

## CAPÍTULO 15

# Biotecnología para el Manejo de Plagas en la Producción de Semilla Limpia<sup>1</sup>

Anthony Bellotti\*, William Roca\*\*, Joe Tohme\*\*\*, Paul Chavarriaga<sup>ψ</sup>, Roosevelt H. Escobar<sup>ψψ</sup> y Carlos Julio Herrera<sup>ψψψ</sup>

### Introducción

La tecnología de transformación genética vía *Agrobacterium* o biolística (introducción de secuencias de genes mediante el bombardeo de partículas recubiertas con ADN) ha permitido obtener variedades transgénicas de los cultivos más importantes en la alimentación mundial.

Hoy, las variedades de plantas transgénicas que se cultivan a gran escala contienen genes que confieren resistencia a herbicidas y plagas de insectos (James, 1998; 2000). Estos avances han sido posibles en cultivos extensivos como soya, maíz y arroz, en los cuales hay sistemas eficientes y reproducibles de transformación y regeneración de plantas in vitro.

En la yuca se cuenta con un sistema de regeneración de plantas in vitro y de transformación genética. Usando estos sistemas se han producido las primeras plantas transgénicas de yuca con genes marcadores de selección y seguimiento de la transformación (Schopke et al., 1996; Li et al., 1996; Raemakers et al., 1996; González et al., 1998) y también con genes de valor comercial (Sarria et al., 2000).

Entre las características comerciales que justificarían la transformación del cultivo de la yuca está la resistencia a insectos. Ahora bien, en el caso de Colombia, el barrenador del tallo (*Chilomima clarkei* Amsel, Lepidoptera) es una de las plagas que más afecta los cultivos de las diferentes zonas del país. La transformación genética es, por tanto, una herramienta para controlar este insecto.

Hasta hace poco, la mayor incidencia del barrenador estaba localizada, principalmente, en los departamentos de Cesar, Magdalena y Atlántico (costa norte colombiana) donde se cree que el insecto penetró proveniente de Venezuela.

Gracias a su ciclo de vida, el barrenador es una plaga que se extiende rápidamente en las plantaciones; la mayor parte de su ciclo (aproximadamente 43 de los 69 días) ocurre dentro del tallo, donde el insecto es poco visible; por lo tanto, es fácilmente transmisible dentro de las estacas infectadas que se usan como material de siembra.

Hoy, el barrenador del tallo se encuentra no sólo en los departamentos de la costa norte, si no que ha ido ingresando a los departamentos

- 
1. Este documento fue publicado en las Memorias del XXVII Congreso de SOCOLEN, 2000, y fue mejorado por los autores el presente año.
- \* Ph.D., Entomología, Líder de la Unidad de Manejo Integrado de Plagas (MIP), Proyecto Yuca, CIAT, Cali, Colombia. E-mail: a.bellotti@cgiar.org
- \*\* Ph.D., Fisiología Vegetal, Líder del Proyecto Biodiversidad y Recursos Genéticos de Raíces y Tubérculos Andinos, CIP, Lima, Perú. E-mail: w.roca@cgiar.org
- \*\*\* Ph.D., Fitogenética Molecular, Líder del Proyecto Uso de la Agrobiodiversidad mediante la Biotecnología, CIAT. E-mail: j.tohme@cgiar.org
- ψ M.Sc., Biotecnología y Botánica, Asociado de Investigación, Unidad de Biotecnología, CIAT. E-mail: p.chavarriaga@cgiar.org
- ψψ Bioquímico, Asistente de Investigación, Unidad de Biotecnología, CIAT. E-mail: r.escobar@cgiar.org
- ψψψ Ingeniero agrónomo, Asistente de Investigación, Unidad de MIP, Proyecto Yuca, CIAT. E-mail: carjuilherrera@hotmail.com

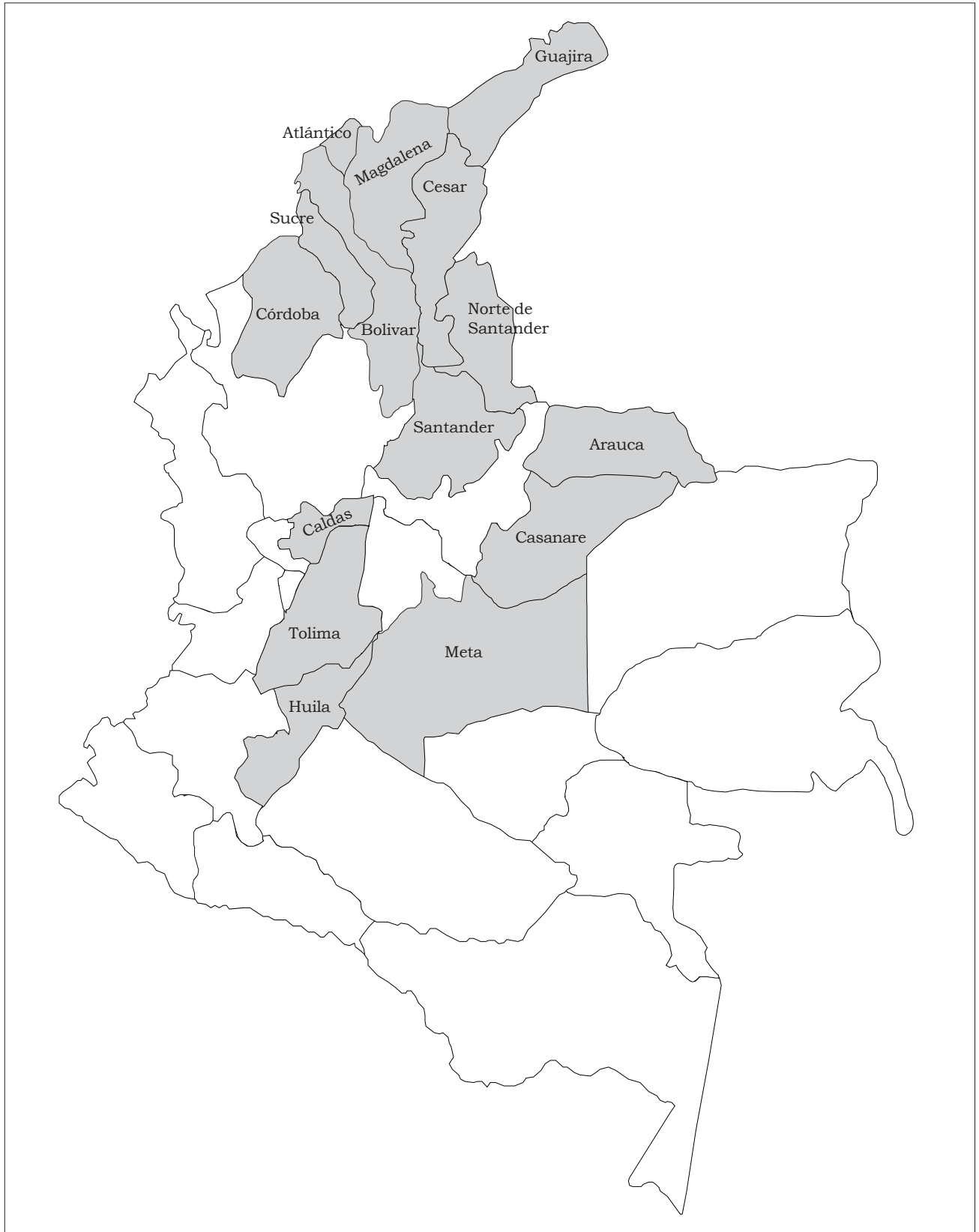


Figura 15-1. Departamentos colombianos en que se reporta la presencia del barrenador del tallo de la yuca, *Chilomima clarkei* (área oscura), desde su supuesta entrada al país a finales de los 70. En departamentos como Caldas, Huila, Santander y Meta, los ataques del barrenador son menos intensos.

del interior, tal como lo muestra la Figura 15-1.

Aún no se ha identificado, mediante una búsqueda sistemática, la resistencia genética (varietal) al barrenador del tallo, a pesar de que se han hecho muestreos para resistencia en más de 500 variedades. Los cultivadores de yuca de la costa norte colombiana, a través de la Asociación Nacional de Productores y Procesadores de Yuca (ANPPY), en su mayoría campesinos de bajos recursos que cultivan en pequeñas parcelas, han solicitado ayuda para solucionar este problema.

Como respuesta a esta petición, el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), con la colaboración de la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA) y financiados por el gobierno holandés (DGIS), a través del Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola (PBA) y del Centro de Estudios Agrícolas y Ganaderos (CEGA), se encuentra desarrollando un proyecto de transformación genética de yuca con la variedad Venezolana (MCO 2215), seleccionada por los cultivadores.

El proyecto pretende introducir un gen (*cry1Ab*) proveniente de *Bacillus thuringiensis* (Bt), una bacteria del suelo que se utiliza como insecticida biológico para el control de insectos, especialmente lepidópteros. El gen original fue modificado para mejorar su expresión en plantas y, actualmente, se encuentra clonado en un vector (plásmido) junto a otros genes de selección y seguimiento (*gus-int*, *nptII*, *man*) de la transformación.

En los experimentos de transformación se pueden utilizar tanto *Agrobacterium tumefaciens* como la pistola genética para introducir un gen. Los genes del vector pueden ser expresados en las células de yuca, lo que se infiere por la expresión de genes marcadores que acompañan al *cry1Ab*. Ha sido posible, por tanto, obtener plantas que son transgénicas, de una variedad modelo MNig11 (TMS60444), la cual se comporta bien in vitro por su alta capacidad para ser transformada y por su regeneración relativamente abundante (Figura 15-2).

La transformación de esta variedad modelo con genes para el control de insectos permitirá establecer la metodología para transformar variedades de importancia comercial, así como

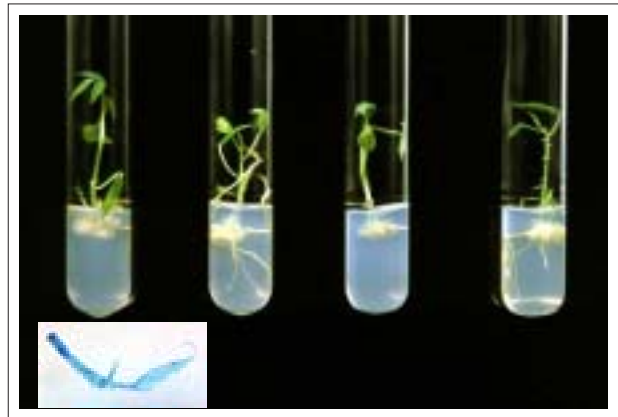


Figura 15-2. Plantas transgénicas de la variedad de yuca MNig11 (TMS60444), que expresan establemente el gen *gus*-intron (inserto) de la construcción genética (pBIGCry), el cual contiene, además, un gen para selección (*nptII*) de células transgénicas y el gen *cry1Ab* que confiere resistencia a lepidópteros como el barrenador del tallo. El inserto muestra un acercamiento de las hojas que expresan el gen *gus-int*.

adelantar estudios (bioensayos) del efecto del gen *cry1Ab* sobre el barrenador del tallo.

### Mejores Sistemas de Cultivo in vitro para la Transformación

Aunque la eficiencia de los sistemas in vitro de regeneración y transformación de yuca no son comparables con aquellos desarrollados para cultivos como maíz, arroz y soya, han servido para establecer la tecnología básica de transformación.

Hoy se cuenta, básicamente, con un par de tecnologías que tienen potencial para producir yuca transgénica. Una de ellas, la de mayor potencial, se conoce como el sistema de Callo Embriogénico Friable (CEF) (Taylor et al., 1996). En este sistema se produce un callo compuesto de múltiples células embriogénicas que, con los medios y hormonas adecuados, regenera plantas. El callo embriogénico puede también mantenerse en un medio líquido y convertirse en una suspensión celular embriogénica. Ambos sistemas pueden ser transformados usando *Agrobacterium* o biolística (Figura 15-3); así, las plantas transgénicas pueden ser regeneradas, aplicando métodos de selección específicos con

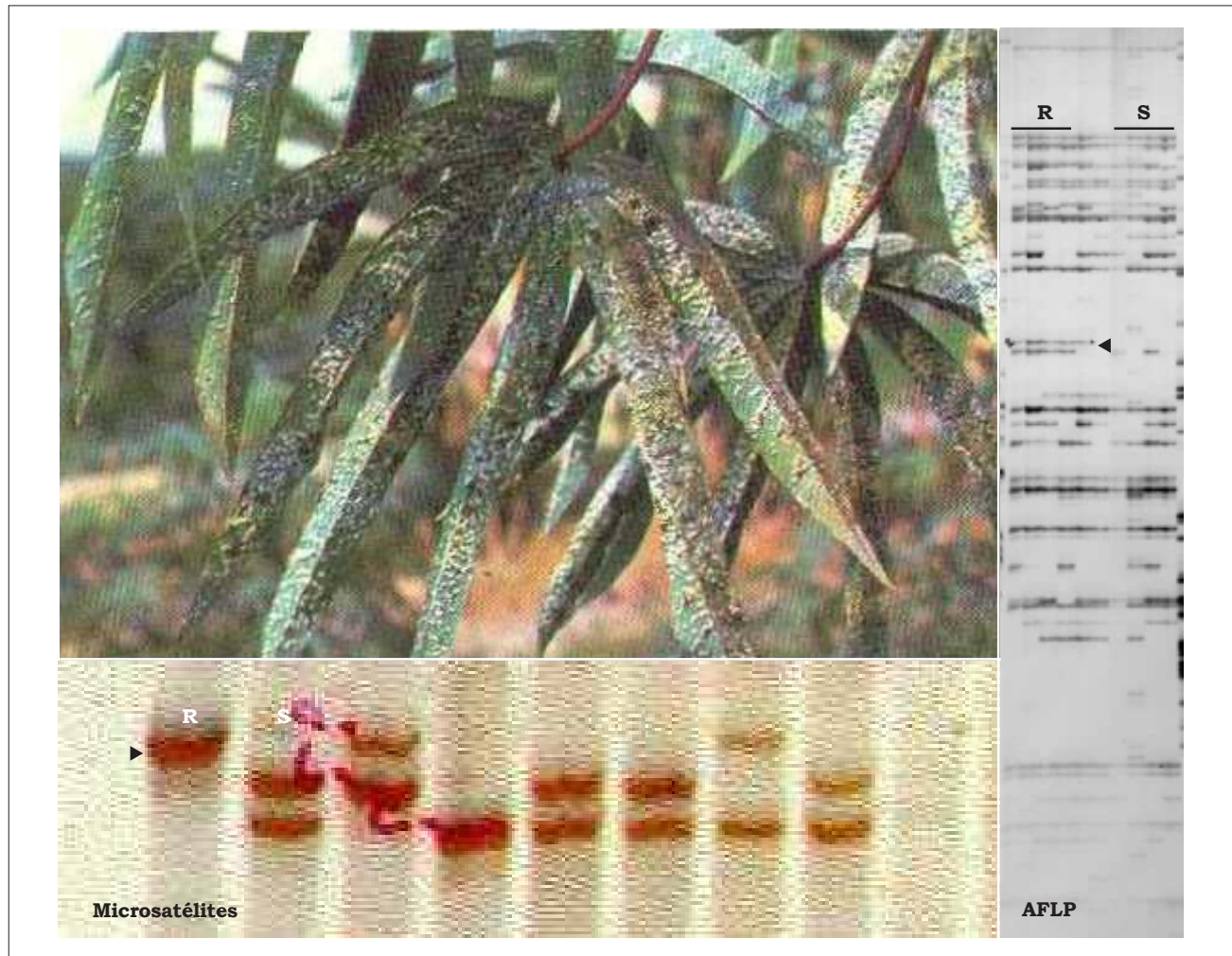


Figura 15-3. Marcadores moleculares del ADN utilizados para detectar zonas del genoma de la yuca posiblemente involucradas en la resistencia a la mosca blanca (arriba izq.). Los marcadores como los AFLP y los microsatélites (secuencias repetitivas) del ADN sirven para encontrar diferencias (flecha) entre individuos resistentes (R) y susceptibles (S) a esta plaga.

antibióticos o azúcares, según el gen de selección.

La respuesta al cultivo de tejidos *in vitro* y, por ende, el éxito en la transformación genética, es altamente dependiente de la variedad de yuca. Se hace necesario, entonces, seleccionar las variedades de interés que respondan adecuadamente a la producción de CEF. Esto permitiría estimar la probabilidad de obtener nuevas variedades comerciales transgénicas, que incluyan genes de resistencia a insectos. El CIAT, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural (MADR), de Colombia, está desarrollando un proyecto que pretende estimar lo siguiente:

1. Si las variedades de yuca de interés comercial pueden formar CEF.
2. Si estas mismas variedades son susceptibles de transformarse genéticamente.
3. Si la probabilidad de éxito en la obtención de variedades transgénicas que pueda tener uso comercial es aceptable.

Este proyecto permitirá seleccionar las variedades comerciales de yuca susceptibles de ser transformadas para introducir en ellas genes de resistencia a insectos y a virus transmitidos por insectos. Actualmente, el CIAT cuenta con más de 13 variedades que están siendo probadas para su respuesta *in vitro*. Se

puede decir que al menos en cuatro de ellas se ha observado la presencia de CEF en diferentes grados. En algunas, su proliferación ha sido más sencilla que en otras, una característica que también parece ser varietal.

### **Marcadores Moleculares y Resistencia al Mosaico Africano de la Yuca y a la Mosca Blanca**

Entre los genes de interés importantes en el control de plagas de yuca están los que confieren resistencia al virus del mosaico africano de la yuca (enfermedad conocida como CMD, o sea, cassava mosaic disease) y la resistencia a la mosca blanca (*Aleurotrachelus socialis*).

El vector del CMD es *Bemisia tabaci* y la plaga es especialmente importante en Africa, aunque el vector del virus (biotipo B de la mosca) existe y también se extiende rápidamente en los continentes americano y asiático.

*Aleurotrachelus socialis* es una plaga que produce entre 70% a 80% de las pérdidas económicas del cultivo. Ya se han identificado genes de origen viral (C. Fauquet, comunicación personal) implicados en la resistencia al CMD.

Utilizando los marcadores moleculares, se ha logrado identificar secuencias en el genoma de la yuca involucradas en la resistencia al CMD (CIAT, 1999). Igualmente, se está analizando el genoma de variedades susceptibles y resistentes a *Aleurotrachelus socialis*, como se observa en la Figura 15-3 (CIAT, 1999). Una vez se definan claramente las secuencias del genoma de la yuca, responsables por la resistencia a CMD o a mosca blanca, dichas secuencias podrían ser clonadas e introducidas, mediante transformación genética, en las variedades de mayor importancia para los pequeños y medianos agricultores.

### **Propagación Rápida de Semilla Certificada**

La falta de tecnología para la producción de material de siembra, en cantidad suficiente y en condiciones fitosanitarias óptimas, se ha convertido en un obstáculo para el desarrollo a escala comercial del cultivo de la yuca en Colombia. La propagación vegetativa convencional ayuda rápidamente a la diseminación de enfermedades de la yuca, lo cual afecta la calidad y cantidad de la "semilla" para siembra y, por ende, el rendimiento.

En la actualidad, el CIAT está desarrollando dos proyectos encaminados a establecer las condiciones básicas necesarias para la multiplicación masiva in vitro de semilla certificada de variedades comerciales de yuca. El proyecto financiado por DGIS-PBA utiliza la tecnología de propagación masiva mediante biorreactores, también conocida como Recipiente de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®) (Teisson y Alvard, 1994), la cual es altamente eficiente en la multiplicación, reduciendo, aproximadamente, en 50% los costos unitarios de propagación.

En el sistema RITA®, los tejidos son bañados durante los ciclos de inmersión con un medio líquido que contiene nutrientes y hormonas; estos ciclos se alternan con periodos de descanso secos, sin oxigenación. El crecimiento de raíces, tallos y hojas se acelera, produciéndose gran cantidad de yemas para los siguientes ciclos de micropropagación.

Con esta metodología se pueden alcanzar tasas de multiplicación mayores que 1:10, dependiendo de la variedad (Escobar et al., 2001). Los RITA® también se han utilizado exitosamente para la proliferación de embriones somáticos de café (Berthouly, 1991), banano (Alvard et al., 1993), caucho (Etienne et al., 1997) y caña de azúcar (Lorenzo et al., 1998), entre otros cultivos.

El éxito en la utilización de biorreactores con fines de propagación masiva depende de la respuesta de la variedad a las condiciones de manejo in vitro en medios líquidos. Ya el CIAT ha desarrollado procedimientos eficientes para la multiplicación de yuca en RITA® usando las variedades Venezolana MCOL 2215 y Verdecita MCOL 1505 (CIAT, 1999). Como segunda fase del proyecto, se pretende estandarizar las

condiciones e implementar el sistema RITA® en clones de interés comercial.

Los costos de desarrollo de la tecnología RITA podrían limitar su aplicación en las comunidades de agricultores de escasos recursos. Por esta razón, el CIAT implementó un segundo proyecto con recursos del PRGA, el cual hizo posible propagar masivamente semilla clonal certificada, en sistemas in vitro, con insumos de bajo costo y de fácil consecución en los mercados locales para una comunidad de Santa Ana, Cauca (CIAT, 1999).

El objetivo final de este proyecto es establecer un sistema de multiplicación masiva transferible a las comunidades campesinas interesadas en crear sus propios "bancos" de material de siembra libre de patógenos.

### Agradecimientos

Los autores agradecen al PBA, al Participatory Research and Gender Analysis Program (PRGA) y al Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural de Colombia (MADR) por sus valiosos aportes en la financiación de los proyectos de investigación mencionados en este capítulo.

### Bibliografía

Alvard D; Cote F; Teisson C. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32:55-60.

Berthouly M. 1991. Fourteenth International Plant Biotechnology Congress. CIPNAEA, San José, Costa Rica. p. 14-18.

CIAT (Centro Internacional de Agricultura). 1999. Annual Report 1999; Project SB-02: Assessing and utilizing agrobiodiversity through biotechnology. Cali, Colombia. p. 34-36; 84-88.

Escobar RH; Muñoz L; Tohme J; Roca WM. 2001. Estado actual de la micropropagación de la yuca. Trabajo presentado en el Seminario

Internacional del Programa Colombiano de Biotecnología Agrícola (PBA), Cartagena, Colombia, febrero 2001. CIAT, Cali, Colombia.

Etienne H; Lartaud M; Michaux-Ferriere N; Carron MP; Berthouly M; Teisson C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg) using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular & Development Biology Plant* 33:81-87.

González AE; Schopke C; Taylor NJ; Beachy RN; Fauquet CM. 1998. Regeneration of transgenic cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) through *Agrobacterium*-mediated transformation of embryogenic suspension cultures. *Plant Cell Reports* 17:827-831.

James C. 1998. Global review of commercialized transgenic crops: 1998. ISAAA Briefs no. 8. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications, Ithaca, NY, E.U.

James C. 2000. Preview: Global review of commercialized transgenic crops: 2000. International Service for the Acquisition of Agri-Biotech Applications, Ithaca, NY, E.U. 21 p.

Li H-Q; Sautter C; Potrykus I; Puonti-Kaerlas J. 1996. Genetic transformation of cassava (*Manihot esculenta* Crantz). *Nature Biotechnology* 14(6):736-740.

Lorenzo JC; González BL; Escalona M; Teisson C; Espinosa P; Borroto C. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 54(3):97-200.

Raemakers CJJM; Sofiari E; Taylor NJ; Henshaw GG; Jacobsen E; Visser RGF. 1996. Production of transgenic cassava (*Manihot esculenta* Crantz) plants by particle bombardment using luciferase activity as selection marker. *Molecular Breeding* 2:339-349.

- Sarria R; Torres E; Angel F; Chavarriaga P; Roca WM. 2000. Transgenic plants of cassava (*Manihot esculenta*) with resistance to Basta obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation. Plant Cell Reports 19:339-344.
- Schopke C; Taylor NJ; Carcamo R; Konan NK; Marmey P; Henshaw GG; Beachy RN; Fauquet CM. 1996. Regeneration of cassava plants (*Manihot esculenta* Crantz) from microbombarded embryogenic suspension cultures. Nature Biotechnology 14:731-735.
- Taylor NJ; Edwards M; Kiernan RJ; Davey CDM; Blakesley D; Henshaw GG. 1996. Development of friable embryogenic callus and embryogenic suspension culture systems in cassava (*Manihot esculenta* Crantz). Nature Biotechnology 14:726-730.
- Teisson C; Alvard D. 1994. A new concept of plant *in vitro* cultivation in liquid medium: Temporary immersion. Resumen. En: VIII International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. p. S2-2.
- Teisson C; Alvard D; Berthouly M; Cote F; Escalant JV; Etienne H. 1996. New apparatus for culturing plant tissues by temporary immersion. International Symposium on Plant Production in Closed Ecosystems, Narita, Japón. p. 1-3.
- Thro AM; Roca WM; Restrepo J; Caballero H; Poats S; Escobar R; Mafla G; Hernández C. 1999. Can *in vitro* biology have farm-level impact for small-scale cassava farmers in Latin America? In Vitro Cellular & Development Biology 35:382-387.