

**MONOGRAFÍA SOBRE LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA SILVICULTURA
EN COLOMBIA.**

ALEX ROSERO MUÑOZ.

87455762.

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA.
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE.
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARÍA.
SAN JUAN DE PASTO, 2013.**

**MONOGRAFÍA SOBRE LA BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LA SILVICULTURA
EN COLOMBIA.**

ALEX ROSERO MUÑOZ.

87455762.

**Trabajo de grado monográfico presentado como requisito parcial para optar
al título de Especialista en Biotecnología Agraria.**

Director:

MANUEL FRANCISCO POLANCO PUERTA. I.A. M.Sc.

**UNIVERSIDAD NACIONAL ABIERTA Y A DISTANCIA.
ESCUELA DE CIENCIAS AGRÍCOLAS PECUARIAS Y DEL MEDIO AMBIENTE.
ESPECIALIZACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA AGRARIA.
SAN JUAN DE PASTO, 2013.**

Nota aclaratoria.

La escuela y los jurados no se hacen responsables por los conceptos emitidos por el autor.

Nota de aceptación

Director del trabajo

Firma del jurado

Firma del jurado

San Juan de Pasto, Nariño, ____ de 2013

Dedicada a:

Mi familia.

AGRADECIMIENTOS

El autor expresa sus agradecimientos a:

El profesor Manuel Polanco Puerta, presidente y asesor de este proyecto de grado, quien hizo importantes ayudas a esta investigación.

A los señores jurados, doctor Rafael Urrea y Nelly Méndez, quienes aportando su amplia experiencia, permitieron la evolución de esta monografía.

La doctora Nidia Carreño, líder nacional de postgrados ECAPMA, de la Universidad Nacional Abierta y a Distancia, quien ha estado muy pendiente del trabajo, escuchando sugerencias y reclamos, para finalmente presentar soluciones acertadas en cada caso.

La Universidad Nacional Abierta y a Distancia, por permitirme participar de este proceso interactivo de estudio, sus metodologías de enseñanza y aprendizaje han influido mucho en mi calidad de especialista.

Los muchos grandes autores que han intentado hacer una aproximación del conocimiento de la biotecnología, aplicada al mejoramiento de la producción en la agricultura y especialmente en el desarrollo del sector forestal; sus investigaciones me han permitido acercarme a una realidad que merece atención.

ÍNDICE.

1. INTRODUCCIÓN.	10
2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.	12
2.1 Antecedentes.	12
2.2 Pregunta de investigación.	13
2.3 Justificación.	13
2.4 Objetivos.	14
2.4.1 Objetivo general.	14
2.4.2 Objetivos específicos.	14
3. DESARROLLO.	15
3.1 Principales Técnicas y Herramientas de la Biotecnología Aplicadas al Mejoramiento Genético de Especies Forestales.	15
3.1.1 Definición y Reseña histórica de la biotecnología.	15
3.1.2 Técnicas y Herramientas de la Biotecnología en la silvicultura.	24
3.2 Estado del arte del uso de las Técnicas y Herramientas de la Biotecnología Aplicadas a la Silvicultura.	49
3.2.1 Estudios de caso para la Aplicación de las Técnicas y Herramientas de la Biotecnología en la Silvicultura.	49
3.3 Desarrollo de la Biotecnología en la Silvicultura Colombiana.	62
3.3.1 Producción Forestal en Colombia.	62
3.3.2 Marco de Política y Estrategia.	66
3.3.3 Oportunidades de la Biotecnología en la Silvicultura Colombiana.	71
4. CONCLUSIONES.	76
5. REFERENCIAS.	77

ÍNDICE DE TABLAS.

Tabla 1. Etapas que Marcaron el Desarrollo de la Biotecnología.	17
Tabla 2. Comparación de Marcadores Genéticos Comúnmente Utilizados en Genética Forestal.....	43
Tabla 3. Rendimientos de las Especies Forestales en Colombia.	62
Tabla 4. Principales Industrias de Transformación en el Sector Forestal.	65
Tabla 5. Marco de Políticas, Normativas y Planes para el Uso de la Biotecnología en Colombia.....	70

RESUMEN.

La producción forestal actual no será capaz de satisfacer las demandas de productos arbóreos en las siguientes décadas, porque en Colombia, los recursos forestales están sujetos a procesos de degradación que disminuyen la variabilidad genética y el potencial productivo; muchas áreas de bosque se pierden cada año y la posibilidad de aprovechamiento de los componentes y sus genes; existen dificultades para la implementación de programas de mejoramiento forestal; en la actualidad los sistemas tradicionales de mejoramiento genético se ven limitados por el largo ciclo de desarrollo de los árboles y la dificultad para distinguir entre la expresión genotípica y los efectos ambientales. La biotecnología vegetal es un área de investigación científica que ha registrado rápidos e importantes avances en la forma de propagación, conservación y mejoramiento de especies durante los últimos años, es una ciencia que tiene sólidas raíces científicas, además de ser una tecnología emergente de gran importancia estratégica y económica. El presente documento contiene los principales avances biotecnológicos hechos en silvicultura en varios países, y también un breve recuento a la situación actual del sector forestal en Colombia; esto es para conocer si los avances científicos o la carencia de recursos y de inversiones potenciales en las instituciones de investigación o la inexistencia de una política institucional es lo que no ha permitido el potencial desarrollo del sector forestal del país. El propósito es entender el alcance de la aplicación de la biotecnología en la silvicultura y hacer una discusión de los avances y desarrollo del conocimiento científico del sector forestal, y sobre el impacto de los programas institucionales o empresas en la silvicultura en Colombia; se analizan opiniones a favor y en contra y se llega a conclusiones.

ABSTRACT.

The current forest production won't be able to satisfy the demands of arboreal products in the following decades, because in Colombia, the forest resources are subjected to degradation processes that diminish the genetic variability and the productive potential; many forest areas get lost every year and the possibility of use of the components and their genes; difficulties exist for the implementation of programs of forest improvement; at the present time the traditional systems of genetic improvement are limited by the long cycle of development of the trees and the difficulty to distinguish between the genotypic expression and the environmental effects. The vegetable biotechnology is an area of scientific investigation that has registered rapids and important advances in the propagation form, conservation and improvement of species during the last years, it is a science that has solid scientific roots, besides being an emergent technology of great strategic and economic importance. The present document contains the main advances biotechnical facts in forestry in several countries, and also a brief recount to the current situation of the forest sector in Colombia; this is to know if the scientific advances or the lack of resources and of potential investments in the investigation institutions or the nonexistence of an institutional politics is what has not allowed the potential development of the domestic forest sector. The purpose is to understand the reach of the application of the biotechnology in the forestry and to make a discussion of the advances and development of the scientific knowledge of the forest sector, and on the impact of the institutional programs or companies in the forestry in Colombia; opinions for and against are analyzed and conclusions reached.

1. INTRODUCCIÓN.

En la medida que aumenta la población humana y sus demandas de productos arbóreos, las tierras de bosques disponibles para la extracción maderera disminuyen sustancialmente, por lo que se necesitan esfuerzos combinados para alcanzar la sostenibilidad de dicha extracción; la tendencia mundial, se orienta hacia el establecimiento de plantaciones forestales comerciales para obtener materia prima más homogénea, barata y reducir la presión sobre el bosque natural. La creciente competencia a nivel local e internacional y la necesidad de mejorar los rendimientos y expandir la gama de productos que se ofrece a los clientes, han sido poderosas razones para que numerosos productores forestales comiencen a incorporar la biotecnología como aliada en la proyección de sus negocios.

La biotecnología es el manejo de los sistemas biológicos para el beneficio de la humanidad; la biotecnología tiene relevancia como herramienta de desarrollo, en especial para países que persiguen niveles más elevados de progreso económico e investigativo.

Originalmente el mejoramiento de los árboles se realizaba teniendo en cuenta sólo sus características agronómicas; actualmente se realizan investigaciones relacionadas con la propagación y conservación *in vitro* de especies de importancia forestal y en peligro de extinción, además, se utilizan las técnicas de la biología molecular para estudios filogenéticos, certificación de especies, mejoramiento genético y el aislamiento e identificación de genes relacionados con la defensa y procesos fisiológicos, la obtención de extractos vegetales con propiedades antimicrobianas e insecticidas.

La aplicación de la biotecnología en la reproducción y el mejoramiento de especies forestales son relativamente recientes en Colombia; aunque la implementación de

adecuados programas de mejora y conservación suele ser un desafío de gran envergadura, que requiere disponer de importantes recursos económicos y conocimientos no siempre presentes, es necesario impulsar el conocimiento en áreas estratégicas potenciales para el desarrollo competitivo del país. En este sentido los enfoques cooperativos constituyen una instancia muy adecuada para facilitar la implementación de dichos programas y obtener resultados cuyo impacto alcanzan a un mayor número de actores relacionados con esta materia.

Este trabajo pretende documentar la evidencia existente de los avances en biotecnología aplicados a la silvicultura; se tienen en cuenta los estudios realizados a nivel nacional y mundial, poniendo de manifiesto las tecnologías en mejoramiento genético de árboles, dentro del marco de la necesidad de mejorar la calidad y aumentar la producción de bienes y servicios.

2. DEFINICIÓN DEL PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN.

2.1 Antecedentes.

La silvicultura en Colombia es una industria legítima y reconocida por la ley; sin embargo, se presentan muchos retos que tienen un impacto significativo y a largo plazo en el ambiente, la economía y en la sociedad. El problema no solo es local, a nivel mundial el crecimiento poblacional trajo consigo un aumento de la demanda de productos forestales, y de la mano una disminución de las áreas forestales que a la fecha no suplen la demanda de producción maderera.

El gran desafío del país es establecer políticas claras que apunten a mejorar la disponibilidad de información, de infraestructura y financiación para aprovechar de manera eficiente los productos madereros y contribuir al desarrollo y bienestar de la sociedad. Se hace necesario implementar en Colombia, programas de largo plazo que permitan avances progresivos y se continúen con los esfuerzos iniciales ya emprendidos; además es imperativo consolidar las redes científicas y articular a los actores socioeconómicos para gestionar el conocimiento e impulsar el sector forestal a nivel mundial.

Entre los principales argumentos sobre la importancia de aplicar biotecnología en el sector forestal colombiano se destaca, la necesidad de incrementar las ventajas competitivas frente a competidores directos tales como Chile y Brasil, que han logrado desarrollos significativos en el tema (Torres & Buitrago, 2008); pero la biotecnología en Colombia tiene una marcada tendencia investigativa y científica, y tiene poca conciencia sobre su impacto en la calidad de vida y el desarrollo tecnológico e industrial; se presentan también ciertas dificultades como que, no existen suficientes empresarios biotecnológicos, falta una cultura de alianza y cooperación y existe una organización empresarial del conocimiento deficiente y restringida (Hernández, 2008).

2.2 Pregunta de investigación.

Cuál es el grado de aplicación del conocimiento sobre biotecnología en el sector forestal a nivel nacional, y cuál es el impacto de los programas de biotecnología institucionales o de empresas particulares en la silvicultura de Colombia?

2.3 Justificación.

La silvicultura, tiene vital importancia, porque ayuda a satisfacer las necesidades de madera y otros productos provenientes de los bosques naturales y artificiales, para la población en constante crecimiento, pero, para que Colombia pueda lograr competitividad en el mercado mundial, se debe conocer el nivel de desarrollo tecnológico, políticas y herramientas existentes a escala nacional e internacional; es esta pues la clave para producir y comercializar bienes y servicios a más bajo costo, mejorar la calidad de los productos y minimizar el nivel de contaminación industrial y los efectos ambientales no deseados.

Sin duda la investigación en biotecnología, sus aplicaciones y programas de mejoramiento genético han permitido masificar la producción y aumentar la calidad de variedades no sólo de especies exóticas sino también nativas de alto interés comercial; sin embargo, son los países desarrollados los de mayor actividad en biotecnología forestal, mientras que en Colombia los conocimientos son limitados y esto es causa para que no se logre el potencial deseado.

El éxito o fracaso de la silvicultura del país, depende del soporte tecnológico y político de que se disponga para asegurar la adaptabilidad, productividad y sostenibilidad del recurso forestal; en este contexto se aporta información sobre la normatividad e investigación y su aplicación en la producción forestal en Colombia.

El propósito de este trabajo, es reconocer el nivel de aplicación de la biotecnología en la silvicultura colombiana, con un estudio del estado del arte del uso de las principales técnicas y herramientas biotecnológicas, e intentando hacer una discusión de los avances y desarrollo de la biotecnología en la silvicultura del país.

2.4 Objetivos.

2.4.1 Objetivo general.

Identificar el impacto de los programas institucionales y particulares de biotecnología a la silvicultura en Colombia y prospectiva para el mejoramiento de la producción silvícola.

2.4.2 Objetivos específicos.

- Identificar actores, instituciones, programas y proyectos del sector público y privado que se dedican a la aplicación de la biotecnología en la silvicultura.
- Analizar el impacto de los programas de biotecnología de las instituciones o entidades particulares en la producción silvícola en Colombia.

3. DESARROLLO.

3.1 Principales Técnicas y Herramientas de la Biotecnología Aplicadas al Mejoramiento Genético de Especies Forestales.

3.1.1 Definición y Reseña histórica de la biotecnología.

Según el Convenio sobre la Diversidad Biológica de las Naciones Unidas de 1992, se entiende por biotecnología como toda aplicación tecnológica que utilice sistemas biológicos y organismos vivos o sus derivados para la creación o modificación de productos o procesos, para usos específicos y en beneficio de la humanidad (Vega & Romero, 2006). Consiste en la aplicación de principios científicos y de ingeniería para el procesamiento de materiales por medio de agentes biológicos, principalmente microorganismos, células de animales y plantas, enzimas y material genético aislado y clonado (Roca & Ramírez, 2000).

La biotecnología, es un conjunto de nuevas técnicas que complementan a las metodologías de mejoramiento genético tradicional forestal y avances científicos al servicio del progreso, y constituye una poderosa herramienta para el crecimiento de las naciones, pues de esta dependen los factores de competitividad que se transforman en ventajas comparativas de mucha relevancia (ONUDI, 2004).

Los conjuntos de técnicas de la biotecnología, son aplicables a diversas actividades de la sociedad, cuya base fundamental son disciplinas básicas como la biología celular, la biología molecular, bioquímica, genética, microbiología, inmunología, la ingeniería química y la ingeniería de procesos (Roca & Ramírez, 2000). Según Torres y Buitrago (2008), esta se aprovecha potencialmente en la agricultura, la farmacia, ingeniería de alimentos, ciencias forestales y medicina.

Según Haines (1994), la biotecnología vegetal es una ciencia en donde la investigación científica avanza rápidamente, pues sus beneficios en la silvicultura y la agricultura posibilitan ganar tiempo en los procesos de mejoramiento. Los avances importantes en el cultivo de tejidos vegetales y biología molecular se encuentran en la base del desarrollo de campos como la criopreservación y la regeneración masiva de plantas, los marcadores de ADN, la genómica de árboles y la transformación genética (Martínez y otros, 2003).

La biotecnología algunas veces, ha sido dividida en tradicional y moderna, con el propósito de separar históricamente algunos de los componentes; en ambos casos, la biotecnología no está llamada a sustituir tecnologías convencionales, sino más bien complementarlas (IICA, 1989).

La biotecnología tradicional se refiere al cultivo de vegetales, la domesticación de animales, la transformación de alimentos y el aprovechamiento de las propiedades curativas de las plantas, y que son actividades que se remontan a los albores de la humanidad y que se fueron desarrollando a partir del conocimiento empírico, ignorando la existencia de los microorganismos o de las leyes de la herencia (Muñoz, 2007).

La biotecnología moderna tiene una amplia gama de aplicaciones en la agricultura, ciencia animal, producción de compuestos químicos tales como enzimas, aminoácidos, vitaminas, biopolímeros, sustancias aromáticas, producción de alimentos, etc. En todas estas aplicaciones se requiere el uso intensivo de conocimiento científico (IICA, Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, 1989).

La biotecnología según Corona (2000), se separa en tres etapas: 1) Empírica, que nace con el establecimiento de las sociedades humanas y su necesidad de desarrollar organismos que le permitan mantener asegurada la alimentación, la

industria y lograr su expansión territorial; 2) transición, que se presenta con la intervención de la ciencia y la técnica en el desarrollo de industrias biotecnológicas que contribuyen al desarrollo de los grandes imperios, y 3) biotecnología moderna que se da con la conjunción de dos situaciones relevantes: a) aparición de la biología molecular, que permitió descifrar en los años 50 la estructura del ADN, material genético de los seres vivos y los genes que lo conforman, así como de los mecanismos para traducir la información genética que se localiza en el DNA, en proteínas; b) concientización de que la ciencia es una actividad multidisciplinaria, vislumbrando el éxito para solucionar problemas científicos y sociales.

La tabla N° 1, muestra las diferentes etapas de la biotecnología y las personas que fueron participes en el desarrollo del conocimiento, para poder llegar a una época actual, en donde los avances científicos consolidados dan origen a la biotecnología moderna.

Tabla 1. Etapas que Marcaron el Desarrollo de la Biotecnología.

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
EMPIRICA.	9000 A.C. (paleolítica)	Sociedades humanas primitivas.	Domesticación de plantas y animales, iniciándose el desarrollo de la agricultura, selección artificial.
	6000-4000 A.C.	Sumerios, babilonios, asirios y egipcios.	Bebidas alcohólicas (cerveza y vino), productos fermentados (levaduras y vinagre).
	400 D.C.	Sociedades de china o del medio oriente.	Destilación de bebidas alcohólicas a partir de grano fermentado; productos lácteos (queso y yogurt).
	1200.1521 D.C.	Mexicas (Mesoamérica).	Bebidas alcohólicas (pulque, pozol y tequila), tecuitlatl (alimento elaborado a base de alga <i>Spirulina platensis</i>), cuitlacochin (alimento del hongo <i>Ustilago maydis</i>).

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
TRANSICIÓN.	1680.	Leeuwenhoek.	Invencción del microscopio, descripción de animáculos responsables de grandes eventos en la fermentación.
	1857.	Louis Pasteur.	Establece las bases científicas de la biotecnología. Pasteurización del vino con calor al detectar que el vino contenía microorganismos.
	1860.	Gregor Mendel.	Prueba que la transmisión de los caracteres hereditarios obedece reglas precisas. Nace la idea de los genes.
BIOTECNOLOGÍA MODERNA.	1869.	Miescher.	Aísla el ADN por primera vez.
	1877.	Kühn.	Acuñó el término enzima.
	1920.	Thomas Hunt Morgan.	Demuestra que los genes se hallan en los cromosomas.
	1928.	Alexander Fleming.	Descubrimiento de la penicilina.
	1944.	Avery, McCarty y McLeod.	Proporciona evidencias de que el ADN, porta la información genética hereditaria de una cepa bacteriana a otra.
	1948.	Beadle y Tatum.	Establecen que el papel de los genes es especificar la información necesaria para la producción de proteínas.
	1950.	Wilkins y Franklin.	Estudio sobre las propiedades físicas del ADN por medio de las técnicas de difracción de rayos X. Obtienen las primeras imágenes de un cristal de ADN:
	1952.	Hershey y Chase.	Confirman que el ADN es el material genético.
	1953.	Watson y Crick.	Postulación de la estructura de doble hélice del ADN:
	1957.	Kornberg.	Identifica la DNA polimerasa, enzima que permite la duplicación de la doble hélice del DNA.
	1958.	Steward.	Logra la regeneración completa mediante embriogénesis de una planta zanahoria,

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
BIOTECNOLOGÍA MODERNA.	1961.	Arber.	Desciframiento del código genético. Proporciona la primera evidencia de la existencia de las enzimas de restricción del ADN.
	1962.	Nirenberg, Ochoa y Khorana.	Los genes que confieren a las bacterias resistencia a los antibióticos se encuentran en pequeños cromosomas supernumerarios llamados plásmidos.
	1965.		
	1966.	Khorana y Nirenberg.	Descifran el lenguaje del código genético: la lectura del DNA se produce en grupos de tres bases (tripletas).
	1966-1967.	Berg y colegas.	Elucidan el código genético. Descubre la ADN ligasa, la enzima que une fragmentos de ADN.
	1970.	Khorana.	Sintetiza de forma química el primer gen.
		Smith y Wilcox.	Descubren las enzimas de restricción.
	1972-1973.		Se desarrollan las técnicas de clonación del ADN.
	1973-1974.	Berg.	Produce la primera molécula de ADN recombinante (un plásmido), mediante el corte y posterior unión de dos fragmentos distintos de ADN.
	1975.	Sanger, Maxam y Gilbert	Desarrollan métodos rápidos para secuenciar el ADN.
		Asilomar, California.	Se realiza la primera conferencia sobre la bioseguridad en el uso del DNA recombinante y los organismos genéticamente manipulados.
1977.		Se descubre que no todo el ADN de un gen sirve para la síntesis de una proteína, la cual ocurre sólo en los exones, es decir, las partes no transcritas en el RNA mensajero. Los intrones son eliminados del RNA.	
1978.	La compañía Genetech (EE.UU).	Utiliza bacterias para la producción de insulina humana recombinante, que se comercializa cuatro años después.	

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
BIOTECNOLOGÍA MODERNA.	1982.	Palmiter y Brinster.	Crean el primer animal transgénico, introduciendo la hormona de crecimiento de rata en un ratón.
		La compañía Calgene (EE.UU).	Clona el gen responsable de la resistencia a un herbicida.
		Vanmontagu y Schell.	Producen la primera planta transgénica (tabaco) usando el plásmido Ti del <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .
	1983.	Mullis.	Pone a punto la técnica de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), que permite amplificar (multiplicar) secuencias de ADN.
	1984.	Sanford.	Logra transformar tejidos de plantas mediante el bombardeo de partículas (biolística).
	1985.	Jeffreys.	Descubre que el DNA de cada individuo produce fragmentos característicos al ser tratados con enzimas de restricción. Por lo tanto sirven como huellas dactilares moleculares.
	1985.	EE.UU.	Se aprueba el patentamiento de plantas transgénicas.
	1986.	Transkley.	Crea los primeros mapas genéticos moleculares usando RFLP's.
	1987.	Cetus Corporation (EE.UU).	Automatiza la técnica del PCR:
	1988.	Philip Leder y Timothy Stewart (EE.UU).	Se patenta oficialmente el primer animal transgénico el "oncoratón".
	1990.	Francis Collins (EE.UU).	Se inicia el proyecto del genoma humano con el fin de identificar todos los genes que conforman el DNA del hombre.
1994.	La compañía Calgene (EE.UU).	Recibe la aprobación para comercializar tomates transgénicos de maduración retardada.	

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
BIOTECNOLOGÍA MODERNA.	1995.	EE.UU.	Se desarrollan los primeros secuenciadores automatizados de DNA.
	1996.	Ian Wilmut y Keith Campbell (Edimburgo, Escocia).	Nace la oveja Dolly, la primera oveja clonada: el núcleo de una célula somática de una oveja adulta donante fue introducido en un óvulo enucleado.
		EE.UU.	Se siembran los primeros cultivos comerciales de plantas transgénicas: 3 millones de hectáreas.
	1998.	EE.UU, Canadá, Argentina, China y México.	La siembra de cultivos transgénicos comerciales cubre 30 millones de hectáreas.
		Schena M; Shalon D; Davis R y Brown P.	Se fabrican sistemas automatizados (robots) para la extracción, distribución y plaqueo de muestras de DNA y otras actividades de biología molecular. Se producen los llamados chips de DNA: matrices diminutas de plástico para fijar gran número de muestras de DNA para tamizado y/o lectura de expresión de genes.
	1999.	EE.UU.	Se inicia la nanobiotecnología (miniaturización del análisis, detección y separación de material genético de manera masiva). Se da impulso a la bioinformática: la obtención, acumulación, análisis, comparación e identificación de datos moleculares/genéticos que son utilizados para la identificación de nuevas secuencias y genes.
	2000.	EE.UU, Inglaterra; España.	Se termina la versión del genoma humano; se completa la secuencia de <i>Arabidopsis thaliana</i> .
		Kenia.	Se llevan a cabo pruebas en campo de cultivo (camote resistente al ataque de virus).
		Ingo Potrykus y Peter Beyer.	Creación del arroz dorado (Golden Rice), variedad modificada para producir vitamina A.

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
BIOTECNOLOGÍA MODERNA.	2002	EE.UU.	Presentación del genoma humano por Celera Genomics y el grupo de colaboradores de laboratorios financiados por fundaciones públicas.
		EE.UU.	Obtención de vacuna contra el “cáncer cérvico”, la primera vacuna preventiva para un tipo de cáncer.
		IRGSP (International Rice Genome Sequencing Project)	Se obtiene el genoma del arroz.
		España.	Se obtiene el genoma del parásito que causa la malaria y la especie de mosquito que lo trasmite.
	2003	Japón.	Técnicas de ingeniería genética para café sin cafeína. Se logra clonar por primera vez una especie en peligro de extinción (el banteng) y otras especies como el caballo, venados y mulas.
	2004	España.	Se obtiene el genoma del pollo. Clonación de la primera mascota un gato.
		Richard Gibbs.	Se obtiene el genoma de la rata de laboratorio.
		Varios países.	Genoma del chimpancé, el primate más cercano al hombre.
		Il Keun Kong (Gyeongsang, Korea)	Clonación de la primera mascota un gato con la piel fluorescente.
	2005	Instituto Broad y Universidad de Harvard.	Se logra descifrar el genoma del perro.
		Argentina.	Se logra la clonación de una vaca a partir de células de un animal muerto.

ETAPAS.	AÑO.	PERSONAS O PAÍSES.	EVENTOS.
BIOTECNOLOGÍA MODERNA.	2005.	EE.UU.	Científicos de la universidad de Harvard reportan haber tenido éxito en convertir células de piel en células troncales embrionarias al fusionarlas con células troncales embrionarias existentes.
	2006	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.	Se prueba la primera vacuna fabricada en una planta, esta vacuna veterinaria protege al pollo de la enfermedad de Newcastle.
		España.	Se obtiene el genoma de la abeja.
		EE.UU.	Genoma parcial del Neandertal.
	2007	Criag Venter.	Primer trasplante de un genoma completo de una bacteria a otra.
		EE.UU y Australia.	Se logra obtener el genoma del caballo.
	2009	Varios países.	Representa el catorceavo año de cultivos biotecnológicos en el mundo con 134 millones de hectáreas en ese año y casi 1000 millones de hectáreas acumuladas en todo el mundo.
		España.	Se celebra el doceavo año de cultivo de maíz Bt protegido contra insectos, con 535740 hectáreas acumuladas desde 1998.
	2010	Instituto J. Craig Venter.	Creación del primer organismo sintético, <i>Synthia</i> o <i>Mycoplasma laboratorium</i> .

Adaptado y modificado de: Morris, 1989; Roca & Ramírez, 2000; Beas, Ortuño, & Armendáriz, 2004; Wikipedia, 2013.

Apenas comienza la era de la biotecnología, y se estima que en la primera década del siglo XXI se duplique el valor de sus ventas cada cinco años, con un crecimiento anual cercano al 20%. Si no es posible aumentar el área de tierra cultivable y menguar el ritmo del crecimiento de la población, la agrobiotecnología

se constituye en una solución para producir los alimentos que necesitará la humanidad en el futuro próximo (Roca & Ramírez, 2000).

3.1.2 Técnicas y Herramientas de la Biotecnología en la silvicultura.

La biotecnología abarca una amplia variedad de técnicas, pero las tres áreas principales del sector forestal son: a. El uso de métodos de propagación vegetativa; b. El uso de marcadores genéticos moleculares, que se pueden utilizar para: 1. cuantificar la diversidad genética entre poblaciones y árboles, 2. identificar genotipos en estudios taxonómicos, estudios biológicos y técnicas de dactilación genética, y 3. localizar genes que afectan a rasgos cuantitativos de importancia económica; c. la producción de árboles genéticamente modificados (árboles GM), que hace referencia a aquellas especies en las cuales se ha introducido material genético procedente de otros organismos (Yanchuk, 2002). Estas técnicas tienen un rol imperativo en los programas de mejoramiento de especies forestales, son la base de los estudios de investigación y a partir de ellas se han logrado los avances más notorios de la silvicultura. En Colombia se utilizan todas estas técnicas por parte de instituciones privadas y particulares en universidades, pero los estudios son escasos, incipientes, muy aislados y desconocidos para el público en general para el productor silvícola, por ende no influyen en la silvicultura colombiana.

a. Uso de métodos de propagación vegetativa en especies forestales.

Su propósito es la producción de materiales uniformes a gran escala utilizando la clonación en condiciones de laboratorio (Torres & Buitrago, 2008); se considera una tecnología importante para los países en desarrollo en miras a la producción de material vegetal de calidad y libre de enfermedades (Martínez y otros , 2003); se puede utilizar para la selección de características como la tolerancia a herbicidas, a la sal, a metales y a las bajas temperaturas (ONUDI, 2004).

El método tradicional utiliza la evaluación fenotípica y las relaciones de parentesco como las principales herramientas de selección. A partir de la silvicultura clonal, se puede llevar a cabo selección intra-familiar para transferir la varianza genética total aditiva (proporción de alelos evidentes traspasados de los padres hacia la progenie) y no aditiva, hacia los mejores individuos para propagarlos y plantarlos (Zapata & hasbun, 2011). La habilidad de la herramienta para capturar y transferir las ganancias genéticas (aditivas y no aditivas), permite la multiplicación a gran escala de plantas que exhiben combinaciones específicas de genes o plantas híbridas y de aquellas que no se pueden reproducir por semillas (Ortiz & Koch, 2011).

La propagación vegetativa comprende una amplia variedad de técnicas que permiten la producción clonal a partir de la manipulación de diferentes partes de la planta como: secciones de tallos, hojas, raíces, semillas o incluso cultivos celulares. En el campo forestal se distribuyen en tres categorías: 1. micropropagación, 2. criopreservación y almacenamiento *in vitro*, y 3. la selección *in vitro* (Yanchuk, 2002).

1. Micropropagación de especies forestales.

Consiste en la micropropagación y multiplicación masiva de líneas clonales a partir de muestras pequeñas de algunos tejidos como yemas, raíces o embriones extraídos de las semillas; con la técnica se pueden obtener plantas libres de virus, conservar el germoplasma (Arias, 1994), aportar estabilidad genética y ausencia de mutaciones (Mederos, Plasencia, & Varela, 2002). Se hace posible la propagación de material vegetal durante todo el año con una producción programada y facilitando el control de organismos patógenos; se pueden rescatar especies valiosas en peligro de extinción (Sánchez y otros, 2004).

El cultivo *in vitro* o micropropagación, se fundamenta en las bases científicas de la teoría celular de Schleiden y Schwann, en donde se afirma que células individuales de un organismo tienen la capacidad de vida independiente y en base al concepto Darwiniano de regulación hormonal del crecimiento vegetal (Martínez y otros, 2003). Se necesita que la célula vegetal exprese su totipotencialidad, que es la capacidad regenerativa de las células vegetales, conocidas como células meristemáticas, presentes en los diferentes órganos de la planta (Roca & Ramírez, 2000). En 1995 se presentó evidencia inequívoca de la totipotencialidad de células vegetales completamente aisladas (Smith y Wood, 1998; Citados por: Martínez y otros, 2003). En la práctica no todas las células demuestran ser totipotentes, las que lo han sido, dependen para su desarrollo, de condiciones físicas controladas y de las características ontológicas de cada especie (IICA, 1989).

Para realizar micropropagación, se requiere que el material a cultivar esté aséptico (esterilizado), debido a que en el medio de cultivo pueden crecer microorganismos, principalmente bacterias y hongos, que competirán con el explante. Se utiliza para la desinfección soluciones de hipoclorito de sodio y de calcio, el peróxido de hidrógeno, el nitrato de plata, el cloro comercial, el alcohol a diferentes porcentajes (Villalobos & Thorpe, 1982). Se cultiva en medio nutritivo estéril, que contiene principalmente minerales de macronutrientes y micronutrientes, vitaminas, hormonas (citoquininas y/o auxinas principalmente), azúcar (sacarosa y/o glucosa entre otras), etc. Los medios de cultivo pueden permanecer en estado líquido o bien solidificarse con agar dependiendo del cultivo a realizar (callos, cultivos de células, meristemas, explantos, etc.). Por último el medio se deposita en cámara de incubación o germinadora, con factores ambientales controlados como: luz, temperatura y humedad relativa (Mederos, Plasencia, & Varela, 2002). El enraizamiento y preparación del inóculo para su trasplante al suelo en un medio con menor concentración de sales, se requiere

cambiar el balance hormonal, disminuir citocininas y aumentar las auxinas exógenas (Villalobos & Thorpe, 1982).

Los métodos existentes para la micropropagación son: 1) la multiplicación por meristemos, que consiste en cultivar en un medio de citocinina ápices del árbol; no es aplicable en coníferas, debido a que la dominancia apical evita el desarrollo de los brotes laterales. 2) la multiplicación por brotes adventicios, que es el sistema más extendido en especies forestales, pues existe una alta frecuencia de estos brotes en las hojas, tallos, raíces y debido a la capacidad regenerativa de las células vegetales. 3) la multiplicación por callos o células en suspensión; es posible regenerar una planta a partir de pequeñas aglomeraciones celulares; este método ha tenido éxito en especies como eucaliptus, pero no se ha desarrollado con éxito en coníferas (Arias, 1994).

Algunas de las ventajas de la micropropagación son: 1) Se obtienen plantas libres de virus, a partir del cultivo de meristemos; 2) Plantas clonadas idénticas se producen en corto tiempo y de forma masiva; 3) Se puede ampliar la base genética de una especie; 4) En cualquier época del año se pueden propagar los clones; 5) Se reduce el costo de mantenimiento en comparación a las condiciones de campo, pues se evitan las pérdidas por heladas, sequías prolongadas, granizadas o temperaturas elevadas, o por posibles daños sanitarios; 6) por asepsia se mantienen las plantas libres de plagas y enfermedades; 7) se permite someter a la plántula a pruebas de resistencia a factores de salinidad, temperaturas bajas (heladas) o temperaturas altas propias de las condiciones tropicales. Existen algunas desventajas de la técnica de micropropagación: 1) Los químicos que se utilizan para la preparación de los medios de cultivo son costosos y poco disponibles en nuestro medio; 2) se necesita infraestructura y equipos costosos; 3) no se deben ubicar laboratorios para el cultivo *in vitro*, donde el fluido eléctrico presenta interrupciones o no existe; 4) la información literaria sobre los cultivos *in vitro* de especies forestales es escasa; 5) Se necesita

personal capacitado y especializado: biólogos, químicos fisiólogos, fitomejoradores, agrónomos y forestales (Gonzalos & Vilca, 1998).

Esta será una técnica muy valiosa en la propagación de especies arbóreas en el país, si se logran evitar algunos problemas como son: la variación genética en las respuestas de regeneración y el proceso de maduración; estos dos problemas dificultan considerablemente la ejecución de sistemas prácticos de propagación de fenotipos seleccionados. Entre otros problemas están, la formación de órganos y plantas aberrantes, la dificultad para erradicar las infecciones internas, y la secreción de sustancias tóxicas como fenoles y sustancias volátiles (Villalobos & Thorpe, 1982). Más programas de investigación son requeridos; existe poca motivación por el uso de la técnica debido a que resulta costosa. En Colombia hay protocolos para micropropagación y estudios para diversas especies forestales, pero son escasas las entidades que se dediquen a la propagación comercial.

2. Criopreservación y almacenamiento in vitro de especies forestales.

La finalidad del almacenaje *ex situ* para conservar especies leñosas es mantener la calidad genética y fisiológica inicial del germoplasma, hasta que se utiliza o regenera; lograrlo requiere manejar los factores genéticos y ambientales que afectan al germoplasma almacenado (FAO, FLD & IPGRI, 2004). Así como el cultivo de tejidos el desarrollo de las técnicas de almacenamiento *in vitro* y la crioconservación a temperaturas criogénicas de germoplasma, pueden ser una estrategia viable en cuanto a la conservación de los recursos fitogenéticos de un gran número de especies forestales (Campos & Seguel, 1999). Los cultivos *in vitro* se pueden conservar a corto plazo (1 (una) semana a 2 (dos) meses) y a mediano plazo 2 (dos) meses a 2 (dos) años), manipulando las condiciones de crecimiento (Vargas, Bermejo, & Thomas, 2004).

El término criopreservación se refiere al almacenamiento de semillas a temperaturas extremadamente bajas (-196 °C) y generalmente en nitrógeno líquido (FAO, FLD & IPGRI, 2004). El almacenamiento *in vitro*, comprende el mantenimiento de células, tejidos u órganos en cultivos, en los cuales se reduce la velocidad de crecimiento disminuyendo la luz, la temperatura y los nutrientes o se suspende el crecimiento mediante inmersión en nitrógeno líquido (Haines, 1994). Empleando esta técnica, muestras pequeñas de tejidos se pueden mantener a temperaturas muy frías conservando sus condiciones fisiológicas iniciales. Por esta razón uno de los principales objetivos de la criopreservación, es la evaluación de genotipos para que la producción del material vegetal sea eficiente (Yanchuk, 2002).

Una exitosa criopreservación depende de factores como tipo y condición fisiológica del explante, crioprotectores empleados, temperatura y mantención y estrategia de recuperación de los tejidos entre otras. Los tejidos más apropiados para criopreservar son: granos de polen, semillas, yemas invernales, meristemos, embriones y callos (Campos & Seguel, 1999).

Las estrategias de control de cambio de fase, para desarrollar la denominada forestación clonal de alto valor –High value clonal forestry- es la aplicación actual más importante en especies forestales de la crioconservación; esta se debe a dos factores: 1) al hecho de que, en la gran mayoría de especies forestales, el cambio de fase entre las condiciones de juvenilidad y madurez limita gravemente las capacidades morfogénicas, llegando a hacer casi imposible la propagación vegetativa de árboles adultos; 2) las malas correlaciones entre caracteres de interés en estados juvenil y adulto impide la selección precoz (Martínez y otros, 2003).

La criopreservación presenta algunas dificultades, especialmente en la regeneración posterior de las plantas procedentes de los cultivos crioconservados,

pero se confía en que las tecnologías de conservación en germoplasma puedan tener diversas aplicaciones en el mejoramiento y conservación de las especies forestales (Haines, 1994).

- Almacenamiento de semillas.

Las semillas se dividen en dos (2) grandes grupos con relación a las posibilidades de deterioro y almacenamiento: en el primer grupo se incluyen todas aquellas semillas que se disecan naturalmente en la planta madre y se llaman semillas ortodoxas; las ortodoxas puede secarse a bajo contenido de humedad sin dañarse, y entre más bajo el contenido de humedad y temperatura sobrevivirá por más tiempo; la longevidad de esta clase de semilla se mide usualmente por décadas o más, bajo condiciones óptimas; y al segundo grupo de semillas se denomina recalcitrantes; este grupo tiene la característica de que las semillas mueren si se secan por debajo de ciertos límites, y la supervivencia se limita a pocas semanas o meses; son semillas difíciles de almacenar y se incluyen aquí semillas carnosas grandes de especies forestales y que maduran en la estación lluviosa (Jara, 1997).

La experiencia dice que, el periodo medio de viabilidad se dobla cada vez que la temperatura media de almacenamiento desciende 5°C, a partir de las temperaturas más altas encontradas durante el secado de especies ortodoxas (aprox. 50°) hasta 0°C. Se puede afirmar además que el contenido de aceite no parece afectar la respuesta a un cambio en la temperatura (Jara, 1997).

Para la conservación de semillas ortodoxas se puede utilizar una combinación de desecantes, con un bajo contenido de humedad (5% o menos), y su almacenamiento se realizará en envases sellados a temperaturas bajo cero (-150 a -196C); por el contrario las semillas que son recalcitrantes se pueden preservar disecando embriones extirpados a bajos contenidos de humedad (15-20% del

peso fresco), esterilizándolos y almacenándolos bajo condiciones de criopreservación (Vargas, Bermejo, & Thomas, 2004); se presenta el caso de que si estas semillas se desprenden con un contenido de humedad relativamente elevado (≥ 40 a 50% de peso fresco) son incapaces de soportar la desecación y con frecuencia son sensibles al frío (FAO, FLD & IPGRI, 2004).

Se han identificado especies que presentan en sus semillas comportamientos de almacenaje intermedio. Son semillas que toleran un mayor grado de desecación que las semillas recalcitrantes pero que son menos tolerantes a la desecación que las semillas ortodoxas; además, ocurre que las semillas intermedias pueden ser sensibles al frío. Incluidas en la categoría intermedia, hay algunas especies económicamente importantes como el café, los cítricos, el árbol del caucho, la palma de aceite y muchas especies de árboles forestales tropicales (FAO, FLD & IPGRI, 2004).

- Almacenaje de polen.

Es una técnica que se compara al almacenaje de semilla, puesto que la mayoría de polen puede secarse hasta menos del 5% de contenido de humedad, sobre la base de peso seco, y almacenarse por debajo de 0°C (FAO, FLD & IPGRI, 2004). Generalmente, a medida que se extiende el período de almacenamiento, la temperatura utilizada para su almacenamiento disminuye (Tighe, 2004).

El polen tolerante a la desecación se almacena mejor a niveles de humedad de $\leq 10\%$, que se obtiene por secado al aire libre o por el equilibrio de la humedad relativa. Longevidades mayores ocurren a bajas temperaturas de almacenamiento, con más de dos años a menudo factible con -18°C . El almacenamiento criogénico a -80°C hasta -196°C , aumenta en gran medida la longevidad. El almacenamiento al vacío o con una atmósfera de N_2 también mejora la longevidad. El almacenamiento de polen sensible a la desecación es más problemático, pero

alguno puede ser desecado entre el 10 al 15%. Reportes de almacenamiento a 4°C (39°F) y -20°C (-4°F) son escasos, y las longevidades esperadas son cortas, de horas a unos pocos días. Si el polen no es secado demasiado, el almacenamiento criogénico es posible (Walters & Towill, 1995).

El polen de muchas especies ha sido almacenado exitosamente por criopreservación, que puede ser realizada por medio de Ultrafreezers que almacenan el polen a los -80°C y los refrigerados criogénicos que usan inmersión bajo nitrógeno líquido a los -196°C (Tighe, 2004).

- Almacenaje de ADN.

El ADN procedente del núcleo, el mitocondrio y los cloroplastos se extrae en la actualidad de forma rutinaria y se inmoviliza entre hojas de nitrocelulosa donde se puede analizar con numerosos genes clonados. Con el desarrollo de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), es posible actualmente amplificar de forma rutinaria oligonucleótidos específicos o genes de la mezcla completa del ADN genómico; esta es una técnica eficaz, sencilla y ocupa poco espacio. Existen requerimientos como que, exige capacidad de equipos, además de los problemas con el subsiguiente aislamiento, clonación y transferencia de los genes. El problema indudable es que no permite recuperar los genotipos originales ni reconstruir las plantas completas directamente del ADN (FAO, FLD & IPGRI, 2004). Para lograr la regeneración completa, primero es necesario introducir artificialmente, mediante la transformación o la transducción de plásmidos o liposomas, el material genético en las células somáticas, que entonces se pueden cultivar *in vitro* para producir plantas completas (Vicente & Andersson, 2006).

El ADN que se conserva en un banco: 1) Se almacena dentro de células para después extraerlo cuando se saca del almacenamiento, o 2) se extrae de las células y se purifica antes de almacenarlo. La calidad del ADN se expresa en

términos de rendimiento, pureza, peso molecular, eficiencia de amplificación y autenticidad de las secuencias. Un secado rápido de las muestras vegetales con gel de sílice o mediante la liofilización ayuda a conservar el ADN. También es posible congelar las muestras, pero en ese caso, el ADN debe ser extraído inmediatamente después de que las muestras son sacadas del congelador, utilizando protocolos que inhiben la actividad de la nucleasa. Una vez extraído el ADN es una biomolécula estable, aunque se puede degradar fácilmente con la extracción y el almacenamiento; su calidad disminuye en pocos días en muestras hidratadas que son mantenidas a temperatura ambiente o en un refrigerador. La muestra se debe almacenar preferiblemente en un congelador o en nitrógeno líquido, para conservar mejor el tamaño molecular del ADN; es posible que el ADN pueda permanecer estable durante varios años o varias décadas así almacenado, aunque el tamaño global del fragmento de ADN purificado y disuelto en solución amortiguadora disminuye con el tiempo; la utilidad del espécimen para los ensayos con la PCR puede prolongarse 1 o 2 años si se almacena a 4°C, entre 4 y 7 años si se almacena a -18°C y más de 4 años si se le almacena a -80°C (Vicente & Andersson, 2006).

3. Selección y Mejoramiento in vitro de Especies Forestales.

Algunas especies forestales presentan crecimiento muy lento, bajas tasas de reproducción asexual y reproducción sexual limitada por problemas de polinización y viabilidad de las semillas, estos factores hacen que estas especies sean difíciles de multiplicar masivamente por métodos convencionales; además, se limitan las posibilidades de mejoramiento de las especies cultivadas. Una alternativa prometedora para la resolución de estos problemas es la aplicación de la micropropagación o cultivo *in vitro*, que es una herramienta derivada de la biotecnología vegetal (Dominguez, y otros, 2008).

Las especies forestales se seleccionan para ser introducidas *in vitro* según el siguiente criterio: especies que tienen problemas de regeneración *in vivo*, es decir un bajo porcentaje de germinación; especies en que las plantas de uno de los sexos tiene valor comercial; especies difíciles de propagar especies a las que se le quiere aplicar la técnica de ingeniería genética y especies que al micropropagarlas adquieren alguna característica que las hace incrementar su valor comercial (Estopá, 2005).

La técnica de selección *in vitro*, es un requisito básico en el proceso de clasificación de líneas clonales transformadas con éxito; se pueden combinar caracteres con los criterios básicos de selección *in vitro* que ayudarían a identificar líneas clonales útiles (Yanchuk, 2002). En la técnica de selección a nivel celular, se parte de un grupo de células llamado callo, el cual una vez demostrada su resistencia a ciertos factores, se cambia del medio para permitir el desarrollo de embriones somáticos que serán el origen de plantas con resistencia al factor limitante. Este tipo de selección de materiales con por ejemplo, posible resistencia a factores bióticos o abióticos, puede realizarse tanto a nivel celular como a nivel de órganos jóvenes. En cuanto que la selección a nivel de embriones inmaduros permite una eliminación de los no resistentes y los resistentes se cambian a un medio propicio o directamente a tierra para su desarrollo (Azpíroz, 1994).

La variabilidad inducida durante los cultivos celulares o de callos ha sido reportada para muchas especies; esta variación somaclonal que se conoce como mutación (Haines, 1994), puede aparecer cuando se utiliza técnicas de cultivo *in vitro* como medio de propagación vegetativa, sobre todo cuando se siguen vías adventicias a través de callos (Martínez y otros, 2003); en algunas especies de plantas, se han producido variantes que muestran rasgos aprovechables económicamente, como son la resistencia a enfermedades y resistencia a la salinidad (Haines, 1994). Es necesario decir que se pueden evitar estas posibles mutaciones, y conservar la

integridad y la función en el cultivo *in vitro*, a partir del mantenimiento de la organización celular propia de los órganos (Estopá, 2005),

Para revelar esta posible variación a nivel genético se han usado tanto marcadores tipo RAPD (Amplificación Aleatoria de ADN Polimórfico), en *Picea abies* y *Quercus suber*, como tipo AFLP (Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados) en *Carya illinoensis*. 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 (Martínez y otros, 2003).

b. Uso de marcadores genéticos moleculares en la silvicultura.

Según Nuez y Carrillo (2000), citados por: González (2008), los marcadores moleculares son cualquier gen cuya expresión permite cuantificarse y observarse porque produce un efecto fácilmente detectable. Los marcadores genéticos se transmiten según Mendel a partir de las leyes básicas de la herencia, es así como no todos los marcadores moleculares se consideran marcadores genéticos.

González (2008), afirma que los marcadores genéticos son regiones del ADN que en su secuencia presenta alguna variación sin que se aprecien cambios sustanciales en las funciones del organismo; debido a estas características, se consideran herramientas útiles que sirven para la identificación de especies, cepas, híbridos, análisis de diversidad, recursos genéticos, determinación de paternidad, mapeo genómico con aplicación a genética de poblaciones, biología evolutiva, ecología molecular o la genética de la conservación.

La expresión fenotípica de un marcador genético, es reconocible y puede ser utilizada para identificar a un individuo o una célula que contiene un determinado genotipo; con los marcadores genéticos se detectan variaciones directas a nivel del ADN, se identifican individuos dominantes y codominantes y no están sujetos al ambiente en donde se desarrollan los organismos en estudio (Araya y otros, 2005).

Los genes marcadores tienen algunos atributos que los hacen ideales: 1) polimorfismo; 2) herencia mendeliana y no epistasia; 3) no son sensibles y no son influenciados por los efectos ambientales; 4) no afectan el desarrollo de la planta, es decir se comportan como un gen neutro; 5) facilidad en la expresión, y simplicidad en la identificación y análisis; 6) codominancia; y 7) posibilidad de detección en las primeras fases de desarrollo de la planta (Moreno, 2007).

Las isoenzimas y los RFLP's (Polimorfismo de Longitud de los Fragmentos de Restricción), son los que más se acercan a los atributos ideales de un buen gen marcador. Las isoenzimas presentan el inconveniente de que su número es limitado, y no tienen una presencia lo suficientemente densa en todas las regiones del genoma. Los RFLP's son buenos marcadores moleculares y permiten una densidad de mapeo alta en todo el genoma, pero en el laboratorio su análisis es costoso y de manera regular requieren isótopos radiactivos para su resolución; actualmente se están haciendo avances en la reducción de costos y en nuevas técnicas de fluorescencia que pueden sustituir a los isótopos radiactivos. También los RAPD's (Amplificación Aleatoria del ADN Polimórfico), se pueden utilizar como genes marcadores, debido a que son muy fáciles de analizar; después de la extracción del DNA solo necesitan de 4-6 horas para amplificación y separación electroforética y al igual que los RFLP's pueden cubrir densamente el genoma; presentan el inconveniente de que no poseen el atributo de codominancia, por lo que no es posible distinguir el genotipo homocigótico dominante del heterocigótico;

esta distinción es necesaria en el momento de realizar la separación de individuos en la generación F2 (Moreno, 2007).

Los marcadores moleculares son utilizados potencialmente para estimar la distancia de la diversidad genética y selección de progenitores en aplicaciones filogenéticas y evolutivas o también en programas de mejoramiento y en conservación de germoplasma; se utiliza además para la caracterización de variedades, líneas o híbridos y organismos genéticamente mejorados; en la protección de derechos intelectuales de los mejoradores, inclusive se pueden usar como prueba legal en procesos jurídicos (Torres & Buitrago, 2008).

Es posible el uso de los marcadores moleculares para realizar la asignación de líneas puras a grupos heteróticos con objeto de predecir las características de los híbridos resultantes en los cruces; para localizar e identificar genes cualitativos o mayores y también genes con efectos pequeños que afectan a los así llamados locus de un carácter cuantitativo QTL's (Moreno, 2007).

Importantes han sido los avances en investigación en las técnicas de la genética molecular, que resulta de gran ayuda en los programas de mejoramiento de las especies forestales. Pero son técnicas que requieren un alto grado de especialización, infraestructura moderna y son costosas, por ello no se han logrado explorar significativamente en Colombia. Se necesita mayor participación institucional y del gobierno para impulsar los estudios en este campo.

En términos generales existen dos tipos de marcadores moleculares: marcadores bioquímicos y marcadores de ADN (González, 2008).

1. Marcadores Moleculares Bioquímicos.

Estos pueden ser compuestos orgánicos de los seres vivos (por ejemplo, terpenos, alcaloides, etc.), además también pueden ser proteínas (isoenzimas), estas son las más ampliamente utilizadas al momento de estudiar las especies forestales. Los marcadores bioquímicos examinan los productos de los genes; este análisis puede complicarse por efectos de la expresión génica, epistasis (interacción con otros genes) y redundancia del código genético (Araya y otros, 2005).

Las isoenzimas pueden ser utilizadas como efectivos marcadores de la variación bioquímica, pues son de fácil detección y su variación puede ser asociada con diferencias genéticas (Scandalios, 1974; Citado por: Faloci y otros, 2000).

Las isoenzimas son las proteínas más ampliamente usadas como marcadores moleculares; las isoenzimas son variantes de una misma enzima, que comparten un sustrato en común pero difieren en su movilidad electroforética. Están incluidos todos los polímeros de subunidades producidos por diferentes loci o por alelos diferentes en el mismo locus. El análisis se realiza extrayendo la enzima de tejidos de plantas separando las variantes con electroforesis y visualizándolas mediante la tinción del gel con colorantes específicos. Entre las variantes enzimáticas frecuentemente empleadas se mencionan; malato deshidrogenasa, fosfoglucomatasa, glutamato oxaloacetato transaminasa, shikimato deshidrogenasa y peroxidasas (Azofeifa, 2006).

2. Marcadores de ADN.

Estos son porciones específicas de ADN formadas de secuencias cortas que se repiten. Son efectivos para fines de caracterización ya que el número de repeticiones en estos marcadores es altamente variable (González, 2008).

Según Karp (1997), citado por: Azofeifa (2006), en este grupo se incluyen tres categorías: la primera trata sobre aquellos métodos que no se basan en la PCR (Reacción en cadena de la polimerasa), por ejemplo VNTRs (Número variable de repeticiones en tándem) y RFLP; la segunda categoría abarca las técnicas que utilizan iniciadores (Primer's) arbitrarios o semiarbitrarios, como iniciadores PCR múltiples arbitrarios (MAAP), RAPD, RAMPO (Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites); en la tercera categoría se encuentra la PCR con sitio objetivo específico, por ejemplo: SSR (Secuencias simples repetidas), ISSR (Inter secuencias simples repetidas). Los marcadores basados en la PCR, corresponde a las categorías 2 y 3.

A continuación se presenta la definición de las técnicas de marcadores de ADN, que más se utilizan en los estudios con especies forestales.

- RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción).

Los RFLPs se conocen como la variación de los fragmentos de ADN producida por una endonucleasa de restricción específica a partir de ADN genómico de dos o más individuos de una especie; (Azofeifa, 2006). Las mutaciones puntuales, inserciones, deleciones, o rearrreglos en el genoma que se debe a translocaciones o inversiones, producen ausencia o presencia de sitios de reconocimiento para una determinada enzima (Roca & Ramírez, 2000).

Aunque los RFLPs han sido muy utilizados en la mejora y caracterización de plantas y árboles frutales, existe la limitación de que en la identificación de genotipos revelan un pequeño polimorfismo en comparación con la complejidad de su uso. Pero según Roca y Ramírez (2000), existen ventajas atractivas y útiles para los programas de mejoramiento, entre estas ventajas tenemos: no presentan efectos pleiotrópicos o epistáticos, el número de RFLPs es ilimitado, la herencia de los fragmentos es mendeliana y estable, y son codominantes. Además los RFLPs

se pueden analizar en todos los tejidos y a cualquier edad fisiológica del organismo; las muestras de ADN pueden ser almacenadas por largos periodos de tiempo; se pueden obtener un número ilimitado de combinaciones enzimas/sondas; los genes heterólogos pueden ser usados como sondas y se pueden analizar varios loci con una sonda.

- PCR (Reacción en cadena de la polimerasa).

La técnica de PCR, es un método para la multiplicación *in vitro* de fragmentos o secuencias específicas de ADN, con la finalidad de detectar una secuencia o gen conocido o desconocido en el genoma del individuo en estudio. Se utilizan secuencias de nucleótidos denominadas primers (cebadores), que son capaces de reconocer una secuencia blanco para la cual el cebador es complementario; los cebadores delimitan la región o fragmentos de interés en el ADN que se va a amplificar o multiplicar (González, 2008).

Esta técnica implica una serie de ciclos repetitivos, denominados ciclos térmicos e involucran la desnaturalización del ADN, la unión del iniciador a la cadena desnaturalizada y la síntesis, a partir del iniciador, de una doble cadena mediante la acción de la polimerasa; lo anterior resulta en una acumulación exponencial de un fragmento específico de ADN (Azofeifa, 2006).

- RAPD (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico).

Los RAPD, corresponden a la amplificación simultánea de varios loci anónimos en el genoma utilizando primers (iniciadores u oligonucleótidos) de secuencia arbitraria; permiten detectar el gran polimorfismo de ADN distribuido por el genoma del organismo; son ampliamente empleados en análisis genómicos de individuos y poblaciones, ya que permiten detectar un mayor porcentaje de loci polimórficos que las aloenzimas. La técnica no exige preparación previa del tejido

y es adaptable a varios tipos de tejido; se puede acoplar fácilmente a la variación en las cantidades de tejido en ordenes de miligramos a gramos de tejido fresco (Nieto, Ramos, & Motte, 2005). Los RAPD además brindan resultados confiables y reproducibles en los estudios de la variación genética de las especies (Faloci y otros, 2000).

Para esta técnica no se requiere información de la secuencia de ADN; se necesita poca cantidad de ADN genómico y el protocolo es relativamente rápido y fácil de realizar y no usa radiactividad. Aunque también se presentan algunas desventajas con el uso de los RAPD como que los perfiles de amplificación pueden variar de un laboratorio a otro puesto que existen diferencias en los termocicladores utilizados; otra desventaja o limitación es que los RAPD por ser marcadores dominantes, presentan la dificultad de discriminar directamente los genotipos homocigotos (Roca & Ramírez, 2000).

- AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados).

Esta técnica combina la digestión con enzimas de restricción propia de los RFLP, y la PCR, usada para otros muchos marcadores (Marulanda y otros, 2006); son en general dominantes y altamente reproducibles. Permiten el análisis de un gran número de loci por experimento sin la necesidad de información previa sobre la secuencia; presenta la desventaja de que es mas difícil de utilizar que la técnica de los RAPD y el SSR, y requieren una cantidad mayor de ADN (Azofeifa, 2006). Permite determinar la presencia de un fragmento de ADN dentro del genoma, a partir de una matriz binomial (0/1), en donde cero significa ausencia y el 1 presencia (Araya y otros, 2005). Los AFLP parten de la amplificación vía PCR de dos fragmentos de ADN, que han sido digeridos previamente por dos enzimas de restricción y ligados a dos adaptadores específicos a las enzimas utilizadas. Dos cebadores complementarios a los adaptadores permiten una amplificación consistente (Marulanda y otros, 2006).

- Microsatélites o SSR (Secuencias simples repetidas).

Son secuencias consecutivas de nucleótidos (1 – 6 bases nucleotídicas), con una amplia ocurrencia, repetidas en serie hasta 50 veces y se encuentran en distintas partes del ADN presentando loci genéticos altamente polimórficos (Martínez, 2007).

Los microsatélites ofrecen ventajas como: a) su alto polimorfismo es altamente informativo; b) Permiten diferenciar individuos homocigotos y heterocigotos, puesto que son codominantes; c) están menos dispersos a través del genoma; d) se puede automatizar la técnica, e) Se dispone de una buena colección de diversos microsatélites, de los cuales algunos ocurren en alto número de copias (Roca y Ramírez, 2000).

La técnica presenta una gran desventaja, debido a que antes de ser utilizado por vez primera, se deben detectar, secuenciadas y definidas las regiones microsatélites, lo que se ve reflejado en el incremento de los costes y el tiempo. Además se asume costos considerables en infraestructura y se requiere de un gran presupuesto (González, 2008).

En la tabla N° 2, se muestran los diferentes tipos de marcadores moleculares, y sus diferencias en el análisis de distintas variables, por ejemplo: Isoenzimas, RFLP (Polimorfismo de la longitud de los fragmentos de restricción), SSR (Microsatélites o secuencias simples repetidas), RAPD (Amplificación aleatoria del ADN polimórfico), y AFLP (Polimorfismo en la longitud de los fragmentos amplificados).

Tabla 2. Comparación de Marcadores Genéticos Comúnmente Utilizados en Genética Forestal.

Variables Generales.					
	Isoenzimas	RFLP	SSR	RAPD	AFLP
Número de fragmentos obtenido.	1-10.	100s.	10s.	100s.	1000s.
Grado de polimorfismo.	Bajo a moderado.	Moderado a alto.	Muy alto.	Moderado a alto.	Moderado a alto.
Dominancia.	Codominante	Codominante	Codominante	Dominante.	Dominante.
Transferencia de los fragmentos obtenidos.	Entre familias.	Entre géneros relacionados.	Dentro de subgéneros.	Dentro de especies.	Dentro de especies.
Reproducibilidad.	Muy alta.	Muy alta.	Alta.	Baja a medio.	Media a alta.
Facilidad de ensayar.	Fácil.	Difícil.	Fácil a moderado.	Fácil a moderado.	Moderadamente difícil.
Costos.					
Equipos.	Medio.	Alto.	Medio.	Medio.	Medio.
Desarrollo.	Bajo.	Alto.	Muy alto.	Moderado.	Alto.
Ensayo o aplicación.	Bajo.	Alto.	Medio.	Medio.	Medio.

Adaptada de: Araya y otros, 2005.

c. Producción de Árboles Genéticamente Modificados.

El sector forestal difiere de los sectores agrícola y ganadero en algunos aspectos importantes, a saber: los árboles forestales son heterocigóticos perennes de vida muy larga, con una maduración sexual tardía y un ciclo de regeneración prolongado; además, la mayoría de especies forestales tienen una adaptación regional restringida y son fundamentales en los ecosistemas dinámicos (FAO, 2010). Los árboles pueden tardar entre 10 a 25 años para que puedan ser productivos y expresen todas sus características; resulta fácil comprender que

para cada ciclo de mejoramiento genético se requieran muchos años (Daparo, 2005); en este contexto, la biotecnología se convierte en una herramienta útil para el mejorador, ya que permite capturar y transferir rápidamente las ganancias genéticas (Ortiz & Koch, 2011).

En la últimas cinco décadas se comprobó que los árboles tienen la capacidad de transferir características a su descendencia; esta capacidad está ligada a la variabilidad que en conjunto presenten las poblaciones de especies. La variabilidad se constituye en el acervo fundamental del recurso genético de las especies y sus poblaciones, y que al ser reconocida y evaluada, se puede manipular para obtener homogeneización y heterogeneización en poblaciones naturales e inducidas para asegurar nuevos esquemas de adaptación y fuerza evolutiva natural (Alba, Hernández, & Márquez, 2008). Además de obtener ganancias a corto plazo, las estrategias de mejoramiento genético, también deben asegurar y conservar una amplia variedad genética con el objeto de disponer de una fuente de genes para satisfacer las necesidades futuras de los programas de mejora (Gutiérrez y otros, 2003).

Los genetistas y mejoradores de especies forestales utilizan material genético o germoplasma de árboles, para mejorar la calidad y cantidad de productos forestales; seleccionan y mejoran los rasgos deseables como la rapidez de crecimiento, calidad de madera, la resistencia a enfermedades, la sequía, el frío, la contaminación y otras condiciones ambientales adversas. La tendencia actual se orienta al establecimiento de plantaciones forestales comerciales Genéticamente Modificadas (GM), para obtener materia prima más homogénea, barata y reducir la presión sobre el bosque natural (Torres & Buitrago, 2008).

La investigación sobre mejoramiento de especies arbóreas se divide esencialmente 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 (Martínez y otros, 2003); y la investigación estratégica, cuya finalidad es elaborar métodos mejorados de selección (Haines, 1994).

Para alguna característica puede no encontrarse la variabilidad deseada; en estos casos los cruzamientos inter-específicos o los métodos no tradicionales de mejora tales como la introducción de genes mediante la ingeniería genética o la generación de variabilidad mediante mutagénesis pueden resultar de gran interés, aunque es posible que se presenten mutaciones no deseadas o perjudiciales, puesto que no hay control en la expresión genotípica (Gutiérrez y otros, 2003).

Existe en la actualidad, un aumento continuo en las superficies de plantaciones establecidas mejoradas genéticamente, para abastecer la industria y para enfrentar el bajo rendimiento de los bosques naturales debido a la deforestación (especialmente en los trópicos y subtrópicos), o la suspensión del abastecimiento proveniente de los bosques naturales que se han destinado a la conservación de la biodiversidad (Palmberg, 1998).

Para el año 1994 ya existían aproximadamente 100 millones de hectáreas plantadas a nivel mundial con especies forestales industriales, mejoradas su mayoría a partir de la selección recurrente. En el caso de *Eucalyptus grandis* se había concluido la selección de cuatro generaciones y tres en algunas especies de *Pinus*. Los procesos biológicos reproductivos, así como los patrones de variabilidad están documentados para las especies industriales más conocidas (Haines, 1994).

El álamo es un árbol ideal para los estudios de genética forestal y biotecnología; es la primera especie arbórea forestal para la que se determinó la secuencia completa del genoma en el año 2004, trabajo que fue realizado por Oak Ridge National Laboratory; ha sido el segundo género arbóreo más usado en los

estudios de biotecnología y en la modificación genética en todo el mundo. En China para el año 2002 se habían sembrado más de 1,4 millones de álamos (*Populus*), resistente al ataque de insectos (Marchadier & Sigaud, 2005).

Durante las últimas décadas, las tecnologías de propagación vegetativa han experimentado un intenso desarrollo; aunque aún persisten barreras biológicas y el elevado costo que tienen las plantas clonadas en relación con las producidas por semilla, por efecto de la manipulación e infraestructura requerida (Ortiz & Koch, 2011). Sin embargo, la propagación vegetativa *in vitro*, es actualmente pionera en una gran industria comercial, en la que participan cientos de laboratorios alrededor del mundo (Ruane & Zimmermann, 2003). La técnica de selección *in vitro* resulta ser interesante en programas forestales orientados a evaluar la resistencia a enfermedades y la tolerancia a la sal, las heladas y la sequía (Haines, 1994).

Ahora bien, la estrecha relación entre el mejoramiento y la conservación genética toma día a día más relevancia, por lo tanto todos los intentos de preservación, ya sea de poblaciones nativas o de poblaciones de mejora son indispensables, debido a que la información genética almacenada en el germoplasma vegetal constituye un recurso imprescindible para la solución de problemas en los programas de producción forestal actuales y futuros (Trujillo, 2006).

Las técnicas basadas en el cultivo *in vitro*, están haciendo usadas para la conservación *ex situ* y el intercambio de germoplasma de las especies que se propagan vegetativamente o que tienen semillas recalcitrantes (Martínez y otros, 2003). El almacenaje de semillas ortodoxas es el método más practicado de conservación *ex situ* de recursos fitogenéticos. Alrededor del 90% de los 6,1 millones de accesiones almacenadas en bancos genéticos se mantienen como semillas (FAO, FLD & IPGRI, 2004). Se presenta también la necesidad del almacenamiento de polen, como una estrategia importante para el mejoramiento

genético forestal y manejo intensivo de plantaciones forestales; además la sincronización de la dispersión del polen y el periodo de receptividad floral, junto con las necesidades para hibridación entre especies, y el deseo de reintentar polinizaciones no exitosas son algunos de los factores que determinan la necesidad para el almacenamiento del polen (Tighe, 2004).

El almacenamiento de ADN es de particular utilidad en aquellas especies que no pueden ser conservadas en los bancos tradicionales de semilla de campo, ni tampoco in situ, debido a los grandes riesgos presentes en las zonas de donde provienen. Hasta la fecha no se han presentado casos en los que se han establecido bancos de ADN específicamente para reemplazar los métodos tradicionales de conservación de recursos genéticos forestales, pero el potencial es prometedor debido a ventajas como que el tamaño de la muestra que almacena la información genética es pequeño y a la estabilidad del ADN cuando se almacena en frío (Vicente & Andersson, 2006).

El uso de marcadores moleculares, ha permitido conocer y caracterizar el contenido genético de los organismos, así como estimar la diversidad y las relaciones entre grupos de interés; uno de los usos más generalizados de los marcadores moleculares en los programas de mejoramiento genético, es la identificación y la selección de individuos, haciendo la selección más confiable y precisa (Marulanda y otros, 2011). Los marcadores moleculares han aumentado la eficiencia de los programas de mejoramiento forestal, en la búsqueda de resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, aumento de cosechas, tasas de crecimiento, entre otras (Ajmone, 2001; Citado por: Araya y otros, 2005).

Existen también técnicas biotecnológicas para la detección de agentes nocivos (microorganismos patógenos y sus toxinas, alérgenos, residuos de tratamientos veterinarios, contaminantes abióticos de origen ambiental, etc.), en los alimentos pueden emplearse individualmente o en combinación con técnicas analíticas

tradicionales. Los sistemas biotecnológicos de detección están basados en técnicas inmunoquímicas (ELISA, dispositivos de flujo lateral, ensayos de aglutinación con partículas de látex, etc.), genéticas (Hibridación de ADN, PCR y sus variantes, como PCR cuantitativa en tiempo real, etc.), u otras, por ejemplo, detección de la bioluminiscencia del ATP (Romero, 2008).

Las combinaciones de selección asistida por marcadores moleculares y ensayos de progenies, permitirían resultados más rápidos y exactos en la selección de caracteres complejos, como la tasa de crecimiento y la calidad de la madera; tienen aplicaciones importantes en programas avanzados de control de calidad.

Se interpreta, que la biotecnología ha alcanzado gran importancia como herramienta en los programas de mejoramiento y producción de plantas y su impacto sustancial a largo plazo aumentará a medida en que aumenten las tecnologías (Orozco, 2006).

La tendencia parece mostrar que las especies forestales modificadas y mejoradas genéticamente, serán muy utilizadas en plantaciones comerciales industriales, debido a la disminución en el área de los bosques naturales o al aumento de la demanda de bienes de la silvicultura. Pero aún se requieren estudios mayores, es necesario encontrar protocolos idóneos para varias especies potenciales en Colombia.

3.2 Estado del arte del uso de las Técnicas y Herramientas de la Biotecnología Aplicadas a la Silvicultura.

En este capítulo se sustentan algunos de los programas y estudios en biotecnología, desarrollados en varios países para el mejoramiento y manejo sostenible de los recursos forestales; se trata de conocer si existe investigación en aquellas especies que representan un alto impacto en la silvicultura colombiana, si es significativa la investigación y las instituciones que desarrollan dichos estudios. Aunque mucha información no se encuentra disponible para el público en general, se ha logrado identificar importantes avances en ciencia y tecnología que procuran la reproducción, conservación, caracterización o mejoramiento de las especies arbóreas.

3.2.1 Estudios de caso para la Aplicación de las Técnicas y Herramientas de la Biotecnología en la Silvicultura.

Para la investigación del estado actual y potencial de la biotecnología en el mejoramiento de árboles forestales, la FAO a comienzos de los años 90, auspició una beca André Mayer; el estudio hizo notar que aunque las nuevas tecnologías pueden apoyar y facilitar el trabajo, es probable que el énfasis principal del mejoramiento genético de las especies forestales seguirá estando, en los próximos años, en los estudios taxonómicos de variaciones, especies y procedencias, en la evaluación del terreno de características en uso, y en el desarrollo de estrategias de mejoramiento de árboles que combinen el mejoramiento genético con la conservación genética (FAO, 1994; Citado por: Palmberg, 1998). Son estos trabajos obligados, pues sin ellos no es posible la mejora genética; se deben seguir los estudios sobre el terreno y en laboratorio, debido a que se hace necesario identificar características fenotípicas y genotípicas, que puedan ser potenciales en futuros trabajos de mejoramiento y

conservación. La FAO no menciona las estrategias pero estas se determinan a continuación en este documento.

En 2003, el panel de la FAO repasó la importancia y viabilidad de una revisión global de la biotecnología en la silvicultura, con el propósito de determinar el estado y las tendencias globales de la diversidad genética del árbol forestal. Para el año 2004 la actividades de la biotecnología en la silvicultura se distribuían en las diferentes regiones de la siguiente manera: Europa (39%), Asia (24%), Norteamérica (23%), Oceanía (6%), Suramérica (5%), África (3%) y el centro oriente (Menos de 1%). Las investigaciones en el sector forestal, avanzan rápidamente sobre todo en los países desarrollados y en especial las técnicas de manipulación genética, que se daban en al menos 35 países en el mundo en el 2004; para este mismo año se habían llevado a cabo más de 210 ensayos en 16 países, la mayoría de estas pruebas con lugar en Estados Unidos y se limitaban esencialmente a los géneros *Populus*, *Pinus*, *Liquidambar* y *Eucalyptus*. El uso de la biotecnología se concentra en un 70% en países desarrollados como Francia, Estado Unidos y Canadá; y ha sido utilizada en por lo menos 140 géneros, pero la gran mayoría (62%) se encuentra únicamente en seis: *Pinus*, *Eucalyptus*, *Picea*, *Populus*, *Quercus* y *Acacia* (Torres & Buitrago, 2008).

En la región latinoamericana existe preferencia marcada por las tecnologías como el cultivo de tejidos (90% de las instituciones), las tecnologías que requieren mayor inversión y especialización, como las moleculares, son en la actualidad las de menor empleo en la región (sólo en el 24% de las instituciones) (Roca y otros, 1988). Se ha citado a Roca (2008), puesto que se discrimina que la tendencia sigue siendo la misma hasta al presente, aunque el número de estudios en los diferentes campos ha aumentado circunstancialmente.

Smurfit Kappa Cartón de Colombia incorporó la silvicultura clonal hace más de cinco años utilizando tecnologías desarrolladas en Brasil, a escala comercial en

sus nuevas plantaciones forestales. Igualmente, Pizano-Monterrey Forestal inició en 2005 con *Gmelina arborea*, su programa de hidroponía en viveros. En el vivero 3F del Grupo Kanguroid se iniciaron proyectos en tecnificación de enraizamiento adventicio de *Acacia mangium*. Refecosta inició la construcción de una planta piloto de producción de mini estacas de Teca en 2006. Igualmente, Villanueva, Casanare, se iniciaron dos proyectos de tecnificación de viveros para la propagación clonal de *E. pellita* (Torres & Buitrago, 2008).

La Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), ha trabajado en la caracterización molecular de aliso (*Alnus acuminata*), nogal cafetero (*Cordia alliodora*), guadua (*Bambusa guadua*), ocobo (*Tabebuia rosea*) en la zona cafetera colombiana. En la Unidad de biotecnología de la Pontificia Universidad Javeriana se desarrollan y aplican herramientas biotecnológicas para la caracterización, conservación, manejo y mejoramiento de especies forestales de interés ecológico y económico en las siguientes especies: *Tectona grandis*, *Pinus patula*, *Eucalyptus globulus* y *E. treticornis* y *Gmelina arborea*; además se diseñan estrategias para la capacitación y transferencia de tecnología. De manera paralela, esta unidad ha trabajado en la identificación de microorganismos benéficos para especies forestales, favoreciendo la producción de árboles sanos con tolerancia al trasplante a condiciones de campo (Torres & Buitrago, 2008).

Más ejemplos de estudios realizados en especies forestales, con sus técnicas y para diferentes propósitos, se muestran a continuación.

- **Micropropagación de Especies Forestales.**

El cultivo de tejidos se inicia con el cultivo del cambium en 1934 llevado a cabo en *Pinus pinaster* y *Abies alba*. Pero los avances más importantes no se dan hasta la década de los 70's cuando el Dr. Brown logró la primera conífera diferenciada *in vitro* de la especie *Pinus palustris* (Arias, 1994).

Aunque se ha utilizado una amplia gama de especies forestales para la investigación en micropropagación en los países en desarrollo, la mayor parte del trabajo registrado (94%) se encuentra todavía en la fase de laboratorio, y una porción muy pequeña (5%), ha logrado llegar al ensayo en terreno; menos del 1% de las actividades de micropropagación reportadas en los países en desarrollo ha alcanzado la fase de aplicación comercial (FAO, 2010).

La Pontificia Universidad Javeriana, durante los últimos años ha avanzado en la estandarización de protocolos iniciales para la micropropagación de teca (*Tectona grandis*), eucalipto (*E. globulus* y *E. tereticornis*), aliso (*Alnus acuminata*), pino romeron (*Decussocarpus rospiglosii*) y ocobo (*Tabebuia rosea*) (Torres & Buitrago, 2008).

En estudio de investigación de micropropagación aplicada a *Cedrela odorata*, realizada por el laboratorio de biotecnología del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE), en México, se utilizó explantes de nudo cotiledonar de 3cm de longitud de plantas élite de 45 a 60 días de edad. La principal conclusión en el estudio anterior fue que, la bensilaminopurina (BAP) a niveles de 2,2 y 6,5 μM es la mejor citocinina para favorecer la brotación de explantes nodales de *C. odorata*; sin embargo, el tamaño de los brotes no es garantía de éxito en la fase de desarrollo por su difícil manejo y la mayor susceptibilidad a la manipulación (Pérez y otros, 2001).

El Raulí (*Nothofagus procera*), es un árbol endémico de los bosques chilenos y representa la reserva más rica del bosque chileno y forma parte de las especies renovables más potenciales de su país. La propagación *in vitro*, se realizó con el fin de determinar el medio óptimo de cultivo y establecer las concentraciones hormonales adecuadas para la proliferación en la obtención de microtallos enraizables (Sánchez y otros, 2004).

En 1998 se llevó a cabo la propagación vegetativa *in vitro* de aliso (*Alnus acuminata*), en Cajamarca, Perú, en el laboratorio de la Asociación Civil para la Investigación y Desarrollo Forestal (ADEFOR). El objetivo del trabajo fue establecer una técnica adecuada para la micropropagación vegetativa *in vitro* de *Alnus acuminata*, una especie nativa valiosa debido a sus múltiples usos en el vecino país (Gonzalos & Vilca, 1998).

Se ha realizado un trabajo en plantas de *Tabebuia rosea* y de *Cordia alliodora*, buscando su multiplicación y mantenimiento *in vitro*, en la Universidad Nacional de Colombia. El material vegetal tenía como destino Conif (Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal), para la primera plantación de origen *in vitro*, con la intención de realizar ensayos posteriores de propagación vegetativa, análisis de pruebas clonales y moleculares. Este material vegetal fue plantado en la estación experimental Bambusa en Pacho (Cundinamarca), y es la primera colección de origen *in vitro* de estas especies (Schuler, y otros, 2005).

La *Toona ciliata*, es una Meliácea originaria de la región del Himalaya; la regeneración de esta especie es por semilla e injertos; los procesos de propagación son limitados. El objetivo del trabajo realizado en Morfogénesis *in vitro*, a partir de raquis de hojas jóvenes con tiazuron, fue lograr la formación de callos y la regeneración de plantas para propagación *in vitro*. El estudio demuestra que los brotes o embriones somáticos tienen gran potencial como alternativa de propagación y conservación de la especie, aunque es necesaria mayor investigación para desarrollar un método efectivo de regeneración de brotes en estas plantas (Daquinta y otros, 2005).

En trabajo realizado para la optimización de un protocolo para la multiplicación de caucho (*Hevea brasiliensis*) vía embriogénesis somática, se investigó la influencia de dos reguladores de crecimiento para la obtención de callos viables, pero no se

llegó a regeneración de plantas. Las especies de caucho para este estudio fueron el FX 3864 suramericano y el PB 254 asiático (Cadavid y otros, 2006).

La Universidad Católica de Oriente, de Rionegro, Antioquia, ha llevado a cabo un estudio para establecer un protocolo para la propagación vegetativa de árboles de eucalipto (*Eucalyptus pellita*), especie que presenta múltiples usos entre los cuales destacan la construcción, postes eléctricos, cercas y para utilizarla en sistemas silvopastoriles. Se identificaron árboles superiores para fijar la ganancia genética (Castro y Sánchez, 2010).

A partir de la propagación clonal *in vitro* la empresa Monterrey Forestal Ltda, ha logrado establecer una plantación de ceiba tolúa (*Bombacopsis quinata*), para abastecer la planta de tableros contrachapados y aglomerados de la empresa Pizano S.A. de Barranquilla. La madera de ceiba tolúa es muy valiosa y ha sido utilizada para molduras, mueblería, torneado y piezas de molinos; es una madera fácil de trabajar, durable y resistente a plagas y humedad, lo que la hace una especie promisoría para el futuro de la silvicultura en Colombia. El programa busca la selección y mejoramiento genético (Vallejo, 1998).

- **Criopreservación y almacenamiento *in vitro* de germoplasma de especies forestales.**

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 (Martínez y otros, 2003). Es frecuente que esta técnica sea la única opción segura y rentable para conservar por largos periodos de tiempo las semillas de las especies no ortodoxas o recalcitrantes (FAO, FLD & IPGRI, 2004).

En el caso de *Populus alba*, se desarrolló un protocolo de criopreservación a partir de yemas axilares utilizando la técnica de la vitrificación como elemento

crioprotector con los que se puede lograr porcentajes de sobrevivencia del 90%. Para el caso de la especie *Juglans cinérea* que se encuentra en peligro de extinción, se desarrolló un protocolo de conservación utilizando ejes embríonicos sometidos a desecación lenta (Martínez y otros, 2010).

Para el caso del almacenamiento de semillas se han podido recuperar en este documento, los siguientes casos: Algunas semillas ortodoxas de cubierta dura mantienen la variabilidad durante decenios como: *Cassia multijuga* (158 años), *Albizia julibrissin* (149 años), *Cassia bicapsularis* (115 años), *Leucaena leucocephala* (99 años); además están las especies *Prosopis juliflora* (50 años) y (13 años) *Acacia aneura* (Willan, 1991).

Semillas ortodoxas sin cubierta dura como por ejemplo *Pinus*, *Picea* o *Eucalyptus*, pueden conservar la viabilidad durante varios años con un contenido de humedad en recipientes herméticos a 3-5°C; las semillas de *P. kesiya* y *P. merkusii* conservan buena variabilidad durante cuatro años almacenadas a un contenido de humedad inferior al 8%, en recipientes herméticos y a 0-5°C. Se han considerado periodos más largos en algunas especies de pinos, como por ejemplo en *Pinus resinosa*, en los Estados Unidos con almacenamiento en recipientes herméticos a 1,1-2,2°C; la *Agathis australis* mediante un tratamiento adecuado (desecación hasta un 6%, después almacenamiento en recipientes herméticos a 5°C) se consiguió mantener la variabilidad durante seis años (79% de germinación frente al 88% inicial) (Willan, 1991).

Semillas recalcitrantes como las de *Quercus* y *Castanea*, suelen almacenarse húmedas por periodos cortos de tiempo. Algunas bellotas de *Quercus falcata* se podrían almacenar durante 30 meses a temperatura de 3°C, humedad del 33% inicial y final de 37% y se seguiría obteniendo una germinación superior al 90%; Las especies recalcitrantes se encuentran en su mayoría en los bosques húmedos; son géneros característicos *Hevea*, *Swietenia*, *Terminalia* y *Triplochiton*

así como algunos géneros de dipterocarpaceas como *Dryobalanops*, *Dipterocarpus* y *Shorea* y algunas especies de *Araucaria* (Willan, 1991).

Las semillas de Caoba (*Swietenia macrophylla*) o neem (*Azadirachta indica*), pueden criopreservarse después de una desecación parcial directamente; cuando las semillas no se puede tratar mediante criopreservación, se deben utilizar embriones escindios o ejes embriónicos. Además de la técnica de desecación, se incluyen la encapsulación-deshidratación y la vitrificación. Varios autores sugieren el uso de ápices de brotes recolectados de los embriones, yemas adventicias o embriones somáticos producidos a partir de tejidos embrionarios; además el uso de explantos adventicios reduciría la gama de variabilidad genética muestreada (FAO, FLD & IPGRI, 2004).

Existen algunos estudios de regeneración de especies forestales después de la criopreservación o almacenamiento *in vitro*, que se dan a conocer en este documento.

En la especie *Guazuma crinita*, una especie tropical, se logró la recuperación después de inmersión en nitrógeno líquido de explantes consistentes en agrupamientos de yemas adventicias, mediante previo tratamiento de encapsulación vitrificación. Para las especies con semillas recalcitrantes como el *Quercus suber* y *Q. ilex*, se logró el crecimiento de ejes embriónicos encapsulados en cápsula de alginato. Se ha logrado regeneración después de transformación genética en las siguientes especies: *Eucalyptus globulus*, *Castanea sativa*, *Quercus rubur*, *Fagus sylvatica*, y *F. orientalis*, *Ulmus minor*, *Pinus pinea* y *Azadirachta indica* (Martínez y otros, 2010).

Para el caso específico del almacenaje de polen para las especies de Pinos tropicales y subtropicales, la literatura encontrada demuestra que, se puede almacenar el polen a corto plazo por un año a una temperatura de 4°C; este es un

método recomendable para intervalos cortos entre la disponibilidad del polen y la receptividad de estróbilos femeninos, o para cruces realizados en zonas alejadas de la zona de recolección de polen. El almacenamiento de polen a mediano plazo se puede lograr eficientemente para las especies de pinos, por medio de congelación a -20° o secado al vacío/congelación (disminuir el porcentaje de coeficiente de humedad bajo vacío, luego almacenar a -20°C) con un secador de vacío (“vacuum dryer”); evita el congelamiento y el deshielo del polen por medio del uso de frascos pequeños. Para lograr almacenamiento a largo plazo con viabilidad aceptable, el polen de las especies de pinos puede ser congelado al vacío / congelamiento a los -20°C de la misma manera que el almacenamiento a mediano plazo (Tighe, 2004).

El polen de algunas familias es tolerante a la desecación y es bastante fácil de almacenar, por ejemplo, Liliaceae y Solanácea, pero el polen de otras familias es sensible a la desecación y es más difícil de almacenar, por ejemplo, Cucurbitácea, Gramínea (Poáceae); Compositae (Asteráceae). Al igual que con las semillas los factores que afectan la longevidad son: el contenido de agua, la temperatura de almacenamiento y la atmósfera de almacenamiento (Walters & Towill, 1995).

Las investigaciones citadas para el caso puntual de criopreservación y almacenamiento *in vitro* de especies forestales, demuestran que las técnicas tienen facultad para ser aplicadas a las especies forestales, ya sea en futuros bancos de germoplasma o en programas de mejora genética. Aunque no se incluyan en esta búsqueda estudios o avances puntuales en especies potenciales del país o completa información actualizada, debido a la escasa información disponible al respecto, se puede mencionar, que las investigaciones demuestran la posible utilización con éxito de estas técnicas y herramientas de la biotecnología, en la silvicultura colombiana.

- **Estudios de caso para el uso de marcadores genéticos moleculares.**

En esta sección se demostrará que los marcadores genéticos moleculares, han sido utilizados en la silvicultura. Es un acercamiento a las diferentes investigaciones llevadas a cabo en varios países para conocer el estado actual de las aplicaciones de estas técnicas en las especies forestales. Se sustenta aquí, el tipo de marcadores genéticos moleculares usados y las especies a las cuales se les ha realizado el estudio.

Hasta mediados de la década del 60 los marcadores utilizados en genética y mejoramiento eran aquellos controlados por genes asociados a caracteres morfológicos lo que reducía la probabilidad de encontrar semejanzas significativas entre marcadores y ecotipos, debido al pequeño número de marcadores morfológicos; su empleo era limitado a estudios de diversidad y mejoramiento genético. Luego surgió el descubrimiento y utilización de marcadores isoenzimáticos y las técnicas de biología molecular que permitieron extraer el ADN y generar diversos métodos de detección de polimorfismo genético. La técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR), permitió acelerar los métodos de clonación, secuenciación y análisis de polimorfismo de ADN (Nieto, Ramos, & Motte, 2005).

Los estudios de la técnica de isoenzimas en árboles forestales se incrementaron notablemente durante la última década, y la cantidad de especies estudiadas, especialmente coníferas, alcanza un número mayor de 100. Los estudios de isoenzimas en árboles forestales han incluido principalmente comparaciones de la estructura genética entre especies y de la variabilidad genética dentro y entre poblaciones a través de grandes distancias geográficas, además de la determinación de la subestructura de la población a través de distancias microespaciales (Vargas, Bermejo, & Thomas, 2004).

En trabajo realizado en la Universidad Nacional del Nordeste, en Argentina, se estudió la estabilidad de plantas de paraíso gigante, con isoenzimas y marcadores RAPD, a partir de meristemas provenientes de la técnica de crioconservación por encapsulación-deshidratación. Se demuestra que el tratamiento de crioconservación no aporta variabilidad genética en relación al material proveniente del material testigo; esto posibilita la conservación a -196 °C del germoplasma de *Melia Azedarach* L. var. *Gigantea* (Faloci y otros, 2000).

Se han utilizado los marcadores genéticos tipo isoenzimas para desarrollar programas tecnológicos de mejora y evaluación de la variación genética en las especies raulí (*Nothofagus nervosa*) y roble (*N. obliqua*), en CONICET (Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas), de Bariloche, Argentina; dentro de las conclusiones de este estudio se hace referencia a la contribución de la técnica a los estudios filogenéticos y de estimación de variación genética dentro y entre poblaciones (Gallo y otros, 2006).

Los marcadores del ADN se basan fundamentalmente en el análisis de las pequeñas diferencias en secuencias de ADN entre los individuos. Sus técnicas son muy variadas y dan el nombre a los distintos tipos de marcadores; algunos ejemplos de los marcadores de ADN son: Polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP), Amplificación aleatoria del ADN polimórfico (RAPD), Polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP), Microsatélites o Secuencias simples repetidas (SSR), Amplificación aleatoria del polimorfismo de microsatélites (RAMPO), entre otras técnicas (Azofeifa, 2006).

Se llevó a cabo una investigación en busca de un protocolo idóneo para la extracción y purificación de ADN de *Tectona grandis*, en la Universidad Veracruzana en México, para el empleo en la técnica RAPD, utilizando tres protocolos para la extracción y purificación de ADN (Dellaporta, 1983; Uyemoto, 1997 y Doyle y Doyle, 1987, citados por: Nieto, Ramos, & Motte, 2005).

Los RAPD's se utilizaron en la especie de árbol *Populus tremula*, para caracterizar clones e identificar diferentes árboles que procedían de distintas localidades. En las especies *Castanea* y *Salix*, se ha utilizado los marcadores AFLPs para la caracterización de especies, variedades y cultivares; con los AFLPs se caracterizaron 14 clones de *Populus*. La aplicación más inmediata de los RAPD's en los programas de mejora y selección de genotipos superiores se ha realizado en las especies de *Eucalyptus* y *Pinus*. Para detectar variación somaclonal en *Picea abies* y *Quercus suber*, se han utilizado marcadores tipo RAPD, y marcadores tipo AFLP se utilizaron en *Carya illinoensis* (Martínez y otros, 2010).

Con el propósito de estandarizar un protocolo para el uso de la técnica RAPD, se llevó a cabo una investigación en la especie *Tectona grandis*, en la universidad Veracruzana, en México. Se recolectaron hojas jóvenes de árboles adultos de Teca; luego se hizo la extracción de ADN. Para desarrollar RAPD se utilizó la técnica descrita por Williams, 1990. Los fragmentos amplificados de ADN fueron separados por electroforesis. Se concluye que el protocolo que tuvo mayor calidad y cantidad de ADN fue el propuesto por Uyemoto; los fragmentos amplificados presentaron alta resolución y reproducibilidad, lo que permite su uso para estudios posibles como: diversidad genética y mejoramiento asistido por marcadores moleculares entre otros (Nieto, Ramos, & Motte, 2005).

Alnus acuminata, pertenece a la familia Betulácea, es un árbol de uso múltiple, y juega un papel importante en la protección de cuencas hidrográficas, en el control de la erosión, al tiempo que son empleados en sistemas agroforestales. En estudio realizado por Gonzaga, (2004), en la Universidad Tecnológica de Pereira, se utilizaron marcadores moleculares AFLP de plantas donadoras de Aliso *Alnus acuminata* H.B.K, para realizar análisis de estabilidad genética de los callos embriogénicos y los embriones somáticos o bien caracterización molecular de la especie. La obtención de marcadores moleculares polimórficos AFLP en aliso

permiten confirmar la aplicabilidad de esta técnica molecular al estudio de estabilidad genética de los materiales embriogénicos; los microsatélites y los AFLPs pueden ser los marcadores más adecuados para el análisis de estabilidad genética (Gonzaga, 2004).

A partir de las técnicas moleculares aplicadas en pino y eucalipto, se logró la multiplicación e identificación de clones; además, certificó la pureza de los clones y determinó diferencias genéticas, lo que le permite diferenciar las especies genéticamente (Becerra & Paredes, 2009).

Para el análisis de la diversidad genética de colecciones élite de *Eucalyptus*, se han utilizado 12 marcadores moleculares microsatélites; el estudio se llevó a cabo con especies que hacen parte de los programas de mejoramiento de Smurfit – Cartón de Colombia, para desarrollar el potencial industrial de *Eucalyptus grandis* y *Eucalyptus urophylla* (Barrios y otros, 2004).

3.3 Desarrollo de la Biotecnología en la Silvicultura Colombiana.

3.3.1 Producción Forestal en Colombia.

Cerca de 17 millones de hectáreas de las 114 millones de has de extensión del país, tienen potencial para el desarrollo de proyectos forestales, de las cuales sólo están siendo utilizadas en plantaciones forestales comerciales un 1,5% (253066 has). En el año 2008 se estimó que el 53,3% (60,7 millones de has), de las 114 millones de hectáreas que tiene el país, están cubiertas de bosques naturales; estas áreas no están disponibles para el desarrollo de plantaciones comerciales (CONIF, 2008).

La tabla N° 3, presenta los rendimientos promedios de más de 10 especies aptas con alto potencial de incrementar sus rendimientos con trabajos de biotecnología y mejoramiento en Colombia. En el caso del eucalipto se pueden lograr rendimientos de hasta 30 (m³/ha/año) con un turno de 8 años (CONIF, 2008).

Tabla 3. Rendimientos de las Especies Forestales en Colombia.

Nombre científico.	Nombre común.	Rendimiento (m ³ /ha/año).	Turno en años.
<i>Eucalyptus grandis.</i>	Eucalipto.	25-40	8
<i>Acacia magnium</i>	Acacia.	26-30	12
<i>Bombacopsis quinata.</i>	Ceiba Tolúa.	Menos de 18	Mayor a 20
<i>Cordia alliodora.</i>	Nogal cafetero.	8-20	20
<i>Eucalyptus globulus.</i>	Eucalipto.	15-35	8-12
<i>Gmelina arbórea.</i>	Melina.	20-25	10-14
<i>Eucalyptus pellita</i>	Eucalipto.	15-20	12
<i>Eucalyptus tereticornis.</i>	Eucalipto.	20	8-12
<i>Schizolobium parahybum.</i>	Frijolito – Tambor.	13	16
<i>Tectona grandis.</i>	Teca.	7-10	25-28
<i>Cariniana pyriformis.</i>	Abarco.	7	20

Tomado de: CONIF, 2008.

La gran biodiversidad que posee el país es reconocida por el Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación (DACTI), además reconoce el impacto en competitividad que tienen las innovaciones tecnológicas. El objetivo de la DACTI, es acelerar la investigación y desarrollo en biotecnología, tanto en el sector académico como en el empresarial, y desarrollar macro proyectos de inversión para el aprovechamiento sostenible de la biodiversidad (Conpes, 2011).

Adelantos biotecnológicos se muestran para todas las especies mencionadas en la Tabla N° 3, en algunas instituciones o empresas en Colombia; por ejemplo, PIZANO S.A., para el año 2007, estableció jardines clonales hidropónicos para *Gmelina arbórea*; en el 2010, realizó la caracterización molecular de clones de *Gmelina arbórea* y la crioconservación de germoplasma de esta especie; desarrolló una librería de marcadores de expresión (ESTs) asociados a sequía (PIZANO, 2011).

Por su parte la empresa REFOCOSTA, ha venido desarrollando programas de mejoramiento genético a partir de selección masal, en las especies Pino Caribe, Eucalipto, Roble y Teca (REFOCOSTA, 2013). En tanto Smurfit Kappa, ha llevado a cabo la introducción y desarrollo de paquetes tecnológicos para la selección y mejoramiento genético de las especies *Pinus kesiya*, *P. tecunumanii*, *P. maximinoi*, *Eucalyptus grandis* y *E. urophylla*, en colaboración con CAMCORE, la Universidad de Carolina y la facultad forestal de la Universidad de Florida (SMURFITKAPPA, 2013).

CONIF, ha adelantado investigación en las especies forestales *Tectona grandis*, *Gmelina arbórea*, *Pinus carpa*, *Pinus pátula* y *Eucalyptus grandis* a través de silvicultura intensiva (2008-2011); Identificación y evaluación de clones adaptables de *Hevea brasiliensis* (2008-2011); aumento y mejoramiento de material vegetal disponible de *Tectona grandis* y *Gmelina arbórea* (2008-2011). CONIF ha ampliado la base genética en el mejoramiento de *Eucalyptus Globulus* (2006-

2009); entre el 2006 y 2007 estableció campos clonales de *Hevea brasiliensis* (CONIF, 2013).

INSEFOR, ha centrado sus estudios en las especies de roble, nogal cafetero, teca y aliso, adelantando las técnicas de propagación vegetativa, injertación y enraizamiento de estacas. Ha hecho el seguimiento y mantenimiento a ensayos de progenie con las especies *Cordia alliodora* y *Tabebuia rosea*, en cooperación con La Federación de Cafeteros y Smurfit Cartón de Colombia. Mejoramiento genético de *Tectona grandis*, protocolos de almacenamiento de semillas de las especies aliso, abarco y caoba (CONIF, 2004).

Dentro de los avances de COMFORE, al año 2003, se contaba con 41 árboles de *Tabebuia rosea* seleccionados y sancionados tentativamente como superiores; 45 de *Cordia alliodora*, 108 de *Tectona grandis* y 30 de *Alnus acuminata*. Para septiembre de 2001, se habían establecido seis ensayos de progenie de *Tabebuia rosea*, y se realizaron los análisis pertinentes a 19 ensayos de *Cordia alliodora*, establecidos en 1999 por la Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Se estableció un huerto semillero clonal de producción y otro de conservación de Roble (*Tabebuia rosea*), en la costa atlántica colombiana y huerto semillero clonal de producción de Nogal, en el departamento del Quindío. En el campo de investigación in vitro se desarrollaron dos investigaciones complementarias con el ánimo de estandarizar un protocolo de micropropagación de *Cordia alliodora* y *Tabebuia rosea* (Gutiérrez y otros, 2003).

Las empresas ubicadas en las diferentes zonas del país, dedicadas a la producción, transformación y comercialización en el sector forestal, se muestran en la Tabla N° 4. Principales industrias de transformación en el sector forestal.

Tabla 4. Principales Industrias de Transformación en el Sector Forestal.

Compañía.	Tipo de plantación.	Área Reforestada (Has).	Ubicación.	Usos de la madera.
Refocosta.	Teca.	1269	Magdalena.	Línea arquitectónica, carpintería, Agroindustria y construcción.
	Roble.	762	Magdalena.	
	Pino caribe.	1525	Casanare.	
	Eucalipto.	1279	Magdalena.	
Smurfit Kappa, Cartón de Colombia.	Eucalipto	17000	Pereira, Cali y Popayán.	Papel y cartón.
	Pino	27000		
Pizano.	Ceiba roja Melina.	20000	Barranquilla, Urabá y Valle del Cauca.	Construcción, Triplex, Madecor, Puertas y muebles.
Reforestadora Industrial de Antioquia.	<i>Pinus pátula</i> , Melina, <i>Pinus oocarpa</i> , Acacia y Teca.	10555	Antioquia.	Materia prima para la industria.
Kanguroid. 3F Proyecto Bosques del futuro.	Acacia, Melina y Teca.	4100	Córdoba.	Construcción, muebles y Cocinas.
Reforestadora el Guásimo.	<i>Pinus maximinoi</i> .	98	Antioquia, Caldas y Tolima.	Manejo de plantaciones e industria forestal.
	<i>Pinus pátula</i> .	4554		
	Ciprés.	202		
	Otras especies.	31		
Industria forestal Doña María.	<i>Pinus pátula</i> , <i>Pinus oocarpa</i> , <i>Pinus tecunumanii</i> y <i>Pinus maximinoi</i> .	7400	Medellín, Yarumal, Angostura y Yolombó.	Materia prima para la industria.
Madeflex	Eucalipto.	4000	Magdalena.	Puertas y marcos.
Cipresses.	<i>Cupressus lusitánica</i> y <i>Pinus pátula</i> .	2000	Caldas y Antioquia.	Madera para industria.

Tomado de: PROEXPORT, 2010.

Las plantaciones forestales con fines comerciales, actualmente se encuentran localizadas en los departamentos de Antioquia, Córdoba, Valle del Cauca, Cauca, Magdalena, Caldas, Bolívar y Santander, cuyas áreas tienen influencia de las industrias de pulpa, tableros aglomerados e inmunización (Arias, 2005).

Colombia cuenta todavía con grandes extensiones de bosque natural y zonas aptas para el establecimiento de plantaciones forestales comerciales; además en el país existe diversidad de especies arbóreas que pueden servir para la implementación de sistemas de producción silvícola a nivel industrial. Pero no se debe amparar en esta situación, pues el país necesita ser más competitivo a nivel mundial. Según (PROEXPORT, 2013), las importaciones de madera y productos derivados del país, han presentado un crecimiento del 16% y las exportaciones sólo crecieron un 1.5%, por esto se deben fomentar los programas de investigación junto a nuevas políticas que promuevan la silvicultura.

3.3.2 Marco de Política y Estrategia.

Hacia la década del 90, se hicieron en Colombia cambios institucionales dentro de las estancias gubernamentales, que involucraron al desarrollo forestal. Para fomentar la reforestación comercial, se crearon y reglamentaron diversos mecanismos económicos, que discriminaban significativamente a las especies nativas, en lugar de las introducidas. Para entonces, se evidenció la falta de investigación en la silvicultura para muchas especies especialmente nativas. Adicionalmente, se tenía el ejemplo exitoso de los resultados de programas de mejora adelantados por las grandes reforestadoras, con especies introducidas de los géneros *Pinus* y *Eucalyptus* principalmente (Gutiérrez y otros, 2003).

A través de Colciencias se agruparon en la década de 1980 a los investigadores que aplicaban las técnicas de cultivo de tejidos y células, por medio de la Asociación Colombiana de Tejidos *in vitro* (ACUTEV), mientras que en la

Universidad Nacional de Colombia, sede Bogotá, se creó la Asociación Colombiana de Estudios Vegetales *in vitro* (ACEVIV) con el mismo fin (Torres y Buitrago, 2008).

Las primeras actividades para institucionalizar un programa de ciencia y tecnología en el campo de la biotecnología se iniciaron en Colciencias en el año 1986, cuando se creó un grupo de trabajo y se elaboraron los primeros documentos sobre un Programa Nacional de Biotecnología (PNB) (Castellanos, Jiménez, & Montañez, 2006).

El PNB, se creó en la primera reunión del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología en 1991; se esperaba fuera la respuesta a las necesidades del país, de institucionalizar a las personas y los grupos que trabajaban con estas técnicas. Para ese año la biotecnología vegetal contaba con 20 instituciones con programas de investigación y 10 laboratorios, 25 investigadores con doctorado y 33 con maestría (Torres & Buitrago, 2008).

En el periodo, 1991 – 1994, el país se vinculó a la REDBIO/FAO (Red Latinoamericana de Cooperación técnica en Biotecnología Vegetal), con la intención de hacer gestión para iniciar su participación en otras redes internacionales y se logró formar investigadores en el nivel doctoral en el exterior. Además, se facilitó la adquisición de equipos e infraestructura y se puso a discusión la pertinencia de la creación de corporaciones de investigación. Para el segundo periodo 1995 – 1998, se enfatizó en el desarrollo de líneas de investigación en biotecnología animal, ambiental, industrial, salud humana y vegetal, y se intentó dar solidez a los grupos y centros de investigación existentes; para tales efectos, en 1995 se publicó el “Directorio de Biotecnología. Colombia”, por parte de Colciencias con el apoyo del Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), la Organización de las Naciones Unidas para la Educación, la Ciencia y la Cultura (UNESCO), Organización de las Naciones Unidas para el

Desarrollo Industrial (ONUDI); la lista contenía nombres de investigadores y de instituciones que trabajan en biotecnología; a esta fecha se reportaron 81 instituciones y 251 investigadores, 48 con doctorado y 62 con maestría (Torres & Buitrago, 2008).

A través del PNB, entre 1991 y 2004, se han invertido más de 24,76 millones de dólares en 177 proyectos de biotecnología, con un promedio de 157 mil dólares para cada uno; las áreas de aplicación de los proyectos biotecnológicos financiados entre 2000 y 2004 son, la agrícola, pecuaria, de salud, ambiental, industrial y de bioinformática . Los aportes del estado fueron del orden de 10,04 millones de dólares (40,5%) y el apalancamiento a través de contrapartidas fue 59,5%, unos 14,71 millones de dólares (Torres y Buitrago, 2008). Para el periodo 2005 – 2008 el ministerio aprobó 39 proyectos de investigación forestal en el área temática de material vegetal y mejoramiento genético, por un valor de \$29.500 millones pesos de los cuales \$13.364 millones fueron aportados por el ministerio (Restrepo, 2011).

En el 2004, gracias a CONIF, se estableció la Red Colombiana de Biotecnología Forestal (REBIOFOR), con el fin de recoger y divulgar información sobre herramientas biotecnológicas aplicadas en Colombia, por algunas entidades académicas como la Universidad Javeriana, Distrital y la Universidad Tecnológica de Pereira (UTP), y los avances de empresas y particulares como PIZANO S.A, REFOCOSTA, SMURFIT, KANGUROID, entre otras (Torres & Buitrago, 2008).

Con el fin de desarrollar actividades de mejoramiento y conservación de los recursos genéticos forestales en Colombia, se impulsó el programa de Investigación en Semillas de Especies Forestales Nativas (INSEFOR), y la creación de la Cooperativa Colombiana de Mejoramiento Genético Forestal (COMFORE), por parte del Gobierno Nacional a través del Ministerio de

Agricultura y Desarrollo Rural como organismo financiador, y de CONIF como organismo coordinador y ejecutor (Gutiérrez y otros, 2003).

Para consolidar la oferta tecnológica y mejorar la dotación de capital humano para el desarrollo de cultivos forestales rentables y competitivos, el MADR (Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural), a través de CONIF, la Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CORPOICA), y la Corporación Colombia Internacional (CCI), en coordinación con los demás integrantes del Sistema Nacional de Ciencia y Tecnología y con el concurso de las empresas forestales, intenta hacer la zonificación de áreas con potencial para el establecimiento de plantaciones comerciales y pretende dar prioridad a las acciones de investigación, mejoramiento genético y biotecnología forestal. El MADR, a través del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), busca acciones tendientes a fortalecer el área de la protección sanitaria en cultivos forestales. Por último, el MADR y el Servicio Nacional de Aprendizaje (SENA), tienen el objetivo de realizar inversiones en formación y capacitación de recursos humanos y capacitación y transferencia de tecnología (CONPES, 2003).

El MADR, propicia a través de la Bolsa Nacional Agropecuaria S.A., la creación de instrumentos de financiamiento para el sector forestal, tales como: contratos de compra venta anticipada de las cosechas con entregas y pagos a futuro; esquemas de financiamiento basados en los inventarios de madera; proyectos de titularización de los derechos patrimoniales derivados de dichos contratos, de las propias plantaciones, y de los flujos de caja derivados de las mismas; alternativas de comercialización de los certificados de captura de CO₂; y otras formas mediante las cuales canalicen recursos del público inversionista para el sector forestal de manera desintermediada (CONPES, 2003).

Políticas, normativas y planes del gobierno colombiano para direccionar las inversiones para el uso de la biotecnología se muestran en la Tabla N° 5. Marco de Políticas, Normativas y Planes para el uso de la Biotecnología en Colombia.

Tabla 5. Marco de Políticas, Normativas y Planes para el Uso de la Biotecnología en Colombia.

Estrategia.	Descripción.
Normativa.	Ley 1286 – 2009: Por la cual se modifica la Ley 29 de 1990, se transforma a Colciencias en Departamento Administrativo, se fortalece el Sistema Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación en Colombia.
Normativa	Ley 1530– 2012: Por la cual se regula la organización y funcionamiento del SGR.
Normativa.	Ley 165 de 1994. Se aprueba el Convenio sobre la Diversidad Biológica.
Política.	Política de Fomento a la Investigación y la Innovación, Colombia construye y siembra futuro.
Política.	CONPES 3582 – 2009: Política Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación.
Política.	Política Nacional para la Gestión Integral de la Biodiversidad y su Servicios Ecosistémicos (2012).
Política.	Política y legislación en materia de recursos genéticos (CONPES 3697 – 2011). Política Nacional para el Desarrollo comercial de la Biotecnología a partir del uso sostenible de la biodiversidad.
Política.	CONPES 3697 – 2011: Política Nacional para el Desarrollo Comercial de la Biotecnología a partir del Uso Sostenible de la Biodiversidad.
Política.	CONPES 3678 – 2010: Política de transformación productiva: Un modelo de desarrollo sectorial para Colombia.
Política.	CONPES 3527 – 2008: Política nacional de competitividad y productividad.
Política.	CONPES 2834: Política de bosques.
Plan.	Plan Nacional de Desarrollo 2010 – 2014: Prosperidad para todos.
Plan.	Planes estratégicos de los Programas Nacionales de CTel.
Plan.	La biotecnología Motor de Desarrollo para la Colombia de 2015.
Plan.	Agendas regionales de CT+I.

Adaptado de: Tinjacá, 2012.

3.3.3 Oportunidades de la Biotecnología en la Silvicultura Colombiana.

Con el uso de la biotecnología es posible mejorar la calidad y productividad de los árboles y además generar plantaciones para un uso determinado o productos revolucionarios, es decir, tener árboles específicamente destinados a la producción de celulosa, madera aserrada, energía, etc., en un lapso de tiempo más corto y con menos costos (Daparo, 2005).

Los países más exitosos en el desarrollo comercial de la biotecnología han iniciado con políticas que priorizan la explotación comercial de la investigación con el estímulo de relaciones empresariales y la investigación colaborativa entre la industria y las organizaciones de investigación pública. Se fortalece la creación de empresas con base biotecnológica y el acceso a financiación (Conpes, 2011).

Según León (2009), en un artículo publicado en el periódico el Tiempo, en países como Canadá y Estados Unidos se ha comprendido el tamaño del mercado de la biotecnología aplicada a la agricultura, y han invertido en investigación para explotarla y mejorar las condiciones de sus productores; mientras que en Colombia la inversión en la biotecnología es mínima, lo que hace prever que el país perderá competitividad en el futuro, y cada vez tendrá más productos importados.

Colombia hace parte de los 23 países del mundo que utilizan la biotecnología y se cuenta para el año 2009, con 138 grupos de investigación, de los cuales la gran mayoría pertenece a las universidades públicas del país; lamentablemente, la mayoría de los resultados no logran impacto destacable, esto se debe a que mucha de la investigación realizada está muy aislada, carece de visión, aplicabilidad y retorno de la inversión (León, 2009).

En Colombia para el año 1997, se presentó una inversión aproximada de 1.8 millones de dólares en tecnología, mientras que en Estados Unidos para el mismo año se invirtió 7300 millones de dólares y ya en el año 2001, su inversión en ciencia y tecnología alcanzó los 16400 millones de dólares; Alemania más de 1000 millones, Reino Unido 705 millones y Francia 560 millones de dólares de asignación presupuestal en biotecnología. Para el año 2000, mientras que Estados Unidos tenía 3600 patentes y Canadá un poco más de 500, Colombia no superaba las 8 patentes (Orozco, 2006).

En el país no se cuenta con un número suficiente de economistas, administradores y abogados que apoyen totalmente los procesos de vigilancia tecnológica, acceso a mercados, inteligencia competitiva, regulaciones nacionales y acuerdos internacionales (Hernández, 2008). Nuestros investigadores no poseen visión empresarial en la mayoría de los casos y los empresarios tienen incertidumbre y duda ante las posibilidades que ofrece debido a la complejidad; se necesitan más consultores que ayuden a realizar planes de negocio y falta entendimiento entre el sector científico y financiero (González, Villa & Velasco, 2007). En Colombia tampoco existe una base científica y tecnológica sólida, que permita conformar una comunidad científica fuerte, dinámica e integrada al conocimiento mundial y que tenga capacidad de apoyar procesos de gestión (Forero, 2011).

En Colombia se nota la ausencia de una política de fomento a la creación de empresas biotecnológicas, debido a que no se reconoce a la biotecnología una rama importante de desarrollo económico. En el país no se evidencia el apoyo a proyectos de innovación con riesgo tecnológico, lo que hace que las empresas no se involucren; no existen instrumentos financieros para el fortalecimiento y la creación de empresas, no existe oferta estructurada de inversión por falta de trayectoria empresarial y hay escasas garantías. Los instrumentos de fomento son aprovechados por las medianas y grandes empresas donde los riesgos son

controlados, por ejemplo entre el 2003 y el 2004 la gran empresa obtuvo el 76% de los recursos de crédito, mientras que la mediana empresa participó con el 14,5% en 2003 y el 16% en 2004; la pequeña empresa obtuvo solo el 7% de acceso a crédito (Conpes, 2011).

Se hace necesaria la voluntad política del gobierno, para impulsar la inversión en ciencia y tecnología, mejorar el acceso a mercados, formar alianzas estratégicas internacionales, desarrollar un sistema flexible de propiedad intelectual, favorecer la generación de ambientes regulatorios que faciliten la adquisición de estrategias en el área para el desarrollo industrial y ambiental, y tener una valoración clara de los riesgos y beneficios económicos (Castellanos, Jiménez, & Montañez, 2006).

Para incluir al país en el mercado de la biotecnología, y en la espera de encontrar a este campo atractivo y competitivo para realizar inversiones de alto impacto con elevado margen de retorno, resulta necesario crear instrumentos de política económicos, institucionales y legales, que puedan mejorar la capacidad institucional para el desarrollo comercial de la biotecnología, desarrollar instrumentos económicos para atraer inversiones públicas y privadas que generen empresa y productos, revisar y adecuar el marco normativo de uso de los recursos genéticos y evaluar la creación de una empresa nacional de biotecnología (Conpes, 2011).

Colombia puede posicionar la investigación en biotecnología como uno de los principales motores del sistema productivo económico, pero debe enfrentarse a tres retos fundamentales, a saber: 1) Que la educación superior sea el punto de referencia (Hernández, 2008); A nivel nacional no existen programas académicos de pregrado en biotecnología, aunque existen carreras como la biología que hacen énfasis en biotecnología en la Universidad del Tolima, La Corporación Universitaria Minuto de Dios, la Universidad Nacional, la Universidad Inca y la Universidad de Antioquia; en la UNAD se ofrece una especialización en

Biotecnología Agraria y en la Universidad Nacional de Colombia se ofrece un doctorado en Biotecnología (Forero, 2011). 2) Consolidar todas las redes, alianzas posibles y clusters (bio-regiones); 3) Formar profesionales en diferentes disciplinas que permitan el desarrollo de la biotecnología en todos sus campos, incluyendo aspectos como el mercadeo y el manejo empresarial (Hernández, 2008).

Cuando se trate el tema de biotecnología se debe contemplar la planeación estratégica del sector forestal en Colombia, con la intención de producir proyectos y planes de negocio que orienten los recursos hacia el desarrollo de programas académicos nuevos o existentes incluyendo áreas como mejoramiento genético, biotecnología, biología molecular, bioinformática, entre otras importantes materias.

Colciencias, propone siete (7) estrategias para volver el conocimiento parte integrante de la conciencia en la sociedad nacional, comprometiendo al estado, al sector empresarial, a la educación, a la organización social, la cooperación internacional y a los medios de comunicación en la creación, desarrollo y fomento de una cultura científica y tecnológica: 1) Nueva institucionalidad para el conocimiento; 2) Inversión sostenible y concertación de esfuerzos para la ciencia, la tecnología y la innovación; 3) Incremento del capital humano formado para la investigación y la innovación; 4) Integración de la ciencia, la tecnología y la innovación a la cultura nacional; 5) Compromiso de los empresarios con la innovación y el desarrollo tecnológico; 6) Fortalecimiento de la investigación para hacerla competitiva internacionalmente; y 7) Posicionamiento de la ciencia, la tecnología y la innovación como actividades claves del desarrollo de las regiones (Hoyos, 2006).

Universidades y el gobierno nacional deben impulsar la investigación, a partir de la creación a nivel nacional de un programa de biotecnología agraria en donde se cuente con bases de datos, infraestructura, investigadores e impulsores y con su propio presupuesto de financiación.

En Colombia existen instituciones e investigadores capacitados en la aplicación de las herramientas y técnicas de la biotecnología para diversidad de áreas de estudio incluyendo la silvicultura. También se conoce que desde la década del 90, el país se ha preocupado por reconocer los trabajos científicos adelantados en la región. Existen entidades del gobierno, ONG's, y centros de investigación particulares que incentivan la investigación en biotecnología en Colombia, a través de programas de financiación o a partir de alternativas para la comercialización de los productos obtenidos de sus ensayos. Para que las investigaciones en biotecnología puedan tener un impacto mayor en los distintos frentes de desarrollo del país, se han creado diversidad de normativas, políticas y planes, que propician un ambiente seguro para la práctica de esta tecnología.

Se espera que la biotecnología produzca cambios profundos en la forma de producción silvícola colombiana, así como ha sucedido ya en los países desarrollados, pero es necesario profundizar en muchos conocimientos, con la intención de fomentar estrategias de mejoramiento y conservación de germoplasma forestal; es posible que la cooperación regional e internacional contribuya al desarrollo de la nueva biotecnología del país.

4. CONCLUSIONES.

- Existe diversidad de participantes, que hacen posible la existencia y el uso de la biotecnología en el país, entre ellos, universidades públicas y privadas, ONG's, entidades particulares y del gobierno; pero su aporte al conocimiento es aún incipiente y falta consolidar sus investigaciones.
- Colombia depende aún, de los adelantos realizados por otros países y no de sus propios avances, debido en gran medida al escaso desarrollo de sus políticas, a que no existen suficientes programas de financiamiento, hay escasa participación científica de las distintas instituciones, falta de preparación del personal, instalaciones no adecuadas y escasa divulgación de los conocimientos en ciencia y tecnología.
- Se cuenta en el país con potencial biológico, grandes extensiones de bosque y tierras con aptitud forestal; pero no es suficiente, si Colombia quiere aumentar sus rendimientos y consolidar el mercado de la madera a nivel mundial, debe desarrollar programas inmediatos de mejoramiento genético y propagación de material vegetal con ayuda de las herramientas de la biotecnología, para implementar plantaciones extensivas de árboles genéticamente modificados con caracteres novedosos y particularmente valiosos.

5. REFERENCIAS.

Alba, J., Hernández, L., & Márquez, J. (2008). El Mejoramiento Genético Forestal y las Pruebas establecidas en Veracruz. *Foresta Veracruzana*, No. 1. 25-29.

Araya, E., Murillo, O., Aguilar, G., & Rocha, O. (2005). Uso de los Marcadores Genéticos en Silvicultura Clonal. *Revista Forestal*, 6, 1-14.

Arias, A. (2005). Colombia: Un País de Oportunidades para la Inversión Forestal. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. República de Colombia. Ed: Papel y Plástico Impresiones LTDA.

Arias, S. (1994). Campos y Perspectivas de la Biotecnología: una Estrategia para su introducción en el istmo Centroamericano. Panamá. Ed: CADESCA.

Azofeifa, A. (2006). Uso de Marcadores Moleculares en Plantas; Aplicaciones en Frutales del Trópico. *Agronomía Mesoamericana*, 17, 221-242.

Azpíroz, S. (1994). La Biotecnología y el Sector Agropecuario. *Agronomía Mesoamericana*, 140-158.

Barrios, D., García, V., Osorio, L., Isaza, N., Palacio, J., García, F. y Sánchez, A. (2004). Análisis de Diversidad Genética de Colecciones élite de *Eucalyptus*, por medio de Marcadores Moleculares Microsatélites. *Fitotécnia Colombiana*, 4, 96-106.

Beas, C., Ortuño, D., & Armendáriz, J. (2004). Biología Molecular. Fundamentos y Aplicaciones. Ed: Mg Graw Hill.

Becerra, V., & Paredes, M. (2009). Uso de Marcadores Moleculares en la Certificación Genética Forestal. *INIA, Tierra adentro*, 2, 36-39.

Cadavid, S., Hernández, C., Hoyos, R., Medina, M., & Restrepo, L. (2006). Estudios Preliminares en la Estandarización de un Protocolo para la Obtención de callos Embriogénicos en dos Clones de Caucho (*Hevea Brasiliensis*) de Diferentes Orígenes Geográficos. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 3, 32-47.

Campos, H., & Seguel, I. (1999). Biotecnología y Recursos Genéticos Vegetales. Instituto de Investigaciones Agropecuarias Carillanca, Centro Regional de Investigación, Temuco, Chile.

CONIF. (2004). Programa de Investigación en Semillas Forestales de Especies Nativas. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural. Corporación Nacional de Investigación y Fomento Forestal.

CONIF. (2013). Investigación en Especies Forestales. En: www.conif.org/portafolio-de-proyectos/proyectos-ejecutados/

Castellanos, O, Jiménez, C, & Montañez, V. (2006). Generación de una Política Pública en Biotecnología a partir de un Modelo de Inteligencia Tecnológica. Primer Congreso Iberoamericano de Ciencia, Tecnología, Sociedad e Innovación.

Castro, D. y Sánchez, G. (2010). Propagación Clonal *in vitro* de *Eucalyptus pellita* F. Muell a partir de Árboles plus. Universidad Católica de Oriente. Antioquia, Colombia.

CONPES. (2003). Política de Estímulo a la Reforestación Comercial en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Bogotá-Colombia.

CONPES. (2011). Documento Conpes. Consejo Nacional de Política, Económica y Social. Departamento Nacional de Planeación. Bogotá, Colombia. P. 36.

CONIF. (2008). Sector Forestal en Colombia. Bogotá.

Corona, M. (2000). Historia de la Biotecnología y sus Aplicaciones. Obtenido de http://siladin.cch-orientе.unam.mx/coord_area_cienc_exp/biologia/GuiaBiol/ANEXO_5Ing.pdf.

Daparo, C. (2005). Primer Informe Sectorial Biotecnológico de la provincia de Mendoza. Instituto de Desarrollo Industrial, Tecnológico y de Servicios, Mendoza.

Daquinta, M., Lezcano, Y., Cid, M., Pina, D., & Rodríguez, R. (2005). Morfogénesis in vitro de *Toona ciliata* a partir de Raquis de Hojas jóvenes con tidiazuron. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 5-9.

Dominguez, M., González, M., Rosales, C., Quiñones, C., Delgadillo, S., Mireles, S., y otros. (2008). El cultivo in vitro como Herramienta para el Aprovechamiento, Mejoramiento y Conservación de Especies del Género *Agave*. *Investigación y Ciencia*, 41, 53-62.

Estopá, M. (2005). El cultivo in vitro en la reproducción vegetativa en plantas de vivero. *Revista, Extra*, 1, 50-56.

Faloci, M., Medina, R., Olmos, S., Scocchi, A., & Mroginski, L. (2000). Análisis Bioquímico y Molecular de Plantas Crioconservadas de Paraíso Gigante (*Melia Azedarach L var. gigantea*). Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes, Argentina.

FAO. (2010). Biotecnologías Agrícolas en los Países en Desarrollo: Opciones y Oportunidades en los Sectores Agrícola, Forestal, Ganadero, Pesquero y Agroindustrial para hacer frente a los desafíos de la inseguridad alimentaria y el cambio climático. Guadalajara, México.

FAO. (2010). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Obtenido de: <http://www.fao.org/biotech/sectoral-overviews/biotech-forestry/es/>.

FAO, FLD & IPGRI. (2004). Conservación y Ordenación de Recursos Genéticos Forestales. Instituto Internacional de Recursos Fitogenéticos, Roma, Italia.

Forero, G. (2011). Estado del Arte de la Biotecnología en Colombia. Universidad EAN. Bogotá, Colombia. P. 51.

Gallo, L., Marchelli, P., Azpilicueta, M. y Crego, P. (2006). El Uso de Marcadores Genéticos en el género *Nothofagus* con especial Referencia a Raulí y Roble. *Bosque*, 27, 3-15.

Gonzaga, L. (2004). Marcadores Moleculares AFLP de Plantas Donadoras de Aliso *Alnus acuminata* H.B.K. *Scientia Et Technica*, 10, 285-289.

González, E. (2008). Análisis de la Diversidad Genética en Poblaciones Naturales de Especies Vegetales Amenazadas: *Ilex perado* spp. *lopezlilloi* (Aquifoliaceae), *Silene nocteolens* (Caryophyllaceae) y *Sorbus aria* (Rosaceae). Resultados Preliminares. tesis de grado, Univeridad de las Palmas de Gran Canaria.

González, C., Villa, J., y Velasco, R. (2007). Biotecnología: Desde el Punto de Vista de los Negocios. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad del Cauca. 32p.

Gonzalos, C., & Vilca, J. (1998). Micropropagación Vegetativa in vitro de aliso (*Alnus acuminata*). Cajamarca, Perú. Ed: Talleres Gráficos de ADEFOR.

Gutierrez, B., Quintero, P., Nieto, V., & Murillo, O. (2003). Enfoques Cooperativos para el Mejoramiento Genético y Conservación de los Recursos Forestales en Chile, Colombia y Costa Rica. *Invest. Agrar.: Sist. Recur. For*, 12, 111-122.

Haines, R. (1994). La Biotecnología en el Mejoramiento de Especies Arbóreas Forestales: Tendencias y Prioridades de la Investigación. *Unasyva*, 45, 46-52.

Haines, R. (1994). El Papel de la Biotecnología en el Mejoramiento de las Especies Forestales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación.

Hernández, M. (2008). Propuesta de Apoyo para una Gestión Eficiente de la Biotecnología. *Revista Escuela de Administración y Negocios*, 62, 5-26.

Hoyos, Z. (2006). 75 Maneras de Generar Conocimiento en Colombia. Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología (Colciencias). Ed: Panamericana Formas e Impresos S.A. Bogotá, Colombia. 212.

IICA. (1989). Oportunidades de las Biotecnologías en América Central. Centro Interamericano de Documentación e Información Agrícola, San José, Costa Rica.

Jara, L. (1997). Secado, Procesamiento y Almacenamiento de Semillas Forestales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza, Turrialba - Costa Rica.

León, J. (2009). La Biotecnología ya está en la Mira de Colombia. Obtenido de: <http://www.eltiempo.com/archivo/documento/CMS-5258188> eltiempo.com.

Marchadier, H., & Sigaud, P. (2005). Los Álamos en la Investigación Biotecnológica. *Unasyva*, 56, 38-39.

Martínez, R., Azpiroz, H., Rodríguez, J., & Cetina, V. (2003). Aplicación de la Biotecnología en los Recursos Genéticos Forestales. *Revista Chapingo*, 1, 17-34.

Martínez, R., Azpiroz, H., Rojo, G., Rodríguez, J y Ramírez, B. (2010). Biotecnología Aplicada a los Recursos Forestales. Universidad Autónoma Indígena de México. México.

Martínez, W. (2007). Caracterización Morfológica y Molecular del cacao Nacional Boliviano y de Selección élite de Alto Beni, Bolivia. CATIE. Turrialba, Costa Rica.

Marulanda, M., López, A., Uribe, M., & Ospina, C. (2011). Caracterización de la Variabilidad Genética de Progenies de *Cordia alliodora (R y P) Oken*. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Colombia. Pereira, Colombia.

Marulanda, M., Claroz, J y López, A. (2006). Caracterización Molecular de Progenies de Aliso (*Alnus acuminata*) sp. Acuminata, Mediante Marcadores AFLP. Universidad Tecnológica de Pereira. *Scientia et Technica*, 32.

Mederos, S., Plasencia, I., & Varela, C. (2002). La Biotecnología Vegetal: Obtención de Plantas in vitro. Universidad de Laguna, Tenerife, España.

Moreno, J. (2007). Marcadores Moleculares en la Mejora Genética de Plantas. Centro de Investigaciones Agrarias de Mabegondo, La Coruña, España.

Morris, M. (1989). Historia de la biotecnología. *Ciencia y Desarrollo*, 14, 19-32.

Muñoz, M. (2007). *Biotecnología*. Ed: Universidad Nacional de Quilmes. Argentina.

Nieto, J., Ramos, L., & Motte, E. (2005). Extracción y Purificación de ADN de *Tectona grandis* L. Para su Empleo en la Técnica RAPD. *Revista Foresta Veracruzana*, 7, 1-6.

ONUDI. (2004). Biotecnología al Servicio del Desarrollo Forestal. *Actualidad*, 1, 4-5.

Orozco, L. (2006). Manejo y Gestión de la Biotecnología Agrícola Apropriada para Pequeños Productores. Estudio de caso Colombia. Bogotá-Colombia.

Ortiz, O., & Koch, L. (2011). Estudio de Masificación Clonal de Genotipos Forestales Selectos Generados en Programas de Mejoramiento Genético de INFOR. Chile.

Palmberg, C. (1998). El Estado Actual de las Plantaciones Forestales en América Latina y el Caribe y el Exámen de las Actividades Relacionadas con el Mejoramiento Genético. Roma, Italia.

PIZANO. (2011). Actividad Forestal. Resultados de Investigación y Monitoreo. En: www.pizano.com.co/actividad_forestal/default3.asp

Pérez, J., Mesén, F., Hilje, L., & Aguilar, M. (2001). Desarrollo de un Método de Micropropagación Aplicable a Genotipos Selectos de *Cedrela odorata*. *Revista Forestal Centroamericana*, 5, 67-71.

PROEXPORT. (2013). Inversión en el Sector Forestal en Colombia. En: www.inviertaencolombia.com.co/sectores/agroindustria/forestal.html

PROEXPORT. (2010). Sector Forestal en Colombia. En: www.proexport.com.co.

REFECOSTA. (2013). Resumen Plan Forestal 2013-2020. Bogotá, Colombia. 32p.

Restrepo, J. (2011). Plan de Acción para la Reforestación Comercial. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Roca, M., Amézquita, M., Villalobos, V., & Mroginski, L. (1988). Desarrollo de la Biotecnología Agrícola en América Latina y el Caribe. Cali, Colombia.

Roca, W., & Ramírez, H. (2000). Introducción a la Biotecnología Vegetal. Centro para el Desarrollo Agropecuario y Forestal (CEDAF). Cali, Colombia.

Romero, G. (2008). Biotecnología: Generalidades, Riesgos y Beneficios. Obtenido de: <http://es.scribd.com/doc/151327871/Generalidades-y-Riesgos-de-La-Biotecnologia>.

Ruane, J., & Zimmermann, M. (2003). Biotecnología Agrícola para Países en Desarrollo. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma-Italia.

Sánchez, M., Rios, D., Pedroza, M., Pereira, G., Castellanos, H., & Escobar, R. (2004). Propagación in vitro de *Nothofagus procera* ((Poepp. et Endl.) Oerst.) a Partir de Embriones Aislados. *Revista Bosque*, 25, 123-128.

Schuler, I., Baquero, S., Gaona, D., Vega, E., Rodríguez, J., Ramírez, C., y otros. (2005). Propagación in vitro de Material Seleccionado de *Tabebuia rosea* (Bertol.) DC (Ocobo) y *Cordia alliodora* (Ruíz y Pav). Okec (Nogal Cafetero). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 2, 39-50.

SMURFIT KAPPA. (2013). Investigación forestal. En: www.smurfitkappa.com/vhome/co/forestal/paginas/investigación.aspx

Tighe, M. (2004). Manual de Recolección y Manejo de Polen de Pinos Tropicales y Subtropicales Procedentes de Rodales Naturales. CAMCORE, Carolina del Norte - Estados Unidos.

Tinjacá, C. (2012). Biotecnología: Estado Actual y Tendencias. Colciencias, Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación. Colombia.

Trujillo, M. (2006). Conservación de Recursos Genéticos Forestales. *INIA*, 8, 28-30.

Torres, F. y Buitrago, G. (2008). Perspectiva de la Biotecnología Aplicada en el Sector Forestal en Colombia. Universidad de la Salle. Bogotá, Colombia.

Vallejo, A. (1998). Quince años de Mejoramiento Genético de la Ceiba Tolúa (*Bombacopsis quinata*) en Monterrey Forestal. Universidad Nacional de Colombia. Colombia.

Vargas, H., Bermejo, B., & Thomas, L. (2004). Manejo de Recursos Genéticos Forestales. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.

Vega, A., & Romero, L. (2006). Innovación tecnológica Forestal, Desarrollos y Desafíos Científico Tecnológicos en Chile. *Journal of Technology Management & Innovation*, 13, 71-82.

Vicente, M., & Andersson, M. (2006). DNA banks-Providing novel options for genebanks? International Plant Genetic Resources Institute. Rome, Italy.

Villalobos, V., & Thorpe, T. (1982). Micropropagación: conceptos, metodología y resultados. Turrialba, Costa Rica.

Walters, C., & Towill, L. (1995). Seeds and Pollen. National Center for Genetic Resources Preservation. Washington.

Wikipedia. (2013). Fundación Wikipedia, Inc. Obtenido de http://es.wikipedia.org/wiki/Historia_de_la_bioteconolog%C3%ADa.

Willan, R. (1991). Guía para la Manipulación de Semillas Forestales. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Roma-Italia.

Yanchuk, A. (2002). Papel e Implicaciones de la Biotecnología en el Sector Forestal. *UNASYLVA*, 204, 52-61.

Zapata, J., & hasbun, R. (2011). Mejoramiento Genético Acelerado Mediante Selección Genómica. *Bosque*, 32, 209-213.