoramiento mas complejos posiblemente no sean necesarios para la mayoría de las especies. Es posible que una estrategia de mejoramiento basada en un solo evento o en avances cuantitativos sea mas apropiada que aquellos programas dirigidos a un incremento continuo de las mejoras genéticas. Ambos tipos de estrategias tendrán que tomar en cuenta la conservación genética en los programas de mejoramiento con el fin de asegurar éxitos a largo plazo.

Como ha señalado Kanowski (1993) el mejoramiento genético de árboles forestales no recibe suficientes recursos financieros. Esto ocurre sobre todo en los países en desarrollo donde los fondos de los programas nacionales e internacionales no son suficientes para realizar las actividades mínimas esenciales antes indicadas y donde frecuentemente existe falta de continuidad. El nivel técnico del personal e instalaciones inadecuadas en casi todas las regiones agrava aun mas estos problemas. En lo que respecta a las especies no industriales, los principales obstáculos para un mejoramiento rápido son la escasez de recursos, unida a la diversidad de las necesidades de los usuarios, mucho mas que las limitaciones biológicas.

BIOTECNOLOGÍAS Y SUS APLICACIONES AL MEJORAMIENTO DE ESPECIES FORESTALES

Crioconservación y almacenamiento *in vitro*

El material con capacidad de regeneración, por ejemplo los cultivos embrionícos, puede tener un éxito relativo a corto plazo (de tres a cinco años), en un proyecto de investigación dirigido hacia el almacenamiento *in vitro* y a la crioconservación para nuevas especies.

Aunque el almacenamiento *in vitro* y la crioconservación se utilizan cada vez mas para el almacenamiento de germoplasma de especies agrícolas amenazadas, esta técnica tiene actualmente poca aplicación en las especies forestales. Los reservas genéticas de casi todas las especies industriales establecidas están bastante bien conservadas en rodales *in situ* y *ex situ* y para corto y mediano plazo, en bancos de semillas. Sin duda alguna existe un problema de conservación de genes para muchas especies arbóreas, sobre todo las latifoliadas tropicales y las no industriales. En la actualidad no se conocen bien ni la distribución geográfica de estas especies ni sus características biológicas y taxonómicas. Sin embargo, se sabe que las semillas de algunas de estas especies son recalcitrantes, mientras que otras poseen semillas ortodoxas. Los principales obstáculos para la conservación del germoplasma de especies forestales incluye la insuficiencia de recursos económicos disponibles para su estudio, la recolección y la caracterización necesarias antes de almacenar cualquier germoplasma y la poca estabilidad a largo plazo de muchas de las instalaciones existentes para el almacenamiento en bancos de semillas. El reemplazo de las facilidades existentes por otras con tecnologías mas avanzadas, es muy probable que no tengan un impacto positivo sobre los programas de conservación genética en las especies arbóreas tropicales. En el caso de las especies recalcitrantes, se debería dar prioridad al establecimiento de plantaciones *ex situ*, lo que facilitaría la evaluación de los individuos. A mas largo plazo, la crioconservación y el almacenamiento *in vitro*, podrían tener alguna aplicación como estrategia complementaria de conservación, pero solo en el caso de poblaciones bien estudiadas y recalcitrantes, como lo son el álamo y el nogal. Por supuesto que las medidas de conservación *ex situ*, solo deberían ser usadas como complementarias a los programas adecuados *in situ*.

La crioconservación requiere mucha mas atención como método para arrestar la fase juvenil y de esta forma poder retener las ganancias genéticas que nos ofrece la silvicultura clonal como en las especies industriales. Esta tecnología es aplicable principalmente donde se estén implementando programas de mejoramiento. En estos casos la silvicultura clonal tiene un objetivo realista, sin embargo, el proceso que revierte a los estados juveniles es difícil, especialmente en el caso de las coníferas.

Con el énfasis continuo en los programas cooperativos de mejoramiento de las especies forestales industriales y no industriales en los países tropicales, el intercambio internacional de materiales será cada vez mas importante. A corto plazo, este intercambio estará limitado principalmente a semillas destinadas a pruebas de especies y procedencias. A medida que los programas de mejoramiento avancen, el intercambio y transporte de material vegetal se hace mas importante. En este sentido, la tecnología del cultivo *in vitro* podría encontrar aplicaciones a mas largo plazo.

Marcadores moleculares

Las técnicas para los análisis de isoenzimas, Fragmentos de restricción de tamaño polimórfico (RFLPs) y Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPDs), están bien establecidas, y se pueden esperar adaptaciones apropiadas para nuevas especies a corto plazo.

Los marcadores moleculares tienen aplicaciones importantes en la investigación relacionada con los programas avanzados de mejoramiento de las especies industriales, especialmente en lo que se refiere a control de calidad, por ejemplo, las técnica de "huellas marcadoras" se usa para la comprobación de la identificación clonal, la contaminación de los rodales por individuos no deseables y para estudiar los patrones de cruzamiento. Las Isoenzimas pueden dar resultados satisfactorios para algunos pero no para todos estos propósitos.

Los marcadores moleculares como isoenzimas y marcadores del ADN también tienen una aplicación inmediata en el apoyo a los programas de mejoramiento de las especies latifoliadas tropicales y las especies no industriales, en especial en los estudios taxonómicos y en la investigación sobre sistemas de cruzamiento. Otra aplicación potencialmente útil de los marcadores moleculares es 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. Sin embargo, debido a las bajas correlaciones entre patrones de variabilidad para caracteres de adaptabilidad, su uso debe ser aplicado con cautela.

En realidad, la aplicación de los marcadores como ayuda para la selección de individuos a corto y mediano plazo será bastante limitada. Se necesitarán marcadores mas económicos y aun cuando éstos estén disponibles, la tecnología será aplicada principalmente a los programas avanzados de mejoramiento, los cuales pueden costear la creación y el mantenimiento de estructuras de poblaciones adecuadas y donde además puedan aplicarse las técnicas de la silvicultura clonal. Solo un número restringido de programas caen dentro de esta categoría. En estos casos, se justificarían algunos esfuerzos dirigidos al desarrollo de técnicas de selección por marcadores. Para la mayoría de las especies, se prefiere utilizar los recursos económicos disponibles para conseguir que los programas de mejoramiento logren este estado de desarrollo, en lugar de destinarlos al fomento de la selección con ayuda de marcadores moleculares. Es improbable que la selección con ayuda de marcadores tenga mucha aplicación en las especies no industriales, sin embargo, debido al corto tiempo generacional, taxa como el de la *Gliricidia* puede ser de utilidad como especie "modelo" para futuros ensayos.

Los marcadores moleculares tienen en la actualidad un valor considerable en: (i) El apoyo a la investigación estratégica a largo plazo; (ii) la gran contribución hacia la comprensión de los mecanismos genéticos básicos y (iii) la comprensión de la organización genómica a nivel molecular.

En lo que respecta a las especies forestales, el estudio de los caracteres cuantitativos, será en el futuro el centro de estas actividades, las cuales deberán concentrarse en unas pocas especies, como por ejemplo el pino de incienso *Pinus taeda* y en particular híbridos tales como *P. elliotii* x *P. caribea*.

Selección *in vitro*

Muchas publicaciones recientes que se refieren a cultivos agrícolas, han reportado una correlación útil entre las respuestas *in vitro* y la expresión de características deseables en el campo, un ejemplo común es la resistencia a enfermedades. Resultados positivos se han reportado también para: tolerancia a herbicidas, metales, sales y bajas temperaturas.

Entre los criterios de selección de mayor importancia en lo que se refiere a las especies árboles forestales, se encuentran, vigor, forma del fuste y calidad de la madera. Sin embargo, la baja correlación con las respuestas en el campo, limitan la utilización de la selección *in vitro*, por lo cual la aplicación de esta tecnología tendrá un uso limitado en el mejoramiento de las especies arbóreas forestales. La selección *in vitro* será importante únicamente para unos pocos programas relacionados con la resistencia a enfermedades, pero no como un objetivo de investigación que pueda generalizarse.

Ingeniería Genética

Especies agrícolas transformadas con genes que inducen resistencia a virus e insectos, así como a varios tipos de herbicidas, han sido desarrolladas y están cerca de ser utilizadas comercialmente. Entre las plantas transformadas a las cuales se le han incorporado estos genes se encuentran los álamos. En la actualidad, se están desarrollando varios proyectos con especies de árboles forestales, en particular dirigidos a la modificación de la biosíntesis de la lignina utilizando la técnica del contra sentido ("antisense"). La transformación de una nueva especie con genes extraños actualmente disponibles que inducen resistencia a insectos o herbicidas, constituirá un importante logro de investigación, cuyo éxito dependerá de la capacidad de regeneración de plantas completas a partir de las células transformadas. La manipulación de caracteres mas complejos será una empresa aun mas ardua, la cual exigirá una investigación mas básica. Aunque se han logrado progresos rápidos en la ingeniería genética, todavía se requiere de un gran esfuerzo de investigación. Un obstáculo para un avance rápido en este campo es la falta de técnicas de transformación efectivas, aunque se están mejorando las técnicas existentes. En algunos árboles la regeneración *in vitro* es difícil, sin embargo este problema puede estar sobredimensionado; tampoco es un obstáculo para la aplicación efectiva de las técnicas de ingeniería genética la carencia de respuesta del material de árboles adultos, siempre y cuando en material juvenil responda satisfactoriamente. Una consideración importante que a menudo no se toma en consideración, es la necesidad de una intensa experimentación a nivel de campo, antes de poder formular recomendaciones responsables

con respecto a la distribución de plantas transgénicas en gran escala. Dichos ensayos pueden ser extensivos y prolongados, dependiendo de las especies y genes involucrados. Los proyectos de investigación de este tipo son necesariamente intensivos, y deben ser considerados a largo plazo y con modestas expectativas de éxito.

La resistencia a insectos tiene un valor potencial, por ejemplo para los álamos, algunos tipos de pino, eucaliptos y especies latifoliadas tropicales. Un único gen pudiera ser suficiente para lograr resistencia en especies de crecimiento rápido, sin embargo, para las especies de crecimiento lento se debe trabajar con mucha cautela. No se debe subestimar la labor que implica la introducción de varios genes que inducen diferentes tipos de resistencia, para que los insectos no adquieran tolerancia cuando se trata de especies de crecimiento lento. La reducción de la biosíntesis de la lignina es un objetivo muy importante para las especies destinadas a la obtención de pulpa. La introducción de genes que confieren tolerancia a herbicidas tiene cierto interés, pero en muchos programas las ventajas que ofrece la aplicación indiscriminada de herbicidas puede no ser suficiente para que un programa de investigación en esta área resulte rentable. Un factor importante podría ser la sustitución de herbicidas "amigables" al medio ambiente, tales como el glifosato, por los herbicidas residuales usados actualmente. Es probable que los genes que inducen tolerancia al frío tengan cierto valor comercial para muchas especies, en particular para los eucaliptos. Sin embargo, queda aun mucho por estudiar, antes de poder afirmar que es posible conferir una tolerancia suficiente mediante la utilización de proteínas "anticongelantes" y hacer extensivos estos resultados a otras especies forestales. Como medida de bioseguridad, la prevención de la dispersión de genes a poblaciones naturales será probablemente una de las principales preocupaciones en la aplicación práctica de la ingeniería genética y la esterilidad deberá ser uno de los primeros objetivos de la ingeniería genética aplicada a las especies forestales. El principal factor que limita esta aplicación, es el estado actual de los conocimientos sobre el control molecular de las características más importantes como son, las relacionadas con el crecimiento, la adaptación, la calidad del fuste y el estado de juvenilidad.

También es importante que los genotipos obtenidos mediante ingeniería genética sean de alta calidad con respecto a otras características. El ensayo clonal es la estrategia mas lógica a seguir, para integrar la ingeniería genética a los programas tradicionales de mejoramiento de árboles. Por estas razones, es preferible aplicar la ingeniería genética a especies que cuentan con programas avanzados de mejoramiento y en las que se pueda considerar de modo realista la posibilidad de utilizar técnicas de clonación. La investigación sobre este tema no deberá constituir un objetivo prioritario, particularmente en el caso de especies cuya variación natural dentro del taxon no ha sido estudiada lo suficiente.

Variación Somaclonal

La variabilidad inducida durante los cultivos celulares o de callos ha sido reportada para muchas especies. En algunas especies agrícolas, se han producido variantes que muestran rasgos aprovechables económicamente, como son la resistencia a enfermedades y resistencia a la salinidad. Este fenómeno aun no está bien entendido, y la estabilidad de estas modificaciones a través de las generaciones subsiguientes cuando se multiplican sexualmente, solo ha sido demostrado en algunos casos. Esta es una área de investigación en la cual los resultados favorables no son predecibles, y el uso de esta técnica depende de la regeneración a partir de células o callos. La investigación con nuevas especies tendrá bases mas solidas cuando el fenómeno pueda ser mejor entendido en los modelos bajo estudio en la actualidad.

Asumiendo, que las características genéticas son estables, este tipo de tecnología es mas valiosa cuando la selección pueda llevarse a cabo a nivel celular (por ejemplo por exposición a una fitotoxina o a altos niveles de minerales) de esta forma se pueden revisar un gran número de genotipos, en los cuales el nivel de la característica que se pretende seleccionar se encuentra fuera del rango disponible en forma natural para esa especie. Un ejemplo en el cual se reflejan estos criterios es en el caso de la resistencia al frío en los eucaliptos. Hasta la fecha no se ha encontrado una aplicabilidad evidente en las especies tropicales latifoliadas o en las

especies no industriales para las cuales la variación genética natural esta poco definida.

Fusión de Protoplastos

En este campo existe una larga historia de investigación básica en la cual se han logrado algunos éxitos, especialmente en especies de las familias de las *Brassicaceae* y *Solanaceae*. Sin embargo, existen severas limitaciones para su utilización debido a la relación taxonómica de los padres y a las limitaciones para la regeneración de plantas a partir de protoplastos.

Las esperanzas de éxito con esta tecnología utilizando otras nuevas especies se espera que sea limitada.

Aparentemente, la técnica de la fusión de protoplastos, parece tener poca aplicabilidad en árboles forestales, particularmente para aquellas en las cuales ha habido poca investigación acerca de posibilidades de la hibridación tradicional (por ej. algunas especies tropicales latifoliadas y en las no industriales). A largo plazo, los objetivos que se pretenden lograr mediante la fusión de protoplastos podrían alcanzarse en forma mas eficiente mediante manipulaciones a nivel del ADN.

Cultivos de Células Haploides

Los cultivos de anteras han sido utilizados para la producción rápida de líneas homocigóticas en algunas especies monoicas de cereales y algunos vegetales. Existen muy poca información sobre el uso de los cultivos de gametofitos en las especies forestales. Las investigaciones dirigidas hacia esta finalidad tienden a ser a largo plazo y con pocas posibilidades de obtener resultados satisfactorios.

La introducción de las plantas haploides no ha tenido una aplicación inmediata sobre los programas de mejoramiento de especies forestales, a pesar de que estas plantas pueden ser de gran utilidad en los estudios de genética básica, por ejemplo, en los estudios de heterosis. Como un

objetivo estratégico de investigación a largo plazo para las especies de interés industrial, la inducción de plantas haploides deberá ser de poca importancia, por lo menos hasta que no se dispongan de metodologías para la selección temprana y floración rápida de estas especies. El mejoramiento de las especies no industriales no justifica en la actualidad el empleo de estas técnicas.

Rescate de embriones *in vitro*

Esta técnica ha sido utilizada particularmente en árboles frutales con la finalidad de permitir el desarrollo de embriones que normalmente hubieran abortado a causa de la incompatibilidad entre el óvulo y el desarrollo del embrión, así como para el rescate de embriones cigóticos en especies apomíticas. Estas técnicas no son muy complicadas, y el desarrollo de protocolos de investigación para nuevas especies será un reto menor, de corta duración, y con grandes posibilidades de éxito.

El rescate de embriones ha sido utilizado ocasionalmente en especies forestales, pero el requerimiento de este tipo de tecnologías probablemente estará limitado a un pequeño número de híbridos para los cuales esta restringido el desarrollo de embriones *in vitro*. A corto plazo, la investigación de este tipo no será de mucha importancia. Sin embargo y a un mayor plazo, cuando las barreras de la hibridización natural estén mejor definidas, se podrían dirigir investigaciones en esta área hacia aquellas híbridos cuyas especies hayan sido identificadas como de mucho interés y para las cuales otros estudios hayan sugerido que las técnicas *in vitro* pueden aportar soluciones.

Miroprogación

Mas de 1000 especies vegetales han sido miroprogadas, incluyendo 100 especies forestales. Mediante un esfuerzo de investigación apropiado se podrían desarrollar protocolos de esta técnica para la mayoría de las especies forestales. En general se podrá describir un proyecto de investigación en esta área como de corto a mediano plazo y con esperanzas de éxito moderadas.

En lo que respecta a la mayoría de las especies industriales, el costo elevado de los propágulos y la escasez de datos sobre los resultados de comportamiento en el campo, siguen siendo los principales obstáculos que deberán superarse antes de que se pueda prever el uso mas generalizado de plantas micropropagadas como material directo de plantación. Sin embargo, la micropropagación tiene una aplicación sobre los sistemas integrados de propagación clonal que permite la plantación comercial de esquejes obtenidos a partir de plantas madres, de clones seleccionados, multiplicados rápidamente y micropropagadas. Este método solo es de valor para programas de mejoramiento muy avanzados, los cuales incluyen la identificación de los clones superiores. Esto ocurre actualmente solo en el caso de unos pocos programas en eucalipto tropical, y posiblemente algunos programas de álamos, pero podrían incluir potencialmente otras especies industriales. Es esencial una integración equilibrada de esta tecnología en los programas de mejoramiento, cuando la realización de ensayos clonales en una escala relativamente amplia sea posible y no presente problemas financieros. El hecho de que en la actualidad estas técnicas sean aplicables sobre todo en material juvenil, no constituye necesariamente un obstáculo para obtener ventajas considerables en la silvicultura clonal. No obstante, esto depende de la habilidad para almacenar material juvenil mientras dura el ensayo clonal. Los programas de mejoramiento de nuevas especies industriales y no industriales, no esta lo suficientemente avanzado como para justificar a corto plazo un uso generalizado de la micropropagación.

La micropropagación podría aplicarse de modo mas amplio a la multiplicación de los progenitores de las especies industriales, a medida que avancen los programas de mejoramiento y se superen otras limitaciones de la silvicultura clonal, por ejemplo los problemas de trabajar con individuos adultos. En el caso de algunas especies forestales no industriales, la micropropagación puede desempeñar un papel importante en la multiplicación de variedades seleccionadas, antes de su distribución. La aplicación de técnicas sencillas de micropropagación, aplicables para aquellas especies en las cuales estas técnicas todavía no están disponibles es, por lo tanto, un objetivo de investigación útil pero no prioritario,

respecto a otros, como lo son el fomento de los programas de mejoramiento.

El desarrollo de la embriogénesis somática y de la tecnología para producir semillas artificiales, podrá superar, después de una investigación considerable, las limitaciones de costo del material de siembra antes mencionado, y podrá utilizar estos propágulos para crear plantaciones forestales. En relación a las especies industriales, el desarrollo de esta tecnología constituye, en consecuencia, un objetivo de investigación útil a largo plazo, pero aplicable sobre todo a una o dos especies prototipos como son el *Picea abies* y el *Pinus taeda*, siempre tomando en cuenta las mismas reglas en relación a número, extensión y rotación de los clones, como se hace generalmente en los programas de silvicultura.

Control *in vitro* del estado de madurez

Una larga historia de investigación *in vitro* sobre la regresión de material proveniente de árboles adultos a su estado juvenil, ha conducido a ciertos avances, pero ha aportado pocas pruebas de que el rejuvenecimiento pueda ser total, permanente y estable. Reportes similares y esporádicos sobre la aceleración de los procesos de madurez a través de la manipulación *in vitro*, no sugieren, que este proceso pueda lograrse en forma confiable. Las probabilidades de éxito en esta línea de investigación parecen escasas. Es mucho mas probable, que un conocimiento de las bases moleculares de los procesos de madurez, de lugar a una manipulación practica, pero esta labor esta aun en sus inicios y la regresión o aceleración del proceso de maduración hasta alcanzar los niveles precisos requeridos, sigue siendo una posibilidad remota. Para muchos propósitos en la silvicultura clonal de especies industriales, el poder mantener el estado juvenil es tan útil como lo es el lograr el rejuvenecimiento. El mantenimiento del estado juvenil puede lograrse utilizando técnicas tales como crioconservación o crecimiento bajo el sotobosque. No obstante, uno de los objetivos mas importantes de la investigación estratégica a largo plazo para el mejoramiento de especies forestales con fines industriales sigue siendo un control mas estricto del estado de madurez. La regresión al estado juvenil es útil sobre todo cuando ya están en marcha los programas adecuados de

mejoramiento y donde existan limitaciones para la aplicación de técnicas clonales en la explotación silvícola. La manipulación de los materiales con el fin de inducir una floración precoz y reducir los intervalos generacionales en el estado adulto, es de mayor interés que la regresión al estado juvenil, por lo menos a lo que respecta especies industriales, pero solamente tiene valor cuando existan programas activos de mejoramiento.

SÍNTESIS

La biotecnología representa, para muchos cultivos agrícolas, la mayor esperanza con el fin alcanzar los objetivos urgentes planteados en los programas de mejoramiento y la conservación de la variabilidad genética en las plantas silvestres de la misma familia. También es importante en la multiplicación de individuos élite y en particular en lograr resistencia a enfermedades virales e insectos. Muchos cultivos agrícolas de importancia para los países en desarrollo, como por ejemplo la yuca y otras especies utilizadas mayormente por agricultores de bajos recursos también se beneficiarán con esta tecnología. En contraste, la biotecnología ofrece pocas posibilidades para resolver las prioridades mas urgentes en el mejoramiento de las especies forestales, a pesar de que estas especies están siendo objeto de muchos programas activos de investigación en biotecnología. Esto se debe a que la mayoría de los objetivos de los programas de mejoramiento de especies forestales difieren en forma sustancial de aquellos programas destinados a especies de cultivos agrícolas. Además, las actividades de mejoramiento de árboles forestales no se presta fácilmente a esquemas de centralización, debido a la diversidad de especies y objetivos finales con los que se trabajan y debido al escaso conocimientos existentes para la mayoría de estas especies.

Las posibilidades destinadas a reemplazar o suplementar tecnología en los programas de mejoramiento de árboles a corto plazo son:

- (i) Para programas de mejoramiento bien establecidos con especies industriales bien estudiadas biológicamente:*

- * La utilización de marcadores moleculares en el control de calidad y en programas avanzados de mejoramiento, por ejemplo, para la identificación clonal, contaminación en huertos semilleros y para revisar los patrones de apareamiento dentro de los huertos clonales, mediante la técnica de las huellas marcadoras ("fingerprinting").
- * El uso de la micropropagación en los sistemas integrados de propagación clonal permite la plantación comercial de esquejes obtenidos a partir de plantas madres de clones seleccionados y micropropagados. Este método es únicamente útil en programas avanzados de mejoramiento en los cuales se incorpora la caracterización de clones valiosos dentro de un esquema estratégico de silvicultura clonal.

(ii) Para programas de mejoramiento de especies no industriales y "nuevas" especies industriales poco estudiadas biológicamente:

- * El uso de marcadores para estudios taxonómicos esenciales e investigaciones de sistemas de cruzamiento.
- * El uso de marcadores para cuantificar la variabilidad genética como ayuda en el diseño de estrategias de muestreo relacionadas a la conservación de genes, y el establecimiento de colecciones de poblaciones para su mejoramiento.

Las estrategias prioritarias de investigación para la aplicación de la biotecnología en el mejoramiento de especies forestales son:

(i) Investigación genética a largo plazo. Los objetivos prioritarios son:

- * Ingeniería genética para inducir esterilidad. Esto es de un pre-requisito como método de bioseguridad para las aplicaciones finales de la ingeniería genética.

- * La utilización de marcadores moleculares y técnicas de transformación del ADN para la investigación de los procesos genéticos a nivel molecular, en particular, los relacionados con características complejas como el crecimiento, adaptación, calidad del fuste, y la calidad de la madera. Esta labor es importante sobre todo para las especies de árboles industriales, pero también facilitará la aplicación de la biotecnología a especies arbóreas no industriales.
- * Los estudios moleculares del estado de madurez. Esto es prioritario para plantaciones de especies no industriales.
- * El desarrollo de la embriogénesis somática, combinado con la tecnología de semillas artificiales como método de propagación clonal para plantaciones de especies industriales. Esta área será de prioridad menor.

Los proyectos de investigación del tipo mencionado anteriormente se manejan mas eficientemente utilizando un número reducido de especies "modelos". La dispersión de los recursos económicos y genéticos, y el esfuerzo que se debe dedicar a muchas especies puede ser contraproducente.

(ii) Investigación específica a largo plazo. Algunos objetivos son:

- * La ingeniería genética de caracteres útiles, por ejemplo:
 - La reducción de la lignina en especies para producción de pulpa
 - La tolerancia al frío, particularmente en eucaliptos
 - Resistencia a insectos, por ejemplo, en álamos y posiblemente *Meliaceae* (cuando existen programas adecuados de mejoramiento)

La transformación con genes apropiados podrá conseguirse a corto o mediano plazo (entre cinco a diez años), sin embargo, será necesario un período de diez años de experimentos a nivel de campo antes de que se puedan hacer recomendaciones para su distribución comercial.

- * La selección, con ayudas de marcadores, de especies para a las cuales existan programas de mejoramiento avanzado y donde el establecimiento de estructuras y el mantenimiento de poblaciones apropiadas sea económicamente factibles. Probablemente habrán de transcurrir diez años antes de que esta técnica pueda ponerse en practica.

(iii) Investigación a corto y mediano plazo. Los objetivos útiles son:

- * El estudio de la correlación genética entre la capacidad regenerativa bajo condiciones *in vitro* y la expresión a nivel de campo desde el punto de vista comercial (alta prioridad).
- * El desarrollo de métodos de crioconservación como medida para mantener la fase juvenil en programas avanzados para el mejoramiento de especies industriales.
- * El desarrollo de técnicas sencillas de micropropagación para especies en las cuales no se ha desarrollado dicha técnica (prioridad de baja a moderada).
- * El desarrollo de la crioconservación como método complementario a la conservación de genes de especies de valor comprobado, que cuenten con programas de mejoramiento, y en las cuales se haya demostrado que sus semillas son recalcitrantes (prioridad moderada). Sin embargo, la posibilidad de una eventual regeneración a partir de lotes de semillas almacenados demanda especial atención (ver Wang *et al.* 1993).

Actualmente existen pocas áreas en las cuales la biotecnología pueda reemplazar provechosamente, o complementar tecnologías ya existentes para el mejoramiento de las especies forestales. Las aplicaciones potenciales de varias de estas biotecnologías son interdependientes, por ejemplo, la aplicación de la ingeniería genética para mejoramiento y de la crioconservación para la retención del estado juvenil, dependen de la

existencia de métodos apropiados para la propagación clonal a partir de material cultivado. Las aplicaciones de estas tecnologías, y la selección con la ayuda de marcadores, son apropiadas solamente en los mejores programas forestales de multiplicación clonal, cuando se habla del mejoramiento forestal se puede decir que la silvicultura clonal es el punto clave para la aplicación de otras técnicas biotecnológicas en el mejoramiento de árboles forestales. Una silvicultura clonal sólida depende de la existencia de buenos programas de mejoramiento con el fin de producir los genotipos superiores deseados con una base continua. Las iniciativas en materia de investigación biotecnológica no pueden ni deben financiarse a expensas del desarrollo de buenos programas convencionales de mejoramiento genético.

Además de las grandes inversiones que se requieren para el desarrollo de la mayoría de las técnicas biotecnológicas y para un muestreo adecuado, dichas inversiones también son necesarias para que muchos programas de mejoramiento puedan alcanzar niveles apropiados de desarrollo. Como ha sido enfatizado por Burdon (1992) un compromiso con la biotecnología debe ser parte de un incremento substancial con el compromiso hacia las técnicas de plantaciones forestales y mejoramiento genético. Este nivel de inversión no ha sido alcanzado para especies industriales y nunca estará disponible para la mayoría de las especies no industriales. La brecha entre los métodos tradicionales utilizados en el mejoramiento de especies arbóreas forestales y los enfoques biotecnológicos es mayormente un asunto de inversión financiera.

El elevado costo requerido por los programas de investigación favorece la colaboración, en lugar de una competencia entre los que poseen los conocimientos de estas biotecnologías, como ha sido resaltado por Burdon (1992). Sería deseable que por lo menos las investigaciones costosas y a largo plazo sean implementadas mediante colaboración entre laboratorios especializados y utilizando como modelos especies adecuadas.

En los países en desarrollo existen muchos programas de plantaciones privadas de árboles forestales con fines comerciales. Tomando en consideración el riesgo y los beneficios potenciales, los responsables de

estos programas tomarán sus propias decisiones con el fin de definir las inversiones mas apropiadas para cada caso, así como el nivel de la misma. En las explotaciones industriales basadas en los países en desarrollo, la disponibilidad de fondos para el mejoramiento genético dirigidas a nuevas especies industriales y no industriales es muy inadecuada. Esta misma circunstancia ocurre en relación a los urgentes trabajos necesarios en las áreas de exploración, conservación y ensayos a nivel de campo, así como para la capacitación técnica y otras facilidades requeridas. Los fondos que están siendo utilizados para estos propósitos deberían reorientarse hacia la biotecnología solamente cuando una tecnología alterna efectiva tenga posibilidades de éxito a corto plazo. En esta categoría se encuentra el uso de marcadores moleculares en los estudios de biotecnología reproductiva, en las investigaciones taxonómicas y para cuantificar la variabilidad genética. Un incremento masivo en los fondos dirigidos para el mejoramiento de árboles forestales en los países en desarrollo deberían dedicar una mayor atención a la biotecnología, sin embargo, destinar los fondos disponibles hacia investigaciones biotecnológicas a largo plazo, es probable que tenga un impacto negativo en los programas de mejoramiento genético de estas especies.

ÍNDICE DEL ESTUDIO FAO:MONTES 118³**PRÓLOGO****AGRADECIMIENTOS****RESUMEN****1. INTRODUCCIÓN****2. SITUACIÓN ACTUAL EN EL MEJORAMIENTO DE LAS ESPECIES FORESTALES****Elementos de un programa de mejoramiento genético forestal****Situación actual del mejoramiento de especies forestales****Especies industriales**

1. Eucaliptos tropicales y subtropicales
2. Eucaliptos tolerantes al frío
3. Árboles latifoliados tropicales
4. Álamos y sauces
5. Árboles de madera dura de climas templados
6. Coníferas de ciclo mediano
7. Coníferas de clima templado de ciclos largos

Especies de uso no industrial**El mejoramiento de árboles en los países desarrollados****EL mejoramiento de árboles en los países en desarrollo**

³ Estudio FAO:Montes 118. "Biotechnology in Forest Tree Improvement"

3. CRIOCONSERVACIÓN Y ALMACENAMIENTO *in vitro*

Principios y logros experimentales

Almacenamiento *in vitro*

Crioconservación

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

Conservación de germoplasma

Mantenimiento de los estados juveniles

Intercambio de Germoplasma

Conclusiones

4. MARCADORES MOLECULARES

Métodos

Isoenzimas

Fragmentos de restricción de tamaño polimórficos (RFLP)

Amplificación al azar de ADN polimórfico (RAPD)

Microsatélites

Principios y logros

Cuantificación de la diversidad genética forestal

Verificación y definición de genotipos

Estudios taxonómicos y filogenéticos

Estudios biológicos

Huellas genéticas

Selección con ayuda de marcadores

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

Evaluación de la diversidad genética

- Conservación de genes
- Asociación de poblaciones mejoradas
- Verificación y definición de genotipos
- Estudios taxonómicos y filogenéticos
- Estudios biológicos (contaminación por polen, sistemas de apareamiento)
- Huellas genéticas

Conclusiones

5. SELECCIÓN *IN VITRO*

Principios y logros experimentales

- Selección para resistencia a enfermedades
- Selección para resistencia a herbicidas
- Selección para tolerancia a la salinidad
- Selección para tolerancia a metales
- Selección para tolerancia a altas temperaturas
- Selección para tolerancia a bajas temperaturas
- Selección para tolerancia al estrés hídrico
- Tolerancia cruzada al estrés
- Selección de otras características

Aplicabilidad en el mejoramiento de especies forestales

6. INGENIERÍA GENÉTICA

Estrategias

Técnicas generales

Introducción de genes extraños

Promotores

Marcadores genéticos

Características seleccionadas

Resistencia a insectos

Gen tóxico del Bacillus thuringiensis (Bt)

Inhibidores de proteasas

Otros genes

Resistencia a virus

Resistencia a bacterias y hongos

Resistencia a nematodos

Tolerancia a herbicidas

Tolerancia al frío

Propiedades de la madera

Esterilidad

Auto-incompatibilidad y compatibilidad cruzada

Maduración de frutos

Pudrición de esquejes

Simbiosis

Otras características

Registro de logros

Cultivos en general

Árboles en particular

Desventajas y dificultades

Aplicaciones para especies forestales

Integración en programas de mejoramiento de árboles forestales

Conclusiones

7. VARIACIÓN SOMACLONAL

Principios y logros experimentales

- Resistencia a enfermedades
- Tolerancia a herbicidas
- Tolerancia a sales y otros estrés

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

8. FUSIÓN DE PROTOPLASTOS

Principios y logros experimentales

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

9. CULTIVO DE CÉLULAS HAPLOIDES

Principios y logros experimentales

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

10. RESCATE *IN VITRO* DE EMBRIONES

Principios y logros experimentales

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

11. MICROPROPAGACIÓN

Principios y logros experimentales

- Yemas axilares
- Yemas adventicias
- Embriogénesis somática

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

- Costo del material de siembra
- Fidelidad clonal
- Comportamiento de propágulos a nivel de campo
- Tasa de multiplicación
- Aplicabilidad a material adulto
- Compatibilidad con cultivos almacenados
- Proporción de respuesta de los genotipos

Conclusiones

12. CONTROL *IN VITRO* DEL ESTADO DE MADUREZ

Principios y logros experimentales

Aplicabilidad al mejoramiento de especies forestales

- El papel del estado juvenil en la silvicultura clonal
- Efecto de los intervalos generacionales sobre la ganancia genética

Conclusiones

13. CONCLUSIONES GENERALES

El estado actual del mejoramiento de especies forestales

Las biotecnologías y sus aplicaciones al mejoramiento de especies forestales

- Crioconservación y almacenamiento *in vitro*
- Marcadores moleculares
- Selección *in vitro*
- Ingeniería genética
- Fusión de protoplastos
- Cultivo de gametofitos

Rescate *in vitro* de embriones
Micropropagación
Control del estado de maduración *in vitro*

Síntesis

La biotecnología y el mejoramiento de especies forestales en los países en desarrollo

REFERENCIAS

ACRÓNIMOS

Foto de la portada

Mapa de cruzamiento genético de *Pinus elliottii* x *P. caribaea* híbridos F1

Foto: G. Dale

REFERENCIAS⁴

- Burdon, R.D. (1992) Tree breeding and the new biotechnology - in damaging conflict or constructive synergism? Paper to IUFRO S2.02-08 Conference, Breeding Tropical Trees, Cali, Colombia, October 1992.
- Gauthier, J.J. (1991) Plantation wood in world trade. pp. 9-19 in "The Emergence of New Forest Potentials in the World", AFOCEL, Paris.
- Kanowski, P.J. & Nikles, D.G. (1989) A summary of plans for continuing genetic improvement of *Pinus caribaea* var. *hondurensis* in Queensland. pp. 236-249 in G.L.Gibson, A.R.Griffin & A.C.Matheson (eds) "Breeding Tropical Trees: Population structure and genetic improvement strategies in clonal and seedling forestry.", OFI/Winrock.
- Mather, A.S. (1990) Global forest resources. Belhaven Press, London.
- Wang, B.S.P., Charest, P.J. & Downie, B. (1993) *Ex situ* storage of seeds, pollen and *in vitro* cultures of perennial woody plant species. FAO Forestry Paper No. 113.

⁴Referencias citadas en el resumen. La lista completa de las referencias bibliográficas se halla en el Estudio FAO: Montes 118.

D/V4485