



COLCIENCIAS

**PROGRAMA NACIONAL DE
BIOTECNOLOGÍA
PROYECTOS COFINANCIADOS
1991-1997**



**EDITORES
RAFAEL H. ARAMENDIS
ELIZABETH HODSON DE JARAMILLO**

**INSTITUTO COLOMBIANO
PARA EL DESARROLLO DE
LA CIENCIA Y LA TECNOLOGIA
FRANCISCO JOSE DE CALDAS, COLCIENCIAS**

PRESENTACION

la biotecnología es con la electrónica, las telecomunicaciones, la medicina y la agricultura. Una de las tecnologías de punta, que se presenta, como la última, es la biotecnología. En el XIII, muchos de los problemas básicos de la salud humana, la agricultura, la ganadería, la alimentación y el medio ambiente, que su potencial de energía producida a través de los campos tan diversos como la producción de plantas libres de enfermedades, la modificación genética de especies animales y vegetales son asociados a enfermedades, plagas o condiciones ambientales. Gracias al desarrollo de técnicas de identificación de patógenos en el hombre, los animales o las plantas, alternativas de producción de alimentos y medicamentos y mejoras en el tratamiento de residuos, entre otros.

Por su naturaleza es una actividad interes en apareamiento, con interacciones entre diferentes disciplinas y sectores, que permite, como resultado de su implementación, el logro de una mejor calidad de vida.

Colombia no ha sido ajena a los avances en biotecnología y se comienza a obtener los resultados de las inversiones realizadas antes y a principios de la década de los años 90, especialmente en salud humana, el sector agrícola y pecuario y el de medio ambiente.

Este libro refleja el estado de los proyectos de investigación en biotecnología, desarrollados con el apoyo de CIBIENCIAS, en diferentes sectores, pero en especial en el agrícola, como una respuesta a una comunidad científica, por los grupos de investigación y formación académica, su concreción en los años.

Se destacan los resultados obtenidos en temas como: a- biotecnología, por base en células fúngicas y bacterianas levadas, que promueven la formación de una red colombiana de investigadores en el área, y que han permitido que se adelanten esfuerzos para la producción comercial de los hongos, b- los programas orientados a la obtención de plantas resistentes a la Nematoda amarillo y la región, en el plátano y el brócoli; c- la identificación de virus y la obtención de plantas libres de virus en el cultivo de papa, d- la detección de virus asintomáticos de virus de la Tristeza de los cítricos (Citrus tristeza virus, CTV), uno de los grandes problemas de la producción en este cultivo, e- el empleo de técnicas de biología molecular en el cultivo de la vicia de plantas y el de hongos que como *Fusarium graminearum* y *F. moniliforme* son los principales problemas agrícolas más graves en el cultivo del café. El desarrollo de un sistema de producción de plantas transgénicas de café. En salud humana los logros más importantes se concretan en: a- la producción comercial de vacunas de diferentes tipos de bacterias en el caso de anticuerpos monoclonales, b- el desarrollo de productos comerciales para la producción de anticuerpos monoclonales, c- el desarrollo de métodos inmunológicos para la detección de anticuerpos monoclonales, d- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, e- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, f- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, g- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, h- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, i- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, j- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, k- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, l- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, m- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, n- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, o- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, p- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, q- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, r- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, s- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, t- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, u- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, v- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, w- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, x- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, y- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales, z- el desarrollo de anticuerpos monoclonales para la detección de anticuerpos monoclonales.

GERARDO MARTINEZ LOPEZ

Director y Programador
SUBDIRECTOR DE PROGRAMAS DE
DESARROLLO TECNOLÓGICO

OP. GRUPO DE INVESTIGACIÓN EN BIOTECNOLOGÍA

OP. INSTITUTO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

OP. INSTITUTO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA

OP. INSTITUTO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA



ISBN No. 958-9037-80-1

Copyright 1999
Instituto Colombiano para el Desarrollo
de la Ciencia y la Tecnología
Francisco José de Caldas, Colciencias.

Derechos reservados 1999
Instituto Colombiano para el Desarrollo
de la Ciencia y la Tecnología
Francisco José de Caldas, Colciencias.

Esta publicación ha sido preparada y editada
por el Programa Nacional de Biotecnología de Colciencias.
Colombia.

Diseño y Diagramación:
OP Gráficas

PRESENTACION

La biotecnología es con la electrónica, las telecomunicaciones, la informática y los nuevos materiales, una de las tecnologías de punta, que se presenta, como la alternativa, para solucionar en el siglo XXI, muchos de los problemas básicos de la salud humana, la agricultura, la ganadería, la alimentación y el medio ambiente, pues su potencial de entregar productos o servicios, incluye campos tan diversos como la producción de plantas libres de enfermedades, la transformación genética de especies animales y vegetales con resistencia a enfermedades, plagas o condiciones ambientales adversas, el desarrollo de técnicas de identificación de patógenos en el hombre, los animales o las plantas, alternativas de producción de alimentos y medicamentos y mejoras en el tratamiento de residuos, entre otros.

Por su naturaleza es una actividad intensa en conocimiento, con interacciones entre diferentes disciplinas y sectores, que permite, como resultado de su implementación, el logro de una mejor calidad de vida.

Colombia no ha sido ajena a los desarrollos en biotecnología y se comienza a obtener los resultados de las inversiones realizadas antes y a principios de la década de los años 90, especialmente en salud humana, el sector agrícola y pecuario y el de medio ambiente.

Este libro refleja el estado de los proyectos de investigación en biotecnología, desarrollados con el apoyo de COLCIENCIAS, en diferentes sectores, pero en especial en el agrícola, como una respuesta a una comunidad científica, cuyos grupos de investigación y formación académica, se concentran en esa área.

Se destacan los resultados obtenidos en temas como: a.- biopesticidas, con base en *Bacillus thuringiensis* y *Beauveria bassiana*, que promovieron la formación de una red colombiana de investigadores en el tema, y que han permitido que se adelanten esfuerzos para la producción comercial de los mismos; b.- los programas orientados a la obtención de plantas resistentes a la Sigatoka amarilla y la negra, en el plátano y el banano; c.- la identificación de virus y la obtención de plantas libres de ellos en maracuyá y papa; d.- la detección de varios aislamientos del virus de la Tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza closterovirus*, CTV), uno de los grandes limitantes de la producción en éste cultivo; e.- el empleo de técnicas de biología molecular en el diagnóstico de virus de plantas y el de hongos que como *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, es uno de los problemas sanitarios más graves en el cultivo del clavel; f.- desarrollo de sistemas orientados a la producción de plantas transgénicas de café. En salud humana los logros más importantes se concentran en a- la producción comercial de sistemas de diagnóstico basados en el uso de anticuerpos monoclonales; b- el desarrollo de productos comerciales para la tipificación de antígenos HLA-DR, en remplazo de métodos serológicos tradicionales; c.- el uso de la hibridación *in situ*, para la detección de defectos genéticos en individuos afectados o asintomáticos, como paso fundamental para la prevención y el diagnóstico de enfermedades; y d- la producción del alérgeno mayor del ácaro *Blomia tropicalis*, que permitirá estudiar la proteína y los procesos utilizados para su purificación.

Es importante resaltar que en los campos de la aplicación ambiental y pecuaria, se han comenzado a mostrar resultados muy alentadores, a pesar de lo reciente de la iniciación de los estudios, y de contar con una comunidad científica más reducida. Se destacan los proyectos de tratamiento de aguas residuales, que han recibido premios nacionales por su alta calidad científica, lo mismo que los proyectos sobre tuberculosis, brucelosis y leptospirosis bovina, y los trabajos que se adelantan con algunas razas de ganado criollo bovino, que han permitido por primera vez en Colombia crear un banco de embriones de estas razas y evaluar la respuesta de los animales a los tratamientos superovulatorios.

GERARDO MARTINEZ LOPEZ
SUBDIRECTOR DE PROGRAMAS DE
DESARROLLO CIENTIFICO Y TECNOLOGICO

INTRODUCCION

La definición de una agenda estratégica para las actividades de biotecnología en el país requiere conocer de cerca las dinámicas de las comunidades de investigadores e innovadores en universidades, centros de investigación y empresas de base biotecnológica.

La Secretaría Técnica del Programa Nacional de Biotecnología de COLCIENCIAS, en respuesta a las estrategias planteadas por el Consejo del Programa, relacionadas con la adquisición de una capacidad de monitoreo y como un insumo para la realización de actividades prospectivas en biotecnología, implementó un programa de seguimiento de la actividad científica y tecnológica, que incluye : el reconocimiento de la infraestructura de investigación y desarrollo en biotecnología ; la caracterización de la comunidad científico-tecnológica y la valoración de los aportes de los grupos de investigación medidos en términos de la producción de bienes, servicios y/o publicaciones científicas en el país o en el exterior.

Como fruto de estos esfuerzos hoy el país conoce la dinámica de su comunidad de biotecnología, categorizada por grupos de investigación ; líneas temáticas ; grados de especialidad académica ; necesidades y oferta de capacitación, vínculos de cooperación nacional e internacional, publicaciones efectuadas y proyectos financiados, entre otros.

Esta nueva edición corregida, y ampliada del libro " Biotecnología. Cinco años de Investigaciones en Colombia. 1991 - 1996 ", actualiza hasta 1997 la información relacionada con los proyectos cofinanciados por el Programa de Biotecnología a grupos de investigación localizados en universidades, centros de investigación y empresas y hace parte de una serie de publicaciones del Programa que incluye los siguientes títulos :

- Tecnologías de la Vida para el Desarrollo, 1993
- Directorio de Biotecnología. Colombia. 1995
- Biotecnología. Cinco años de Investigaciones en Colombia. 1991 - 1996
- Biotecnología en Colombia. Grupos de Investigación, 1998
- Biotechnology in Colombia. Research Groups, 1998

En esta misma colección de biotecnología, se encuentran disponibles otros títulos en temas relacionados con el marco legal de la biotecnología y la aplicación de ésta a la ciencia y la tecnología de alimentos, que comprenden :

- Biotecnología. Legislación y Gestión para América Latina y el Caribe. 1994
- Procesamiento y Conservación de Alimentos en América Latina y el Caribe, Volumen I. 1996
- Procesamiento y Conservación de Alimentos en América Latina y el Caribe, Volumen II. 1997

Esta publicación recoge la actividad investigativa de 61 proyectos cofinanciados por el programa de biotecnología, desde su creación en 1991 hasta 1997. El libro se divide en dos secciones, clasificadas de acuerdo con su respectivo campo de aplicación: agrícola, ambiental, industrial, salud humana y pecuario. La primera sección presenta los resultados de 30 proyectos de investigación, ya concluidos, dentro de los que se incluye 16 proyectos en el campo agrícola, 6 en los campos de industria y 6 en salud, y proyectos adicionales en temas relacionados con medio ambiente y aplicaciones de la biotecnología al campo pecuario. La segunda sección entrega los resultados de 31 proyectos que actualmente se encuentran en ejecución y que comprende 18 proyectos del campo agrícola, 5 del campo industrial, 4 del campo pecuario, 3 de salud humana y uno en temas relacionados con medio ambiente.

Esta edición se encontrará disponible a partir de abril de 1999 en la home page del Nodo Colombia del Sistema de Información Especializada en Biotecnología y Tecnología de Alimentos, SIMBIOSIS de la Organización de Estados Americanos, OEA, [http : // www.colciencias.gov.co/simbiosis/](http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/)

AGRADECIMIENTOS

El Programa Nacional de Biotecnología de Colciencias desea expresar sus agradecimientos a las siguientes personas y entidades :

A los grupos de investigación, investigadores y coinvestigadores de los proyectos cofinanciados por el Programa Nacional de Biotecnología quienes mediante la publicación de los respectivos informes finales o de avance hicieron posible esta edición.

A todos los miembros del Consejo del Programa Nacional de Biotecnología por la total y permanente colaboración y apoyo con cada una de las actividades de la Secretaría Técnica del Programa de Biotecnología.

Al doctor Hernan Jaramillo, Subdirector de Programas Estratégicos de COLCIENCIAS por su muy valiosa y desinteresada colaboración, y gracias a quien fue posible hacer realidad esta nueva edición revisada y actualizada.

Al doctor Gerardo Martínez López, Subdirector de Programas de Desarrollo Científico y Tecnológico de COLCIENCIAS por su colaboración en la revisión del manuscrito.

A la Señora Mariana Delgado por su permanente y decidida colaboración durante cada una de las etapas de preparación de este libro.

AGRADECIMIENTOS

1977

El presente trabajo es el resultado de un estudio que se realizó en el marco de un convenio de colaboración entre el Instituto de Estudios Económicos y Sociales de la Universidad de Chile y el Departamento de Economía de la Universidad de California, San Diego.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

Agradece también al Comité de Estudios Económicos de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

Agradece también al Comité de Estudios Económicos de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

Agradece también al Comité de Estudios Económicos de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

Agradece también al Comité de Estudios Económicos de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

Agradece también al Comité de Estudios Económicos de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

Agradece también al Comité de Estudios Económicos de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

El autor desea agradecer a los señores profesores de la Universidad de Chile, especialmente a los señores profesores de Economía, por haberle permitido realizar este estudio en el país.

INDICE

TITULO DEL PROYECTO	Pág.
PRIMERA SECCIÓN: PROYECTOS FINALIZADOS	
1. BIOTECNOLOGIA AGRICOLA	
Adaptación de técnicas de micropropagación en tres especies frutícolas	15
Aislamiento de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> activas contra coleopteros por amplificación por PCR con iniciadores específicos de genes Cry	17
Aislamiento y caracterización del ADN plasmidico de bacterias útiles en control biológico	19
Aplicación de la biotecnología apropiada para la producción de proteína unicelular a partir de <i>Spirulina máxima</i>	21
Biología molecular del virus de la tristeza cítrica: aislamiento, purificación y caracterización molecular de algunas cepas de virus benignos y severos que afectan a los cítricos en Colombia	23
Biotecnología al servicio de los agricultores colombianos: desarrollo y multiplicación de variedades resistentes a las sigatocas amarilla y negra en plátano y banano y producción de variedades libres de virus en maracuyá y papa	25
Caracterización biológica y molecular de cepas nativas de <i>Bacillus thuringiensis</i> para el control de insectos plaga en agricultura	27
Caracterización de las proteínas y los genes responsables de la toxicidad de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i>	29
Caracterización molecular de genes Cry y efectos biológicos de la delta endotoxina de cepas de <i>Bacillus thuringiensis</i> (Berliner) recolectadas en diferentes regiones de Colombia	30
Conservación genética in vitro de <i>Passifloras</i>	33
Desarrollo de nuevos métodos de diagnóstico para virosis vegetales	35
Desarrollo de un sistema para la producción de plantas transgénicas de café	36
Estudio del genoma de la yuca mediante las técnicas de RFLP's y RAPD's	38
Obtención de plantas transgénicas de papa resistentes al virus X de la papa y al virus del enrollamiento de la hoja de papa mediante transformación con <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	39
Producción de bioinsecticidas bacterianos contra insectos plaga del algodón y otros cultivos de importancia económica	41
Selección y propagación de nogal cafetero (<i>Cordia alliodora</i>), aliso (<i>Alnus acuminata</i>) y mora (<i>Rubus glaucus</i>) por cultivo de tejidos in vitro	42
II. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL	
Evaluación de microalgas en biorreactores para el tratamiento terciario de aguas residuales agroindustriales	47
III. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL	
Aumento de la producción de solventes por <i>Clostridium acetobutylicum</i>	51
Extracción y caracterización de las pectinas de frutas tropicales	53
Extracción y caracterización de la pectina de mora de castilla (<i>Rubus glaucus</i>)	55

Extracción y caracterización de la pectina de uchuva (<i>Physalis peruviana</i>)	56
Obtención y caracterización de pectina a partir de desechos industriales de mango (cascara)	57
Producción de pectinasa por fermentación sumergida utilizando desechos cítricos como sustrato	59

IV. BIOTECNOLOGIA PECUARIA

Desarrollo de un nuevo método diagnóstico para la tuberculosis bovina utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	63
---	----

V. BIOTECNOLOGIA SALUD

Diseño de sondas de ADN para el diagnóstico de la fenilcetonuria	69
Estandarización y aplicación de la técnica de hibridación <i>in situ</i> en el diagnóstico de enfermedades genéticas	71
Estudios de caracterización bioquímica de hormonas hipofisarias humanas	72
Mapas de expresión, ensayos de transcripción y genotecas de sustracción en <i>Saccharomyces cerevisiae</i> en condiciones de stress. Una propuesta para el desarrollo de una metodología	74
Producción comercial de reactivos para hemoclasificación basados en la generación y uso de anticuerpos monoclonales anti-grupos sanguíneos A y B	76
Producción del alérgeno mayor del acaro <i>Blomia tropicalis</i> mediante tecnología del ADN recombinante	78

SEGUNDA SECCION: PROYECTOS EN EJECUCIÓN

I. BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

Caracterización genética del patosistema <i>Phytophthora infestans/Solanum tuberosum</i> y su relación con polimorfismos moleculares	83
Caracterización isoenzimática y molecular de clones de plátano de la colección colombiana de <i>Musaceas</i>	85
Caracterización y obtención de cepas mejoradas de hongos entomopatógenos	87
Clonaje y expresión del gen de la toxina de 98 kDa de <i>Bacillus thuringiensis</i> sbsp. <i>medellin</i> en una cianobacteria de los criaderos de larvas de mosquito de Colombia	89
Contribución al desarrollo de sistemas de transformación genética para la obtención de plantas resistentes a la broca del café <i>Hypothenemus hampei</i>	91
Desarrollo de métodos de diagnóstico para el potyvirus que infecta maracuya, <i>Passiflora edulis</i> sims, en el Valle del Cauca	92
Desarrollo de un método diagnóstico para <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>dianthi</i> utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR)	94
Desarrollo de un sistema diagnóstico para <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>dianthi</i> utilizando técnicas de biología molecular	95
Evaluación de cepas de <i>Trichoderma</i> para el control de la hormiga arriera <i>Atta cephalotes</i>	96
Expresión de los genes de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>medellin</i> en cepas tóxicas y no tóxicas de <i>Bacillus thuringiensis</i> y <i>Bacillus sphaericus</i>	98
Identificación y aislamiento de genes de resistencia a sigatoka negra de germoplasma de banano	99

Identificación y control de los virus que afectan el cultivo de maracuyá (<i>Passiflora edulis</i>) en Colombia	101
Incidencia, distribución y tipos de cepas virales de tristeza cítrica (CTV) en un área de 350 hectareas del Departamento de Antioquia. Establecimiento de una colección de cepas suaves de CTV con potencial para ser utilizadas en pruebas de protección cruzada	102
Ingeniería genética para la resistencia al virus del mosaico del pepino Cucumber mosaic <i>cucumovirus</i> (CMV) en especies comerciales de <i>Musa spp.</i> en Colombia	103
Marcadores moleculares para la caracterización genotípica de <i>Rubus glaucus</i> y dos especies forestales <i>Cordia alliodora</i> y <i>Alnus acuminata</i>	105
Micropropagación de materiales juveniles y ensayos de revigorización de materiales adultos de especies forestales (<i>Decussocarpus rospigliosi</i> (Pilger) de laub y <i>Quercus humboldtii</i> Bondpland) utilizables en cuencas hidrográficas de Boyaca	107
Producción de avispa <i>Cephalonomia stephanoderis</i> para el control biológico de la broca del café	108
Propagación in vitro y caracterización molecular de la especie forestal <i>Aniba perutilis</i> Hemsley y la especie <i>Musa acuminata</i> Collar seleccionadas como promisorias por la comunidad del Alto San Juan, Risaralda	109

II. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

Inmovilización de bacterias y microalgas en alginato para remover nitrógeno inorganico de aguas residuales agroindustriales	113
---	-----

III. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

Escalado del proceso de producción de la vacuna antitetánica	117
Estudio de una fructosiltransferasa de <i>Aspergillus niger</i> en la síntesis de fructooligosacaridos	119
Bioconversión extractiva para la producción de <i>Mucor Miede's</i> Rennet	120
Producción por fermentación en levaduras del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B por tecnología del ADN recombinante	121
Purificación y estudio de las propiedades de las peptidasas del hepatopancreas del cangrejo <i>Paralithodes camtschatica</i>	122

IV. BIOTECNOLOGIA PECUARIA

Aplicación de la biotecnología animal para la preservación y propagación de ganado criollo Colombiano	127
Caracterización molecular y serológica de cepas de <i>Leptospira hardjo</i> y <i>Leptospira spp.</i> aisladas en ganado de leche de la sabana de Bogotá	129
Selección genética para resistencia natural contra brucelosis y aftosa en ganado criollo Colombiano	131
Genética molecular y poblacional de ganado criollo Colombiano	134

V. BIOTECNOLOGIA SALUD

Desarrollo de pruebas de detección para hormonas (TSH hCG) basadas en el uso de anticuerpos monoclonales	139
Desarrollo de un producto comercial para la tipificación de antígenos HLA-DR mediante la técnica de PCR-SSP	140
Estudio de la variación molecular en individuos y su utilidad en la criminalística en Colombia	141

100
101
102
103
104
105
106
107
108
109
110
111
112
113
114
115
116
117
118
119
120
121
122
123
124
125
126
127
128
129
130
131
132
133
134
135
136
137
138
139
140
141
142
143
144
145
146
147
148
149
150
151
152
153
154
155
156
157
158
159
160
161
162
163
164
165
166
167
168
169
170
171
172
173
174
175
176
177
178
179
180
181
182
183
184
185
186
187
188
189
190
191
192
193
194
195
196
197
198
199
200

Primera sección

PROYECTOS FINALIZADOS

PROYECTOS FINALIZADOS

I. BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

B I O T E C N O L O G Í A A G R Í C O L A

ADAPTACION DE TECNICAS DE MICROPROPAGACION EN TRES ESPECIES FRUTICOLAS

INVESTIGADOR PRINCIPAL: CLAUDIA MARIA PELAEZ[1].

(1) Centro Frutícola Andino. Carrera 4°No. 8-39. Cali
A.A. 34323. Teléfonos: (57-2) 803 206 - 813 129. Fax: (57-2) 807 836.

OBJETIVOS

- Utilizar nuevas biotecnologías, especialmente el cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para la multiplicación clonal de tres especies frutícolas: Cítricos: *Citrus sinensis* var. Valencia y var. Washington. Maracuyá: *Passiflora edulis* var. Flavicarpa degener y var. Púrpura sims. Piña: *Ananas comosus* var. Cayena y var. Manzana
- Realizar el fitosaneamiento del material vegetal mediante el uso de técnicas para el aislamiento y cultivo de meristemas y/o termoterapia o microinjertación con miras a entregar al fruticultor material vegetal libre de los cinco principales virus con mayor incidencia sobre la producción.

RESUMEN

La fruticultura colombiana, en los últimos años, ha venido evolucionando en respuesta a la demanda de calidad, tanto por el consumidor nacional como internacionales, lo que ha conducido a una mayor tecnificación de los cultivos.

Uno de los problemas que aún no se ha resuelto es la producción de material de propagación de buena calidad, resistente o tolerante a enfermedades; así como el desarrollo de mecanismos de conservación de germoplasma con buenas características agronómicas. De las especies con mayor acogida en los mercados nacionales e internacionales están el maracuyá (*Passiflora edulis*) y la piña (*Ananas comosus*), por tal razón en este proyecto se desarrollarán y optimizarán técnicas de micropropagación para éstas especies.

Para el caso del maracuyá, en los cultivos se observó una alta variabilidad genética (heterocigocidad) por su polinización abierta y el sistema tradicional de propagación (sexual). Esto, unido a la disminución en el rendimiento ocasionado por la presencia de virus planteó la necesidad del desarrollo de metodologías que permitieron propagar masivamente aquellos clones con características agronómicas deseables (productividad, tamaño del fruto, resistencia a patógenos, adaptación a condiciones de estrés, etc.). Se pretendió utilizar técnicas de cultivo de tejidos vegetales *in vitro* para la micropropagación de maracuyá (*Passiflora edulis*, var. Flavicarpa y var. Púrpura sims) y piña (*Ananas comosus*, var. Cayena y var. Manzana); así como la limpieza del material vegetal mediante el empleo del cultivo de meristemas y/o termoterapia, o microinjertación.

Hasta el momento se ha establecido la metodología para la multiplicación *in vitro* de estas especies.

En maracuyá, se han obtenido los mejores resultados con el suministro simultáneo de las citoquininas Bencilaminopurina (BAP) y kinetina (K). Se encontró que BAP en concentraciones inferiores a 0,5

mg/L disminuye el crecimiento de los brotes durante la fase de iniciación. La mejor inducción del crecimiento de brotes a partir de nudos se observó con BAP y con K en un rango de concentración de 0,75/1,5 mg/L y de 1,05/2,1 mg/L respectivamente. La inducción de brotes con suministro BAP 1 mg/L es cerca de 75% menor que la obtenida con las dos hormonas suministradas simultáneamente.

En piña, se encontró que el empleo de yemas axilares de la corona e hijuelos y las del tallo principal presentan diferencias a nivel de desinfección y durante la etapa de iniciación. Las yemas axilares del tallo son muy difíciles de desinfectar y esto puede ser debido a su proximidad con el suelo lo que facilita una mayor contaminación. Con base en los resultados obtenidos se puede en teoría predecir que, a partir de 50 a 70 yemas axilares, se obtienen cerca de 15 millones de plantas en 18 meses.

Del complejo viral presente en Colombia en la especie *Passiflora edulis*, se estudiaron los virus filamentosos e isométrico, miembros de los Potyvirus y Tymovirus, respectivamente. Se encontró que el virus filamentosos aislado presenta un comportamiento diferente al observado para otros Potyvirus. Por ejemplo el PWV Virus del endosamiento del fruto del maracuyá (*Passion Fruit Woodiness Potivirus, PWV*), descrito en otras partes del mundo ocasiona una deformación en el fruto que no se ha observado en Colombia. La inoculación del virus aislado en *Nicotiana bentamina*, induce la formación de manchas en forma de anillo (mosaico fuerte) mientras que el PRV Virus de la mancha anular del maracuyá no las induce; Además no reacciona serológicamente con el suero anti/Potyvirus empleado para detectar, tanto a PWV como a PFDSV, ni con CMV (*Cocumber mosaic Cucumovirus, CMV*), lo cual sugiere la posibilidad de que sea un virus diferente a los descritos.

Por otra parte, los síntomas del Tymovirus aislado en Colombia, son semejantes a los descritos para el PYMV Virus del mosaico amarillo del maracuyá (*Passion Fruit yellow mosaic Tymovirus, PFYMV*), encontrado en Brasil. Ambos presentan un mosaico amarillo brillante y clorosis en hojas viejas.

AISLAMIENTO DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* ACTIVAS CONTRA COLEOPTEROS POR AMPLIFICACION POR PCR CON INICIADORES ESPECIFICOS DE GENES Cry

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MARIO ALBERTO POSADA (1);
MANUEL ELKIN PATARROYO (1).
COINVESTIGADORES: CLARISSA GARCIA (1); ALONSO LEYVA (1).

(1) Instituto de Inmunología. Hospital San Juan de Dios. Avda. 1, Carrera 10.
Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 233 9648. Fax: (57-1) 280 3999.

OBJETIVOS

- Aislar de diferentes suelos de la Sabana de Bogotá cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* que tengan actividad insecticida contra estadios larvales de coleópteros y posteriormente caracterizarlas mediante técnicas de Biología molecular.
- Aislar cepas de *Bacillus thuringiensis* y *Bacillus sphaericus* del suelo y de restos de insectos infectados en cultivos y pastos de diferentes zonas de la Sabana de Bogotá.
- Determinar cepas de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* activas contra larvas de coleópteros mediante la amplificación específica por PCR de genes CryIIIA, CryIIIB, CryIIIC, CryIIID, CryV y CryC.
- Establecer un banco de genes y un banco de cepas de *B. thuringiensis* y *B. sphaericus* aisladas y caracterizadas de diferentes suelos alrededor de la Sabana de Bogotá.
- Efectuar ensayos preliminares *in vivo* en condiciones de laboratorio.

RESUMEN

Cepas de *Bacillus thuringiensis* que muestran actividad contra la chiza, las larvas de coleópteros de la familia Scarabaeidae, fueron aisladas de muestras de suelo y de los tejidos intestinales de insectos enfermos recolectados de regiones agrícolamente importantes de Colombia. Las cepas aisladas fueron muestreadas por un ensayo de PCR utilizando iniciadores específicos para los diferentes genes Cry que han sido reportados en el pasado como activos contra insectos coleópteros. Varias de las cepas que mostraron amplificaciones positivas fueron luego probadas por ensayos *in vivo*, con actividad variable contra las chizas. La cepa 07-03, aislada del tejido intestinal de un insecto muerto encontrado en un pastizal infestado mostró resultados positivos al amplificarla con iniciadores para el gen CryIIIC, y mostró actividad insecticida contra larvas de segundo instar de chizas del género *Clavipalpus*.

Dado el hecho de que por lo menos seis genes diferentes han sido descritos en el pasado como activos contra larvas coleópteras, y debido a que se desea realizar el menor número posible de pruebas de PCR, se decidió construir un iniciador que amplificara el mayor número de genes en una reacción única. Análisis por FASTA (Genetics Computer Group, Madison, WI) fueron realizados sobre las 22 secuencias de genes encontradas en las bases de datos CD-ROM Entrez (NCBI, Bethesda, MD) correspondientes a los genes CryIII y Cry V. De éste análisis se concluyó que las

secuencias de los genes CryIIIA, CryIIIB, CryIIIB2 y CryIIID tenían suficiente homología entre sí en sus extremos 5 que un set de iniciadores (MP1 y MP2) y fueron suficientes para amplificar los cuatro genes. Los genes CryIIIC y CryV son diferentes, y por lo tanto se necesitan iniciadores que los amplifiquen por separado (MP11 y MP12, para el gen CryIIIC, y MP19 y MP20 para el gen CryV).

Cada uno de los cientos de cepas de *B. thuringiensis* aislada durante el curso de éste estudio fue sometido a ésta prueba utilizando tres reacciones de PCR: la primera utilizando los iniciadores MP1 y MP2, la segunda con los iniciadores MP11 y MP12 y la tercera con los iniciadores MP19 y MP20.

AISLAMIENTO Y CARACTERIZACION DEL ADN PLASMIDICO DE BACTERIAS UTILES EN CONTROL BIOLÓGICO

INVESTIGADORA PRINCIPAL: JENNY DUSSAN (1).
COINVESTIGADORES: DIANA ANDRADE (1); LUCIA LOZANO (1).

(1) Universidad de los Andes. Departamento de Ciencias Biológicas.
Centro de Investigaciones Microbiológicas (CIMIC). Carrera 1A No. 18A-70
Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo: 4976.

Teléfonos: (57-1) 286 9211 - 282 4066 - 284 9911. Fax: (57-1) 281 1890 - 281 5771 - 284 1570.
E-Mail: cimic@uniandes.edu.co

OBJETIVOS

- Aislar, identificar y seleccionar bacterias nativas utilizadas en control biológico, de diferentes zonas del país.
- Aislar y amplificar plásmidos toxigénicos de bacterias nativas utilizadas en control biológico.
- Aislar y caracterizar ADN plasmídico de las bacterias nativas aisladas: *Bacillus sphaericus*, *B. thuringiensis*.
- Clonar y amplificar ADN plasmídico toxigénico y/o genes cromosomales en *B. cereus* y *E. coli*.

RESUMEN

Desde que se introdujo el término, «control biológico», las bacterias esporoformadoras han sido ampliamente estudiadas, dado que la posibilidad de obtener productos tóxicos durante el proceso de esporogénesis, ha planteado el uso de éstas como una alternativa fundamental al empleo de pesticidas, fungicidas, etc., de carácter químico para el control de insectos patógenos, o vectores de enfermedades en animales y vegetales.

Los estudios genéticos tanto de ADN cromosomal como ADN plasmídico han establecido una relación entre la presencia de plásmido y/o genes cromosomales y la producción de proteínas tóxicas (p.e., toxina) en *B. thuringiensis* y organismos relacionados, así como en *B. sphaericus*.

En este proyecto a partir de muestras de agua, tierra, larvas y hojarasca recolectadas en diferentes zonas del país (Llanos Orientales, Costa Atlántica, Zona Cafetera y Costa Pacífica) se aislaron e identificaron 278 cepas de bacilos esporoformadores. Para su identificación se tuvieron en cuenta los criterios taxonómicos citados en el Manual Bergey y el empleo de cepas control obtenidas directamente de la ATCC o suministradas por otros grupos de investigación. Se emplearon para *B. thuringiensis* las cepas DH, DH2, IPS82 y H14; para *B. sphaericus* la cepa 2362.

Para la evaluación de la toxicidad de las cepas seleccionadas se realizaron bioensayos en larvas de tercer estadio de *Culex quinquefasciatus*, *Anopheles albimanus* y *Aedes aegypti*; 22 cepas presentaron mortalidad del 80-100% entre las 24 y las 72 horas. De estas, 19 fueron clasificadas

como *Bacillus sphaericus* y 3 como *Bacillus thuringiensis*. Las 22 cepas presentaron plásmidos de alto peso molecular y para correlacionar su toxicidad se realizó un ensayo de curaje por temperatura y por naranja de acridina encontrándose que 4 cepas nativas presentan plásmidos asociados con su toxicidad y comprobándose en una cepa por transformación que existe una variabilidad en cuanto a la estabilidad de estos plásmidos. Es importante resaltar que estas cepas constituyen una alternativa promisoría para el control biológico y que poseen plásmidos responsables de actividad larvicida que reflejan una ventaja en el reciclaje y diseminación del microorganismo.

CONTRATO

RESUMEN

APLICACION DE LA BIOTECNOLOGIA APROPIADA PARA LA PRODUCCION DE PROTEINA UNICELULAR A PARTIR DE *Spirulina máxima*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: GLORIA XIMENA PEDRAZA ORDOÑEZ (1).

(1) Fundación Centro para la Investigación en Sistemas Sostenibles de Producción Agropecuaria, CIPAV.
Carrera 35A Oeste No. 3-66. Tejaras de San Fernando.
Calif. Apartado Aéreo 20591. Teléfono: (57-2) 554 2300. Fax: (57-2) 554 2300.
E Mail: cipav@cipav.org.co
Instituto Mayor Campesino, IMCA. Buga. Valle.

OBJETIVOS

- Establecer en el laboratorio las poblaciones de *Spirulina sp.*
- Estandarizar los diferentes medios de cultivo de *Spirulina máxima*, empleando materiales de desecho, especialmente el efluente de biodigestores anaeróbicos.
- Implementar sistemas de producción que permitan la agitación eficiente de los medios de cultivo, especialmente a nivel de campo, a través de mecanismos de tipo eólico, hídrico o mecánico.
- Una vez establecida una producción constante de *Spirulina máxima*, utilizarla como suplemento protéico para distintas especies menores: patos, pollos y en última instancia cerdos que utilicen las dietas básicas con recursos energéticos no convencionales (jugo de caña, melote y plátano, entre otros).

RESUMEN

La microalga *Spirulina máxima* es un autótrofo con alta eficiencia fotosintética que se utiliza como complemento protéico en la dieta de diferentes animales e incluso de seres humanos. La determinación de condiciones de cultivo y el establecimiento de miniplantas de producción puede contribuir en la búsqueda de soluciones al problema de contaminación ambiental, reutilizando aguas con desechos orgánicos y agroindustriales.

Este proyecto desarrolló una metodología para el cultivo de *Spirulina máxima* en efluentes de biodigestores de flujo continuo, alimentados con excretas de cerdo con un tiempo de retención de 60 días (1:1 agua, efluente) y vinaza residual de la industria licorera (1:1 agua, vinaza), adicionando respectivamente 10 g/l y 34 g/l de bicarbonato de sodio para elevar el pH a valores superiores a 9. Se obtuvieron contenidos en base seca de N=7%, P=0,2%, K=0.8% y Ca=1%. A nivel de campo se encontró que el buchón (*Eichornia crassipes*) fue más eficiente en el mejoramiento de la calidad del agua proveniente de los biodigestores y por tanto tuvo un efecto positivo en la productividad del alga en comparación con las especies *Lemna sp.*, *Azolla anabaena* y *Pistia stratiotes*.

En los ensayos de consumo de *Spirulina* en pollitos de engorde ornamentales no se encontraron diferencias significativas en el consumo (1.83g/animal/día), la ganancia de peso (123g/ani-

mal) y el porcentaje de conversión (1,3%) con el testigo de torta de soya. En alevinos de peces ornamentales *Caracius auratus* alimentados con *Spirulina* y *Artemia* (1:1) se encontró una supervivencia del 64% en comparación con el tratamiento de 100% de *Spirulina* que presentó una supervivencia de 0%, mientras que en el testigo (*Artemia salina*) se obtuvo una supervivencia del 77%. «El consumo de esta cianobacteria en fresco en bailarinas puede aumentar cuando se ofrece alimento vivo así como se hizo con la *Artemia salina*, mientras que los peces vivíparos a partir de los 25 días de edad pueden ser mejores consumidores de la *Spirulina* seca».

RESUMEN

RESUMEN

BIOLOGIA MOLECULAR DEL VIRUS DE LA TRISTEZA CITRICA: AISLAMIENTO, PURIFICACION Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE ALGUNAS CEPAS DE VIRUS BENIGNOS Y SEVEROS QUE AFECTAN A LOS CITRICOS EN COLOMBIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JOSE PEÑARANDA VALVERDE (1).
COINVESTIGADORES: ORLANDO ACOSTA (1); LIZ PATRICIA MORENO (1).

(1) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Medicina, Laboratorio de Bioquímica.
Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 14490. Telefax: (57-1) 368 1390.

OBJETIVOS

- Desarrollar una metodología para el diagnóstico y estudio a nivel molecular, del virus de la Tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza Closterovirus*, CTV), partiendo de las diferentes cepas obtenidas en cinco regiones específicas de Colombia las cuales afectan la productividad en las variedades más utilizadas.
- Purificar las diferentes cepas del CTV presentes en Colombia.
- Definir el ARN y la proteína viral de las diferentes cepas con su integridad física biológica.
- Caracterizar los ARN y las proteínas estructurales con base en la determinación de sus pesos moleculares por electroforesis en gel de poliacrilamida.
- Establecer la relación genética entre las diferentes cepas virales mediante hibridación molecular de sus genomas.
- Producir las diferentes sondas moleculares mediante la formación de los respectivos cADN: clonaje y ampliación en el plásmido PBR322 de *E. coli*.
- Producción del anticuerpo policlonal y monoclonal contra diferentes cepas de CTV encontradas.
- Establecer el método ELISA para la producción de los kits diagnóstico.
- Secuenciar el genoma de por lo menos una cepa suave y otra severa de CTV en Colombia.

RESUMEN

Este trabajo describe los resultados de un estudio epidemiológico y molecular realizado entre los años 1990 y 1993 sobre la situación de la Tristeza de los cítricos en Colombia. La presencia del virus de la Tristeza de los cítricos (*Citrus tristeza Closterovirus*, CTV), fue establecida sobre la base de la reacción de extractos de tejidos de cítricos en la prueba de ELISA, usando anticuerpos policlonales y monoclonales. Mediante esta prueba se determinó que el 95% de los árboles de cítricos se hallaban infectados con cepas severas de CTV, excepto en la región de Mompox donde el 70% de los cítricos en producción se hallan infectados solamente con cepas suaves de CTV. Los análisis demostraron que la reacción

serológica de los extractos de tejidos infectados es debida a la presencia de proteínas con un peso molecular igual al reportado para la proteína de la cápside (CP) de CTV. El estudio electroforético de los dsARN aislados del tejido infectado confirmó la presencia del CTV, además de evidenciar la complejidad y diversidad de los perfiles del dsRNA. Estos resultados sugieren la asociación de varias cepas virales en un mismo árbol, lo cual constituye una grave amenaza para la citricultura colombiana debido a la posibilidad de creación de nuevas asociaciones virales más agresivas a través de la diseminación realizada por el vector *Toxoptera citricidus*. Los resultados del secuenciamiento del gen que codifica para la proteína de la cápside del CTV (GCP) reafirmaron la clasificación serológica de las cepas de CTV como suaves y severas y contribuyeron a la definición del patrón evolutivo molecular de este gen con relación a las secuencias reportadas para cepas de CTV de otros países. Los análisis de restricción de las secuencias del GCP definieron la presencia de un sitio Eco RI característico de cepas severas de CTV colombianas. El conocimiento de las secuencias del GCP también permitió el diseño de sondas moleculares y de oligonucleótidos específicos para el diagnóstico, la detección y la identificación de cepas colombianas de CTV. Los datos serológicos de dsRNA y del secuenciamiento del GCP señalan las cepas suaves del CTV de la región de Mompox, como potencialmente protectoras en pruebas de protección cruzada convencional y en la transformación genética de plantas de cítricos para conferirles resistencia a la infección del CTV.

BIOTECNOLOGIA AL SERVICIO DE LOS AGRICULTORES COLOMBIANOS: DESARROLLO Y MULTIPLICACION DE VARIEDADES RESISTENTES A LAS SIGATOKAS AMARILLA Y NEGRA EN PLATANO Y BANANO Y PRODUCCION DE VARIEDADES LIBRES DE VIRUS EN MARACUYA Y PAPA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: GUILLERMO GALVEZ (1).
COINVESTIGADORA: PAULINA PINEDA (1).

(1) Biotecnología de Colombia BIOTECOL. Carrera 2ª oeste 5-286, Apto. 401, Cali.
Teléfonos: (57-2) 893 2574. Fax: (57-2) 893 2574.

OBJETIVOS

- Desarrollar y propagar variedades resistentes a plagas y enfermedades especialmente de aquellos cultivos de propagación asexual.
- Producir materiales libre de virus y otros patógenos, garantizando su pureza genética.
- Desarrollar sistemas integrados de control de plagas y enfermedades incluyendo variedades resistentes o tolerantes y el uso racional de pesticidas, control biológico y natural.
- Ofrecer servicios de diagnóstico de plagas y enfermedades utilizando técnicas modernas y seguras que permitan indización adecuada, rápida y confiable.
- Producir a nivel industrial organismos benéficos para el control de plagas así como para la fijación biológica del nitrógeno con cepas de *Rhizobium*, y de *Micorrizas* de reconocida eficiencia.
- Producir material libre de virus y otros patógenos en uva, maracuyá y papa.
- Evaluar en sus respectivos ecosistemas, y propagar variedades, disponibles en la actualidad en el banco de germoplasma de BIOTECOL Ltda, resistentes a las sigatokas de plátano y banano.

RESUMEN

La producción de banano y plátano es afectada por la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*), por el Moko (*Pseudomonas solanacearum*) y por el nemátodo *Radophylus similis*; la producción de maracuyá por enfermedades fungosas (*Fusarium*) y virales (*Potyvirus*, *Tymovirus* y *Clusterovirus*) y la producción de papa por diversos virus. Por tal razón, se requiere para su control, la utilización de grandes cantidades de agroquímicos que contaminan, tanto al producto como al medio ambiente.

En este proyecto se han desarrollado protocolos que han permitido el incremento de la tasa de multiplicación, tanto de los plátanos con genoma AAB y ABB tipo Dominico Hartón y Hartón así como para la multiplicación de las variedades resistentes a la Sigatoka negra y al Mal de Panamá, razas 1 y 4 desarrolladas por la Fundación Hondureña para la Investigación Agrícola (FHIA),

con genomas tetraploides AAAB: FHIA-01, FHIA-02, FHIA-18, FHIA-21 Y FHIA-22. También se han propagado y distribuido 50 mil vitroplantas de banano y plátano de las variedades FHIA-01, -02 y -03, -21 y -22 y Africa-01 para la campaña de control de la Sigatoka negra del programa de sanidad vegetal del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y 1000 vitroplantas de banano y 4200 de plátano para el programa de plátano y banano de CORPOICA (Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria), para su evaluación agronómica y de resistencia a Sigatoka negra, plagas y otras enfermedades en diferentes centros experimentales de CORPOICA en el país, en diferentes ecosistemas.

De estas variedades de plátano y banano resistentes a la Sigatoka negra, el ICA ha multiplicado la FHIA-01, FHIA -03 y FHIA -21 para distribuirla entre los pequeños agricultores de zonas afectadas por la Sigatoka negra, ofreciéndoles así su alimento diario e ingresos adicionales, junto con un desarrollo agrícola sostenible, y un medio ambiente mejor. La FHIA -21 se está estableciendo comercialmente especialmente en aquellas zonas donde la Sigatoka negra destruyó las plantaciones de Dominico, Hartón. En la actualidad hay 20 ha en el Magdalena Medio, 5 ha en Arauca, 20 ha en Caquetá y 2 ha en Urabá con aceptación en los mercados locales. Además, se han obtenido por micropropagación plantas de la variedad Gros Michel enano, Valery, Gran Enano y Williams, las cuales se están mercadeando en la zona cafetera y Ecuador.

En maracuyá mediante tratamiento con termoterapia se han obtenido plantas libres de virus causados por el potyvirus del grupo del mosaico de la soya (SMV), el más comúnmente encontrado y el tymovirus y plantas libres de estos virus a partir de semilla seleccionada suministrada por la casa Grajales. Para papa se cuenta con la tecnología necesaria para la micropropagación de las principales variedades de *Solanum tuberosum*, *S. andigenum* y *S. phureja*.

CARACTERIZACION BIOLÓGICA Y MOLECULAR DE CEPAS NATIVAS DE *Bacillus thuringiensis* PARA EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA EN AGRICULTURA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ALBA MARINA COTES(1).

COINVESTIGADORES: ARISTOBULO LOPEZ AVILA (1); FELIPE BOSA(1); JUAN PABLO ARIAS (1);
CARLOS ALBERTO VARGAS (1); MILTON FORERO (1); ANDRES DIAZ (1); JAVIER HE RMANDEZ (1);
LEONARDO MARIÑO (1).

Estudiantes adscritos al proyecto: OLGA PEREZ, ALEJANDRO RODRIGUEZ,
CARLOS ANDRES GOMEZ, ADRIANA LOZANO

(1) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA.

Centro de Investigaciones de Tibaitatá, Km 14 vía a Mosquera. Santafé de Bogotá, D. C.
Apartado Aéreo 240142. Las Palmas. Teléfonos: PBX (57-1) 344 3000, Ext: 1300.

OBJETIVOS

- Realizar la conformación y el mantenimiento del banco de cepas nativas de *Bacillus thuringiensis*.
- Caracterizar Bioquímica, Molecular y Biológicamente cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* presentes en el banco de cepas del Programa Nacional de Manejo Integrado de Plagas (MIP).
- Seleccionar cepas de *Bt* del Banco de CORPOICA, con potencial para el control de insectos plaga de los ordenes lepidóptero y coleóptera.
- Estandarizar las condiciones de cría y realizar bioensayos con *Premnotripes vorax* (gusano blanco de la papa) utilizando cepas de la referencia de *B. thuringiensis*
- Evaluar mediante bioensayos, a nivel de laboratorio, la actividad insecticida de cepas nativas de *Bt* contra larvas de *Tecia solanivora* (Polilla Guatemalteca de la papa).
- Evaluar en parcelas experimentales en campo, la eficiencia de las cepas seleccionadas por su alta actividad insecticida contra *Spodoptera frugiperda*.

RESUMEN

Dado el impacto económico, que insectos plaga tales como *S. frugiperda*, *T. solanivora* y *Premnotripes vorax* producen en algunos cultivos agrícolas, y el uso indiscriminado de plaguicidas químicos que para su control se utiliza, se hace indispensable la búsqueda de alternativas de control biológico. Basados en la biodiversidad del país y en la posibilidad de encontrar microorganismos mejor adaptados al trópico que los microorganismos foráneos y con un amplio espectro de acción, se planteó como objetivo principal del presente trabajo, el de evaluar y seleccionar cepas nativas de *B. thuringiensis* que presenten alta actividad insecticida contra estos insectos plaga.

Dentro del marco del presente proyecto se conformó un banco de bacilos esporulados el cual está constituido por 3.052 aislamientos seleccionados a partir de muestras de suelo y de insectos enfermos provenientes de diferentes regiones del país (Cundinamarca, Boyacá, Valle del Cauca, Nariño, Guajira, Meta, Caquetá, Amazona, Antioquia y Norte de Santander), 600 de estos bacilos han sido identificados como *Bacillus thuringiensis* por la presencia del cristal parasporal. Los aislamientos están conservados a 4 °C en tiras de papel dentro de ampollitas de vidrio y se han realizado pruebas de mantenimiento, viabilidad y conservación a 600 aislamientos.

Se han caracterizado bioquímicamente 488 aislamientos, de los cuales 309 (63%) presentaron perfiles electroforéticos relacionados con los reportados en la literatura para proteínas Cry1 lepidoptero-diptera activa (29%), Cry2Aa diptera activa (23%), Cry3Aa coleóptero activa (7.4%), Cry1la lepidoptera-coleoptera activa (10%); 107 (19%) presentaron perfiles novedosos y 72 (14%) no presentaron perfil variable. Molecularmente se han caracterizado 422 aislamientos, de los cuales 371 (83%) presentaron amplificación reconociéndose a las familias de genes Cry1 lepidoptero-activo (54%), Cry2 lepidoptero-diptero activo (25%), Cry3 coleóptero activo (5%) Cry1la lepidoptero-diptero activo (9%) y un 17% no presentaron amplificación.

Se han evaluado hasta el momento 73 cepas nativas, con una dosis única de 200mg/ml de espора-cristal, contra larvas de primer instar de *Spodoptera frugiperda*, dentro de la cuales se han seleccionado por su alta actividad insecticida cuatro cepas correspondientes a Bt127, Bt1165, Bt2468 y Bt3107 con mortalidades que oscilan entre 80% y 90%. La evaluación de las posibles combinaciones de tres de estas cepas (Bt127, Bt1165 y Bt3107) permitió seleccionar como combinación promisoría para el control de la plaga, la correspondiente a las cepas (Bt1165 y Bt3107) con una concentración letal media CL_{50} 88mg/ml de proteína total representada en una mortalidad del 87% durante 120 horas; esta actividad no fue significativamente diferente a la encontrada para la cepa de referencia HD-137 con una CL_{50} de 106 mg/ml y una mortalidad de 79% en el mismo tiempo. Contra *Tecia solanivora* se ha evaluado 46 cepas nativas de las cuales se seleccionaron por su alta actividad insecticida la cepa Bt2468 procedente de Leticia (Amazonas) y la cepa Bt3107 procedente del Espinal (Tolima). Estas ocasionaron una mortalidad acumulada corregida a las 96 h, del 90% y 72% respectivamente, mientras que la cepa de referencia HD-1, presentó una mortalidad del 95%, no mostrando diferencias significativas con las mortalidades producidas por las dos cepas nativas. Los resultados obtenidos demostraron que es posible encontrar en diferentes sitios del país, cepas con alta actividad biocontroladora, aunque también muestra la dificultad para encontrar cepas potenciales ya que solo el 4% de las cepas evaluadas mostraron alta actividad contra este insecto plaga.

Para los Bioensayos con *P. vorax* se establecieron las condiciones mínimas de cría para este insecto. Se determinó que la cepa de referencia *B. thuringiensis* var *tenebrionis*, se puede usar como control positivo para posteriores evaluaciones ya que se logró una mortalidad del 86.9%.

Para la estandarización de las condiciones de producción masiva de las cepas nativas, se han evaluado diferentes medios de cultivo y se diseñó la forma de fermentación de las mismas, lográndose establecer como mejor sustrato el compuesto por: extracto de levadura, melaza, nitrógeno orgánico e inorgánico, y sales. Se han realizado ensayos previos en parcelas experimentales con el producto comercial Xentary a base de *Bacillus thuringiensis* var *Aizaway* HD-137, con el fin de estandarizar y determinar las condiciones requeridas para posteriormente evaluar la eficiencia de las diferentes cepas nativas en campo, las cuales fueron previamente seleccionadas en laboratorio para el control de *Spodoptera frugiperda*.

Se proyecta seguir evaluando aislamientos nativos de *Bacillus thuringiensis*, debido al alto potencial que estas presentan para el control de insectos plaga en la agricultura.

CARACTERIZACION DE LAS PROTEINAS Y LOS GENES RESPONSABLES DE LA TOXICIDAD DE *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin*.

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SERGIO ORDUZ (1)
COINVESTIGADORES: ARMELLE DELÉCLUSE (2).

(1) Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Carrera 72A No. 78B-141. Medellín.
Teléfono: (57-4) 441 0855. Fax: (57-4) 441 5514. E-mail: cib@medellin.cetcol.net.co
(2) Unit de Bacteries Entomopatogenes. Institut Pasteur. Paris. Francia.

OBJETIVOS

- Determinar las características insecticidas de las toxinas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt. med*) subespecie *medellin*.
- Diseñar sondas para aislar el gen de la proteína de 68 kD de *Bt* subespecie *medellin*, basadas en la secuencia amino terminal de la proteína.
- Secuenciar los genes de las proteínas p94, p68 y cytM1
- Determinar las características insecticidas de las mezclas de proteínas de *B.thuringiensis* israeliensis y *B.thuringiensis* subespecie *medellin*.

RESUMEN

Una preparación enriquecida de cristales de *Bacillus thuringiensis* subsp. *medellin* (*Bt.med*) fue obtenida y solubilizada. El solubilizado fue sometido a cromatografía sobre una columna de exclusión (Sephacryl-200) y se colectaron varias fracciones. Se observaron tres picos principales de proteínas en el cromatograma. El primer pico tiene dos proteínas principales que migran entre 90 y 100 kDa. Estas proteínas son aparentemente no comunes a las de otras cepas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt.med*) aisladas a la fecha. El segundo y tercer pico obtenidos de la columna de exclusión produjo polipéptidos de 68 y 28-30 kDa, respectivamente. Cada pico independientemente demostró toxicidad contra larvas de primer instar de *Culex quinquefasciatus*. Interesantemente, combinaciones de las fracciones correspondientes a las proteínas de 90-100, 68 y 30 kDa demostraron un leve incremento en la toxicidad. Resultados preliminares sugieren que la proteína de 94 kDa es un componente importante de las toxinas de *Btmed* con la concentración letal media (LC50) más baja. Estudios posteriores son necesarios para concluir el papel de la interacción de estas proteínas del cristal. Un antisuero contra la proteína de 90-100 kDa de *Btmed* mostró reactividad cruzada contra la proteína de 68 kDa. Sobre un Western Blot, el antisuero no reaccionó con otras especies de *B.thuringiensis*, indicando que inmunológicamente las proteínas tóxicas de *Bt.med* son diferentes. El ADN total de *Bt.med* fue utilizado para generar dos librerías. El análisis de las librerías ha permitido obtener los genes correspondientes a las proteínas tóxicas de 94 y 30 kDa. Se han realizado mapas de restricción parcial de ambos genes. Actualmente está en progreso su secuencia con al menos un 25% de los genes secuenciados.

CARACTERIZACION MOLECULAR DE GENES CRY Y EFECTOS BIOLÓGICOS DE LA DELTA ENDOTOXINA DE CEPAS DE *Bacillus thuringiensis* (BERLINER) RECOLECTADAS EN DIFERENTES REGIONES DE COLOMBIA

INVESTIGADORES PRINCIPALES: SERGIO ORDUZ (1); ORLANDO ACOSTA (2).

COINVESTIGADORES: JAIRO ARANGO (1); MARIA PATIÑO (1);

DIANA GUTIERREZ (1); DANIEL URIBE (2).

(1) Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Carrera 72A No. 78B-141. Medellín.

Teléfono: (57-4) 441 0855. Fax: (57-4) 441 5514 E-Mail: cib@medellin.cetcol.net.co

(2) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Laboratorio de Bioquímica.
Ciudad Universitaria.

Santafé de Bogotá, D. C. Teléfonos: (57-1) 368 1390 - 222 5401. Fax: (57-1) 368 1615.

OBJETIVOS

- Recolectar cepas nativas de *Bacillus thuringiensis* en diferentes zonas del país.
- Diagnosticar la actividad tóxica de las cepas de *Bacillus thuringiensis* dirigida contra larvas de insectos lepidópteros y dípteros mediante la determinación bioquímica y genética de la delta-endotoxina presente en dichas cepas.
- Recolectar muestras de suelo de diferentes ecosistemas del país.
- Seleccionar las cepas de *Bacillus thuringiensis* presentes en las muestras anteriores.
- Caracterizar electroforéticamente las proteínas asociadas al cristal producido por cada cepa aislada.
- Amplificar mediante la técnica de PCR segmentos de ADN correspondientes a los genes Cry I y Cry IV presentes en las cepas.
- Realizar bioensayos para determinar la actividad bioinsecticida del producto activo de las diferentes cepas en larvas de dípteros y lepidópteros.

RESUMEN

El propósito de este proyecto es aislar nuevas variedades colombianas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) activas contra insectos lepidópteros y caracterizarlas usando técnicas de ELISA, SDS-PAGE, PCR y bioensayos.

Se recolectaron 89 muestras de suelo provenientes de 10 regiones agrícolas colombianas con destino al aislamiento de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*) con genes CryI. Se evaluaron un total de 87 muestras provenientes de los departamentos de Antioquia, Bolívar, Caldas, César, Córdoba, Cundinamarca, Huila, Tolima y Valle del Cauca. De las muestras recolectadas por el IBUN (Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional de Colombia) se obtuvieron 1149 aislamientos con capacidad de formar esporas y de este número *Bt* representó el 43% (802 aislamientos), destinados a la caracterización de los genes CryI. De las muestras evaluadas por la CIB se obtuvieron un

total de 1724 cepas con capacidad de formar esporas de las cuales un 14,5% (249 aislamientos) corresponde a *Bacillus thuringiensis*.

Las preparaciones de espora-cristal de los aislamientos de *Bt* destinados a la caracterización de los genes *CryI* se analizaron por electroforesis (SDS-PAGE). El 61% de los aislamientos seleccionados mostró patrones electroforéticos típicos con bandas de 130-140kDa y/o 60-70kDa, otros aislamientos presentaron bandas prominentes de 100, 60, 40 y 20kDa. Los perfiles electroforéticos obtenidos fueron confrontados con antisuero preparado contra proteínas del cristal de *Bt* HD1 var. *kurstaki* siendo evidenciadas en Immunoblotting. Así mismo preparaciones espora-cristal fueron analizadas en la prueba de ELISA utilizando anticuerpos preparados contra proteínas específicas de cristal de las cepas de referencia para los productos de los genes *CryI* y *CryIII* (*Bt* HD1 var. *kurstaki* y *BtI* respectivamente).

A 175 de las cepas de *B. thuringiensis* aisladas, que resultaron patógenas para larvas de *Culex quinquefasciatus*, se les realizó electroforesis SDS-PAGE, para observar la composición de sus proteínas y comparar su patrón electroforético con el de las cepas control (*B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* (1884) y *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (163-131)). En el 76% (134) de los aislamientos se encontró un patrón de corrido similar al de la cepa *B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* (1884), con bandas de 135, 125-18, 68 y 28 kDa. El 24% (41) restante presentó patrones diferentes que ameritan ser analizados con más detenimiento para determinar características específicas y su potencial en el control biológico. Estas cepas fueron aisladas a partir de muestras de tierra procedentes de los departamentos de Cundinamarca, Tolima, Huila, Guajira y Córdoba. Adicionalmente, se realizó el tamizaje por Western-blot de las 28 cepas seleccionadas con el objeto de caracterizar sus productos de expresión. Las cepas de *B. thuringiensis* (*Bt*) se tamizaron contra anticuerpos policlonales anti p30, p68 y p94 del *Bt* sub. *medellin* (*Bt. med.*). Se observó: primero; la presencia de las proteínas de 30, 68 y 94 kDa características de las toxinas del *Bt. med.* y segundo, que el perfil de migración podía ser catalogado dentro de los siguientes tipos *Bt. var. israeliensis*, *Bt. med.* y un tipo de migración atípica que mostró reacción cruzada con las proteínas de *Bt. med.*

Se trabajó sobre aislamientos con genes *CryI*. Utilizando los primers oligonucleotídicos «forward» y «reverse» específicos, se ampliaron 9 genes (*CryIA(a)*, *CryIA(b)*, *CryIA(c)*, *CryIB*, *CryIC*, *CryID*, *CryIE*, *CryIF* y *CryIG*).

Con este propósito tres «sets» de primers fueron utilizados (Cerón et al, 1994). Se encontraron 10 diferentes patrones de PCR para los genes *Cry* presentes en los aislamientos de *Bt* examinados. El 95% de estos aislamientos contuvo más de un tipo de genes *Cry*. Dos de los aislamientos probados presentaron productos de PCR de tamaños diferentes a los de referencia, lo cual sugiere la presencia de genes no descritos previamente, cuya actividad biológica amerita estudios sistemáticos.

Se seleccionaron de manera aleatoria 28 de los aislamientos obtenidos y se hizo caracterización de sus genes por medio de la técnica de PCR, empleando primers específicos que amplifican segmentos de tamaño característico de los genes *Cry1*, *Cry3* y *Cry4* (Carozzi et al, 1991). Se reporta la presencia del gen *Cry4* (A o B) díptera-específico en 23 de los aislamientos, el gen *CryIA* lepidoptera-específico en 4 de los aislamientos y ausencia de amplificado característico del gen *Cry3* coleóptera-específico.

Los bioensayos de los productos de los genes *CryI* fueron evaluados usando como insectos blanco *Spodoptera frugiperda* y *Heliothis virescens*.

El bioensayo fue realizado sobre larvas de primer instar de *S. frugiperda* y *H. virescens*. La mortalidad fue determinada después de 120 horas y analizados mediante el análisis PROBIT. Las

cepas con genes CryIB y CryIE tuvieron los mayores grados de toxicidad contra *S. frugiperda*, mientras que las cepas que contuvieron genes CryIF fueron activas contra *H. virescens*. Es importante mencionar que algunos de los aislados nativos presentan mayor toxicidad contra *S. frugiperda* que la cepa standard (HD1). En posteriores bioensayos contra *H. virescens* se encontró que la cepa IBUN 6.4, es 13% más activa que la cepa standard (HD1).

Los bioensayos para determinar la actividad tóxica de los aislamientos se realizaron empleando como insecto blanco *Culex quinquefasciatus*.

En el caso de *Culex quinquefasciatus*, se emplearon larvas de primer instar y la mortalidad fue determinada 72 horas después. De los 150 aislamientos evaluados por esta técnica, se han encontrado 6 aislamientos con una actividad tóxica igual a la del control positivo empleado en el bioensayo (*Bt. subsp. kurstaki*). Dos de estas 6 cepas (172-0451 y 172-0761), fueron incluidas en el estudio por PCR y presentaron los productos de amplificación esperados cuando se emplearon los primers descritos para el gen CryI.

De los 175 aislamientos patógenos para dípteros solo se ha determinado el rango de patogenicidad en 40 de ellos; 31 de los cuales presentaron un rango de patogenicidad similar al de *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (163-131), cuya mortalidad del 100% se presenta en las diluciones 10^4 y 10^5 y en las diluciones siguientes la mortalidad es de 0%.

Las cepas 22-09, 24-04, 82-113 y 82-1121 procedentes de los departamentos de Bolívar y Córdoba respectivamente, mostraron un patrón un poco diferente observándose en la dilución 10^4 una mortalidad del 100% y en la dilución 10^5 una mortalidad que oscila entre 80%-90%; en las diluciones siguientes la mortalidad es de 0%.

La cepa 22-06 proveniente del departamento de Bolívar presentó un 100% de mortalidad en la dilución 10^4 y en la dilución 10^5 esta fue de 62% y de ahí en adelante la mortalidad fue del 0%.

En las cepas 82-1202, 22-03 y 29-50 de los departamentos de Córdoba y Bolívar la mortalidad del 100% solo se observó en la primera dilución (10^4) en las demás es de 0%. Se usaron como control, las cepas de *B. thuringiensis* subsp. *medellin* (163-131) y *B. thuringiensis* subsp. *israeliensis* (1884).

CONSERVACION GENETICA IN VITRO DE *Passifloras*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: CARMEN EUGENIA RODRIGUEZ (1).
 COINVESTIGADORES: GUSTAVO GONGORA (1);
 SANDRA CONSTANTINO (1).

(1) Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología. Unidad de Biología Vegetal.
 Carrera 7a No. 40-62. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 56710.
 Teléfono: [57-1] 320 8320, Ext: 4088. Fax: [57-1] 285 0503.
 E-Mail: scarr@javercol.javeriana.edu.co.

OBJETIVOS

- Desarrollar y adaptar técnicas de cultivo de tejidos para la conservación, mantenimiento y propagación de genotipos del género *Passiflora* con el fin de disponer de material para programas de selección y mejoramiento de especies de importancia agrícola.
- Seleccionar y recolectar material vegetal destinado a la colección genética de *Passifloras*.
- Establecer *in vitro* el material seleccionado y desarrollar sistemas de micropropagación y mínimo crecimiento para conservación de germoplasma.
- Determinar por medio de marcadores moleculares (como indicadores) la estabilidad genética del material establecido y almacenado.

RESUMEN

El género *Passiflora* representa un recurso de gran potencial dentro de los frutales tropicales. Dada la variedad de especies adaptadas a diferentes altitudes y sus características como especies de consumo humano, su importancia económica tanto a nivel nacional como internacional ha crecido en los últimos años. Es por esto que se ha despertado la necesidad de caracterizar su germoplasma, crear bancos y desarrollar técnicas de cultivo *in vitro* como apoyo a la conservación, propagación y mejoramiento de estas especies.

En este estudio se han recolectado e identificado taxonómicamente genotipos de diferentes especies silvestres y cultivables del género *Passiflora*. Se desarrolló un sistema para la conservación *in vitro* bajo condiciones de mínimo crecimiento (10° C y 20° C durante 18 y 12 meses) de dos especies modelo (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa* y *P. mollissima*). Se han adaptado metodologías de biología molecular para el estudio de marcadores (polimorfismos en fragmentos de restricción del cpADN e isoenzimas) para la caracterización de los genotipos colectados y el seguimiento de la estabilidad genética durante el manejo *in vitro*. El trabajo realizado con algunas especies seleccionadas como modelo (*P. mollissima*, *P. edulis*, *P. caerulea*, *P. malliformis*, *P. erythophylla* y *P. cuspidifolia* entre otras) ha demostrado la alta capacidad de respuesta *in vitro* de los segmentos nodales así como su regeneración exitosa luego de períodos superiores a los 12 meses de almacenamiento bajo mínimo crecimiento.

Adicionalmente se realizaron trabajos dirigidos a la regeneración de plantas de *P. edulis* var. *flavicarpa* («maracuyá») y *P. mollissima* («curuba») a partir de organogénesis en discos foliares. En los ensayos de evaluación del potencial morfogénico de hojas de «maracuyá» en medio basal

Murashige & Skoog con diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, los mejores resultados de inducción y desarrollo de brotes se obtuvieron combinando N6-bencilaminopurina (BA) (4,4 - 13,3 mM) y Kinetina (KIN) (2,3 - 4,6 mM). La elongación y enraizamiento de los brotes obtenidos se logró en medio MS basal sin reguladores de crecimiento. Así mismo, se desarrolló un sistema igualmente confiable para la regeneración de plantas de «curuba» a partir de explantes de hojas provenientes de segmentos nodales cultivados *in vitro*. Se obtuvo regeneración de brotes utilizando BA (13,3 mM) y KIN (9,3 mM) en medio Nitsch modificado. El desarrollo y enraizamiento se llevó a cabo en el mismo medio en ausencia de reguladores de crecimiento. Los sistemas de regeneración de plantas desarrollados en estas dos especies (con mayor importancia económica) son un avance importante de relevancia para trabajos de manipulación y transformación genética en especies de *Passiflora*.

En el análisis de marcadores moleculares se obtuvieron patrones claramente discretos de fragmentos generados por Xho, DralI, BamHI, HindIII y en menor grado por BgIII, DraI, EcoRI, HaeIII, SacI y SmaI, mientras que KpnI, MboI y PstI mostraron patrones difusos. Los polimorfismos obtenidos permitieron diferenciar las especies estudiadas lo que demuestra el potencial del análisis de fragmentos de restricción en estudios de caracterización molecular. En la actualidad se está realizando la caracterización de varias entradas de la colección. También se ha optimizado la técnica de amplificación de secuencias no codificantes de cpADN las cuales pueden ser amplificadas a partir del ADN total. Estos fragmentos por ser no codificantes pueden presentar una mayor frecuencia de mutación y pueden ser útiles para la caracterización de genotipos y evaluación de la estabilidad genética. Los resultados obtenidos hasta el momento no han mostrado que los sistemas desarrollados para micropropagación y almacenamiento induzcan variaciones en el material y por lo tanto no constituyen un riesgo para mantener la uniformidad genética de las entradas. Estos resultados se complementarán con aquellos que se obtengan en los estudios isoenzimáticos.

Al cabo de los tres años de investigación fueron localizadas y recolectadas alrededor de 91 entradas. Se perfeccionaron y desarrollaron métodos para el manejo *in vitro* de especies comerciales (*P. edulis* var. *flavicarpa*, *P. ligularis*, *P. maliformis*, *P. mollissima*, *P. popenovi* y *P. quadrangularis*) y silvestres (*P. adenopoda*, *P. caerulea*, *P. cuspidifolia* y *P. erythrophylla*). Estas metodologías pueden ser utilizadas como base para el manejo de los recursos genéticos de otras especies.

El estudio de fragmentos de restricción polimórficos de ADN de organelos permitió diseñar sistemas útiles para la caracterización del germoplasma que pueden ser aplicados en el estudio de las relaciones genéticas de otras especies cuyos genomas no son conocidos. Así mismo se inició la clonación de secuencias específicas con el fin de ser utilizadas en el futuro como sondas para la caracterización del germoplasma.

DESARROLLO DE NUEVOS METODOS DE DIAGNOSTICO PARA VIROSIS VEGETALES

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ALVARO ALEGRIA (1).
 COINVESTIGADORES: GUSTAVO SERRANO (1), INES VALENCIA (1),
 IVAN LOZANO (1) Y NELSON TORO (1).

(1) Universidad del Valle. San Fernando. Facultad de Salud. Laboratorio de Microbiología. Cali.
 Teléfonos: (57-2) 339 3041, 339 3042. Fax: (57-2) 339 7264.

OBJETIVOS

- Validar mediante pruebas doble ciego en el laboratorio las técnicas de ELISA para los virus del Mosaico sureño del frijol (Bean souther mosaic *Sobemovirus. semovirus*, BCMV) y del virus del Mosaico común del frijol. (Bean common mosaic potyvirus, BCMV)
- Obtener en un solo ensayo el reconocimiento de las diferentes cepas del Mosaico común. (Bean common mosaic potyvirus, BCMV)
- Validar con muestras de campo la sonda de ADN obtenida, para el virus del Mosaico común del frijol.
- Utilizar la sonda sintética para *Potyvirus* en otros virus de interés en maracuyá.

RESUMEN

El virus del Mosaico común del frijol (Bean common mosaic potyvirus, BCMV) es un complejo viral que causa grandes pérdidas en la productividad. Dependiendo del cultivar, el virus produce un mosaico característico mientras que otras producen necrosis sistémica, las cuales han sido consideradas como virus diferentes del complejo BCMV.

Este proyecto desarrolló métodos de diagnóstico para el *potyvirus* (BCMV), que incluye métodos inmunológicos de tipo ELISA basados en antiseros policlonales contra la proteína de la cubierta viral purificada por electroforesis en geles de poliacrilamida dodecil sulfato de sodio. Se prepararon antiseros contra cepas necróticas (NL-3) y no necróticas (Florida) de BCMV y se desarrollaron ELISAs tipo sandwich para la detección de la infección viral. La sensibilidad obtenida fue moderada, ya que algunas plantas infectadas presentaron valores inferiores al del punto de corte y la especificidad baja, debido en gran parte a la presencia de falsos positivos en plantas sanas. Adicionalmente se desarrollaron anticuerpos policlonales contra el virus del mosaico sureño, en este caso el ELISA fue muy sensible y la especificidad fue buena (0.90).

Con base en la tecnología del ADN recombinante se desarrollaron dos métodos: 1. Una sonda de oligonucleótidos sintética basada en la secuencia publicada para varios *Potyvirus*. La sonda reconoce los *Potyvirus* con mayor o menor sensibilidad y no reacciona con otros virus vegetales y 2. Una sonda clonada obtenida mediante transcripción reversa, clonación y transformación. Se obtuvieron varios clones en el vector Bluescript KKS II (+/-) (Stratagene) que reaccionaron específicamente con el ARN viral de NL-3. También se obtuvo evidencia por mapeo peptídico en relación con la definición de NL-3 como un virus separado. Su patrón peptídico con proteasa estafilococcica V8 es significativamente diferente de las cepas no necróticas como tipo Florida.

DESARROLLO DE UN SISTEMA PARA LA PRODUCCION DE PLANTAS TRANSGENICAS DE CAFE

INVESTIGADORA PRINCIPAL: MYRIAM DE PEÑA (1).
COINVESTIGADORES: KATHIA CHAPARRO (1); JOSE SALVADOR MONTAÑA (1).

(1) Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café.
CENICAFE. Chinchiná. Caldas.

Teléfono: (57-68) 50 6550. Fax: [57-68] 5 04723, [57-68] 50 6630, [57-68] 50 7561.

OBJETIVOS

- Seleccionar y evaluar vectores para la introducción de ADN foráneo en células de café.
- Evaluar la expresión transitoria de genes reporteros y seleccionar las células transformadas.
- Evaluar la expresión estable e integración de los genes en células, callos y plantas.
- Construir una genoteca de ADN de *Coffea arabica* var. *Caturra*.

RESUMEN

Con el desarrollo en las últimas décadas de los métodos de ingeniería genética, muchas especies vegetales, incluyendo plantas mono y dicotiledóneas, pueden ser transformadas genéticamente con genes aislados de diferentes fuentes. Estos métodos pueden complementar los sistemas convencionales de cruzamiento y selección, proporcionando nuevas fuentes de variabilidad genética. En el caso del café, el desarrollo de un protocolo de transformación genética permitirá, por una parte, tener un sistema para incorporar a la variedad Colombia genes de resistencia contra broca del café (*Hypotenemus hampei*) y, por otra, serviría como medio para realizar estudios básicos sobre la función y regulación de genes importantes en el café.

En la primera fase de este estudio, se utilizaron protoplastos aislados de suspensiones celulares embriogénicas para estudiar la expresión transitoria de un gen reportero, el gen de la β glucuronidasa (*gusA*). Se establecieron las condiciones para la introducción de ADN facilitada por polietilenglicol (PEG) y para la expresión transitoria del gen *gusA*. Los resultados obtenidos en esta fase del estudio demostraron que era posible tener altos niveles de actividad transitoria de *gusA* en protoplastos de café, cuando se daban las condiciones apropiadas para la introducción del ADN facilitada por el PEG. Una vez establecidas las condiciones adecuadas para la expresión transitoria del gen *gusA*, se inició una segunda fase, para definir las condiciones para la transformación estable de estos protoplastos. Se utilizó como gen marcador un gen de resistencia a la kanamicina, el gen de la neomicina fosfotransferasa (*neo*). Los resultados obtenidos demostraron que el método de PEG, era un método reproducible para la transformación estable de los protoplastos de *C. arabica* genotipo 81/4-302 utilizados en este estudio. Finalmente, se demostró el carácter transgénico de los callos recuperados, mediante la evaluación de la actividad de las enzimas Neomicina Fosfotransferasa II (NPT II), y β -Glucuronidasa (GUS) y mediante el uso de la reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) y la técnica de Southern Blot. Durante el desarrollo del presente estudio no fue posible llegar a la regeneración de plantas. Se plantea, por lo tanto, continuar trabajando en este aspecto hasta lograr la regeneración de plantas a partir de estos

callos embriogénicos recuperados e iniciar nuevos ensayos de transformación con otros genotipos. Adicionalmente se construyó una genoteca de ADN de *Coffea arabica* var. *Caturra*, se desarrolló un protocolo para el aislamiento del ADN genómico que cumpliera con las condiciones de pureza, tamaño y cantidad requeridos para la construcción de la genoteca. La genoteca se construyó utilizando el fago lambda GEM-11 como vector de clonación. El título de la genoteca se estimó que era de $1,02^{10}$ recombinantes/mg de ADN del vector.

Finalmente, se construyó una genoteca de ADN complementario (cADN) de semillas de café. Para la construcción de la genoteca de ADN complementario (cADN), se utilizaron semillas del componente S34 de la variedad Colombia, recolectadas 30 semanas después de la floración (estado susceptible al ataque por la broca). Como parte de este trabajo se estableció un método para la recolección de las semillas en el campo que garantiza la integridad del ARN total; se adaptó un protocolo para la extracción del ARN total y para la purificación de los ARN mensajeros; y se realizó la síntesis del cADN a partir de los ARNm purificados de las semillas de 30 semanas. Los cADNs fueron clonados en el vector lambda gt10 y el título de la biblioteca se estimó en $5,3 \times 10^5$ ufp/ml (unidades formadoras de placa por mililitro) que corresponden a una concentración de $1,06 \times 10^6$ recombinantes/mg de ADN del vector. Este título garantiza la presencia de ARN mensajeros poco abundantes, correspondientes a genes de bajo número de copia o copia única. En la actualidad se está realizando el «screening primario» de la biblioteca con ADN total de café.

ESTUDIO DEL GENOMA DE LA YUCA MEDIANTE LAS TECNICAS DE RFLP's Y RAPD's

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ROCIO GOMEZ (1).
COINVESTIGADORES: FE RNANDO ANGEL (2), M. BONIERBALE (2),
JOE THOME (2) Y WILLIAM ROCA (2).

(1) Centro Internacional de Física. Edificio de Programas Especiales Manuel Ancizar.
Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá, D. C. Telefax: (57-1) 368 1335 - 368 1517 - 369 0487.

(2) Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Cali. Apartado Aéreo 6713,
Teléfonos: (57-2) 445 0273, 445 0000. Fax: (57-2) 664 7243.

E-mail: w.roca@cgnet.com

OBJETIVOS

- Adecuación de técnicas que permitan obtener y caracterizar fragmentos genómicos, como marcadores y organizar estos marcadores en grupos de ligamiento.
- Construcción de una biblioteca genómica (genoteca) de yuca.
- Detección de polimorfismo en los fragmentos de las líneas parentales.
- Evaluación de la segregación de marcadores en F_1 .

RESUMEN

La yuca (*Manihot esculenta*), es un cultivo de gran importancia alimenticia en países en vías de desarrollo, en Africa, Asia y América Latina, pero a pesar de ello muy poco conocimiento se tiene a cerca de su genética. Este estudio ofrece un punto de partida para el estudio de genes asociados a características de interés, mejoramiento de variedades, y abre posibilidades para el planeamiento de nuevos cruces.

El tipo de herencia de marcadores moleculares del tipo "RAPD's", marcadores polimórficos de ADN amplificados al azar, fue estudiado en una progenie F_1 proveniente de un cruce intraespecifico a partir de padres heterocigotos. El análisis confirmó la utilidad de marcadores "RAPD's" para comparar candidatos ideales de parentales para el desarrollo de un mapa genético molecular, y produjo un número suficiente de marcadores para llevar a cabo análisis de ligamiento en la yuca, cultivo con muy pocos estudios de genética tanto clásica como molecular. Seis líneas fueron evaluadas como potenciales padres en cruces, mostrando entre 1,82 y 8,62 bandas segregantes por «primer» en tres familias híbridas evaluadas. Cuarenta y tres por ciento (309) de los 722 «primers» dieron productos polimórficos en el cruce más útil de los tres, generando 328 marcadores de dosis simple, los cuales segregaron 1:1 (presencia: ausencia) en una progenie de 98 individuos. Un segundo grupo de marcadores fueron aquellos que estuvieron presentes en ambos padres, no polimórficos, pero que segregaron en la progenie. Cincuenta y siete (57%) de estos marcadores segregaron en la proporción 3:1, segregación esperada en un cruce entre heterocigotes con marcadores de dosis simple. También fueron construidos grupos de ligamiento con marcadores provenientes de cada una de las líneas parentales.

OBTENCION DE PLANTAS TRANSGENICAS DE PAPA RESISTENTES AL VIRUS X DE LA PAPA Y AL VIRUS DEL ENROLLAMIENTO DE LA HOJA DE PAPA MEDIANTE TRANSFORMACION CON *Agrobacterium tumefaciens*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ORLANDO ACOSTA (1).
COINVESTIGADORES: JOSE PEÑARANDA (1); INGRID SCHULER (1);
ANTONIO ANGARITA (1); LILIANA FRANCO (1); HUSH BARKER (2);
MICHAEL MAYO (2).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Medicina. Laboratorio de Bioquímica. Ciudad Universitaria.
Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 222 5401. Telefax: (57-1) 368 1390.
(2) Scottish Crop Research Institute (SCRI), División of Virology, Escocia.

OBJETIVOS

- Secuenciar el gen que codifica para la proteína de la cápside (GCP) de virus que infectan al cultivo de papa aislados en Colombia y Francia.
- Comparar las secuencias del GCP de aislamientos colombianos, franceses y de otros países.
- Escoger las secuencias del gen de la proteína de la cápside de los aislados franceses y colombianos que potencialmente puedan ser efectivas para proporcionar protección viral en plantas transgénicas de papa.
- Obtener información relacionada con la secuencia del gen que codifica para la proteína de la Cápside (GCP) de virus que infectan a los cultivos de papa aislados de Colombia y Francia.

RESUMEN

La coinfección de plantas de papa con el virus X de la papa (Potato X potexovirus, PVX), con los virus PVX y con el virus del enrollamiento de la hoja de papa (Potato leafroll luteovirus, PRLV), reduce la producción del tubérculo a niveles que oscilan entre 65% y 100%. El control químico del vector del PRLV ha sido ineficiente y ecológicamente no aconsejado, mientras que la diseminación del PVX tiene lugar muy fácilmente en una forma mecánica y no se le conoce vector controlable a través de manejo agroquímico.

Este proyecto pretende el establecimiento de una metodología de micropropagación, transformación, regeneración y evaluación genética de las plantas transgénicas de papa resistentes a la infección por los virus PVX y PRLV.

Los experimentos más sistemáticos se desarrollaron en el sistema modelo de *N. tabacum* con el propósito de disponer de un sistema control positivo o de referencia en los procedimientos de transformación, regeneración y en las pruebas bioquímicas y de biología molecular implicadas en la producción y caracterización de plantas transgénicas.

Se logró la selección de secuencias genómicas del virus del Enrollamiento de la hoja de la papa, PRLV. Se seleccionó el gen de la proteína de la cápside (CP) del PRLV entre la colección de clones

de genes de PRLV. Esta colección contiene los genes de aislamiento de los países latinoamericanos productores de papa y se halla depositada en la Scottish Crop Research Institute, SCRI que coopera en el desarrollo de éste proyecto.

Además se realizó la inserción de la secuencia genómica de la CP del PRLV en el vector pSCR107 contenido en la cepa LAV4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. La transformación se llevó a cabo mediante el cocultivo de segmentos de hoja y tallo de *Solanum phureja*, papa criolla, con la cepa de *A. tumefaciens*.

Finalmente, se regeneraron plantas transgénicas de *S. phureja* que expresan el gene de la capsida del virus del enrollamiento de la hoja de la papa (CP de PRLV). Estas plantas de *S. phureja* se hallan en el proceso de tuberización y desafío con cepas de PRLV en condiciones de invernadero.

PRODUCCION DE BIOINSECTICIDAS BACTERIANOS CONTRA INSECTOS PLAGA DEL ALGODONERO Y OTROS CULTIVOS DE IMPORTANCIA ECONOMICA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: HECTOR ALDANA (1).
COINVESTIGADORES: G. BUITRAGO (1); W. MARTINEZ (1); E. PIÑEROS (1);
R. RINCON (1); J. DIAZ (1); T. ARANGO (1); A. RODRIGUEZ (1); E. CAMERO (1);
Y. BERDUGO (1); A. ZAMORA (1).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología.
Edificio Manuel Ancizar. Santafé de Bogotá, D. C.
Teléfonos: (57-1) 316 5000. Ext: 16966. Fax: (57-1) 316 54 15.

OBJETIVOS

- Evaluar el bioinsecticida mediante bioensayos en el laboratorio, invernadero y en campo.
- Estudiar las operaciones de separación y purificación de la delta-endotoxina.
- Estudiar las relaciones entre las condiciones agroecológicas del cultivo de algodón y la eficacia del bioinsecticida.

RESUMEN

El sector agrícola ha sido muy importante en el desarrollo económico del país; diversos factores han influido para que cultivos como el algodón hallan reducido su participación en la producción, entre ellos el ataque de insectos como el *Heliothis virescens* (F), *Heliothis zea* (Boddie) y *Spodoptera frugiperda* (J. E. Smith); en el control de las larvas de estos insectos se han empleado insecticidas químicos que originan problemas de contaminación y efectos residuales que inducen resistencias en estas plagas. El control biológico empleando *Bacillus thuringiensis* (Bt) surge como una alternativa importante por su alta especificidad, biodegradabilidad y no ser tóxico para el humano y animales benéficos.

Un componente importante de la tecnología asociada al control biológico con Bt lo constituye la producción por fermentación del ingrediente activo (cristal entomocida y esporas). En este proyecto se estudió el cultivo Bt variedad kurstaki (HD1) en bioreactores hasta de 7 litros, determinando el comportamiento cinético del cultivo y la relevancia y función de los nutrientes suministrados en el medio de cultivo. Se evaluó la influencia de la aireación y la agitación sobre el coeficiente de transferencia de oxígeno K_{La} , que debe ser considerado como criterio de escalamiento en este cultivo. Se evaluó la actividad entomocida de diferentes aislamientos de Bt por bioensayos y se determinó el ciclo de vida y se evaluaron dietas artificiales para *H. virescens* (F) y *S. frugiperda* (J. E. Smith).

Se estableció la cinética de crecimiento de cepas nativas (IBUN7.1, IBUN7.2, IBUN9.1, e IBUN1.6) y se comparó con la cepa patrón HD1; en general, el comportamiento cinético es similar y las velocidades específicas de crecimiento se encuentran entre $0,39 \text{ h}^{-1}$ y $0,50 \text{ h}^{-1}$. En cuanto a la producción de biomasa se encontró que ésta no guarda relación directa con la producción de esporas y de proteína. En la evaluación del efecto de los nutrientes se encontró que la glucosa como fuente de carbono tiene un efecto significativo sobre la producción de biomasa y sobre la esporulación. Se encontraron relaciones positivas entre el suministro de extracto de levadura y glucosa, sulfato de manganeso y de magnesio sobre la producción tanto de biomasa como de esporas y cristal.

Con los bioensayos se identificaron tres aislamientos (IBUN6.4, IBUN3.3 e IBUN2.6) como promisorios por su actividad larvicida contra *H. virescens* y dos (IBUN4.0 e IBUN3.8) contra *S. frugiperda*.

SELECCION Y PROPAGACION DE NOGAL CAFETERO (*Cordia alliodora*), ALISO (*Alnus acuminata*) Y MORA (*Rubus glaucus*) POR CULTIVO DE TEJIDOS IN VITRO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MARTHA LEONOR MARULANDA ANGEL (1).
COINVESTIGADORES: LUIS GONZAGA GUTIERREZ (1)
AMPARO CASTRO VALLEJO (1).

(1) Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias Ambientales. Pereira.
Apartado Aéreo 97. Teléfono: (57-63) 352 785. Fax: (57-63) 354 446.

OBJETIVOS

- Seleccionar material básico de "Nogal cafetero" (*Cordia alliodora*) y adaptar las metodologías necesarias para su propagación masiva a través de cultivo de tejidos vegetales "in vitro".
- Seleccionar material básico de mora (*Rubus glaucus*) y adaptar las metodologías para su propagación masiva a través del cultivo de tejidos vegetales "in vitro".
- Adaptar las metodologías necesarias para la propagación de aliso (*Alnus acuminata*) para la micropropagación a través del cultivo de tejidos "in vitro".
- Evaluar el comportamiento "in vitro" de varios explantes de *Cordia alliodora*, según edad del árbol donante, tales como yemas de árboles adultos, yemas de árboles de invernadero y yemas de plántulas recién germinadas.
- Determinar las condiciones adecuadas para la desinfección superficial de los explantes de *Cordia alliodora*.
- Determinar las condiciones adecuadas de cultivo para cada uno de los explantes de *Cordia alliodora*.
- Iniciar el estudio de las condiciones favorables para la adaptación del material micropropagado de *Cordia alliodora*, a condiciones de invernadero.
- Seleccionar en el campo material juvenil de los árboles de *Cordia alliodora*, que exhiban características genéticas deseables para propagación e iniciar su establecimiento "in vitro".
- Determinar las condiciones adecuadas para la propagación masiva de mora *in vitro* a partir de plantas seleccionadas.
- Determinar las condiciones favorables para la adaptación del material micropropagado a condiciones de invernadero.
- Definir las condiciones adecuadas para la micropropagación de plantas seleccionadas de aliso.
- Definir las condiciones adecuadas para la adaptación de plantas de aliso producidas *in vitro* a condiciones de invernadero.

RESUMEN

En la zona cafetera colombiana el cambio del cultivo del café tradicional (con sombrío) a café tecnificado (sin sombrío) con altas densidades de siembra (10,000) plantas/hectárea implicó la eliminación de un estrato arbóreo en un sistema agroforestal desarrollado por los caficultores. En este trabajo se propone el fomento del cultivo de Nogal cafetero (*Cordia alliodora*), Mora (*Rubus glaucus*) y Aliso (*Alnus acuminata*) como una alternativa de ingresos para los caficultores y como fomento de especies maderables nativas para la protección de cuencas hidrográficas.

Se seleccionó material vegetal básico de Nogal cafetero, Mora de castilla y Aliso, y se están adaptando las metodologías para su propagación masiva a través del cultivo de tejidos vegetales *in vitro*.

NOGAL CAFETERO (*Cordia alliodora*)

Para este estudio se seleccionaron 11 árboles de alta calidad (árboles plus), conjuntamente con la Corporación Autónoma Regional de Risaralda (CARDER), en los municipios de Marsella, Santuario, Santa Rosa de Cabal, Belén de Umbría y Ulloa.

Se realizaron ensayos de cultivo *in vitro* de yemas y nudos de los árboles adultos, estos explantes se recolectaron directamente en el campo, los porcentajes elevados de contaminación y fenolización impidieron continuar por esta vía. Como alternativa se desarrolló la técnica de injertación de yemas adultas en árboles de vivero lo que ha permitido tener yemas y brotes de los árboles seleccionados rejuvenecidos y cerca del laboratorio.

Los árboles de vivero son sometidos a fumigaciones con fungicidas y podas severas, posteriormente los segmentos nodales son recolectados y desinfectados con una solución de hipoclorito de sodio al 1% del compuesto activo (NaCl), se enjuagan 3 veces en agua destilada estéril.

Se evaluaron los medios de cultivo Murashige y Skoog (MS), MS /2 (MS a la mitad de la concentración y Woody Plant Medium (WPM), se evaluaron también diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento. Para segmentos nodales y yemas apicales la mejor respuesta se obtuvo con el medio MS/2 y una combinación de Kinetina 1 mg/L y ácido giberélico 0,25 mg/L, se observó brotación rápida, elongación de tallo y formación de hojas.

Las semillas se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% del compuesto activo (NaCl) durante 20 minutos, se extrajeron los embriones e inocularon en medio MS/2 con 1 mg/L de benziladenina y 0,25 mg/L de ácido indolbutírico. Una vez germinadas las plántulas, se tomaron segmentos de hojas cotiledonares y normales se sembraron en medios para inducir la formación de callo; se evaluaron diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento, se formó callo friable y de color cremoso en medio MS/2 con 1 mg/L de benziladenina y 0,5 mg/L de 2,4 D y medio MS/2 con 1 mg/L de 2,4 D. Se evalúan diferentes medios en busca de regenerar plantas.

ALISO (*Alnus acuminata*)

Se ha regenerado *in vitro* la especie *Alnus acuminata* H.B.K. (Aliso cerezo). Se han obtenido callos en medio MS/2 con M-inositol 100 mg/l, Phytigel 3,0 g/l como gelificante y combina-

ciones de auxinas y citoquininas (ANA 1 mg/l y BA 3,2 mg/l); en medio de maduración MS/2 sin hormonas se ha obtenido una tasa alta de regeneración de embriones somáticos y en medio con giberelina (AG₃ 0,5 mg/l) se ha obtenido germinación de embriones. Las plántulas se han desarrollado satisfactoriamente en medio AIA 0,5 mg/l y GA 0,25 mg/l. Las plantas son llevadas a condiciones de vivero utilizando como sustrato «forestry pellets», donde se les mantiene en cámara húmeda por diez días luego de lo cual son periódicamente expuestos al medio de invernadero hasta su adaptación definitiva. Se propone la embriogénesis somática como una vía eficiente para la micropropagación de aliso.

MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*)

Se desarrolló una metodología para la propagación industrial de Mora de castilla, *Rubus glaucus*, su establecimiento en invernadero y posterior entrega a los agricultores.

Para la multiplicación masiva de mora se utilizó el medio Murashige y Skoog a la mitad de la concentración con M-inositol 100 mg/l y Tiamina 0,01 mg/l, como regulador de crecimiento BAP 1 mg/l y AG₃ 1 mg/l con Phytigel 2,7 g/l como gelificante.

Se obtuvo callo a partir de fragmentos de hoja de plantas propagadas *in vitro* en MS/2 suplementado con 1 mg/l de 2,4D y 1 mg/l de kinetina, Inducción de brotes se obtuvo utilizando MS/2 con 0,2-0,5 mg/l de Kinetina y se obtuvo regeneración esporádica de plantas.

El sustrato utilizado para la siembra en invernadero es «forestry pellets», las plantas se colocan en cámara húmeda durante cinco días, al cabo de este tiempo se empiezan a destapar por horas, hasta su adaptación definitiva.

Se desarrollo un convenio interinstitucional con el Comité Departamental de Cafeteros, Corpoica y la Universidad Tecnológica de Pereira para la producción de cien mil plantas de mora en el año 1998, en la actualidad se han entregado veinte mil plantas que han sido sembradas en los municipios de Santa Rosa, Santuario y Apia (Risaralda, Colombia). Se están evaluando diferentes medios de cultivo y concentraciones hormonales para inducir la producción de embriones somáticos y/o brotes.

Se cuenta con un protocolo de extracción de ADN (Dellaporta modificado y limpieza del extraído con carbón activado) en condiciones que permite su amplificación.

II. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

MORA DE CASTILLA
(*Rhus glabra*)

EVALUACION DE MICROALGAS EN BIORREACTORES PARA EL TRATAMIENTO TERCIARIO DE AGUAS RESIDUALES AGROINDUSTRIALES

INVESTIGADORA PRINCIPAL: SANDRA SNEDA BAENA (1).
COINVESTIGADORA: LUZ STELLA GONZALEZ (1).

(1) Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
Programa de Saneamiento y Biotecnología Ambiental. Carrera 7 No. 43-82,
Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 56710.
Teléfono: (57-1) 320 8320 Ext: 4089. Fax (57-1) 285 05 03.

OBJETIVOS

- Evaluar en un biorreactor la utilización de especies de algas aisladas de un sistema de lagunas de oxidación de efluentes, para la estabilización de materia orgánica y remoción de nutrientes en aguas residuales agroindustriales, como tratamiento terciario.
- Determinar el porcentaje de remoción de nutrientes de aguas residuales agroindustriales por acción del crecimiento de microalgas en un biorreactor.
- Cuantificar la producción de biomasa algal obtenida en el biorreactor alimentado con las aguas residuales agroindustriales.
- Evaluar la disminución de la materia orgánica por oxidación bacteriana de las aguas residuales agroindustriales.
- Determinar el porcentaje de disminución de bacterias del grupo coliforme en las aguas residuales sometidas al tratamiento terciario.
- Establecer un banco de cepas de microalgas para futuros estudios.
- Evaluación técnico-económica del sistema de microalgas como sistema de tratamiento terciario.

RESUMEN

Los cultivos de microalgas son un sistema biológico eficiente en la utilización de nutrientes presentes en las aguas residuales y por lo tanto, constituyen una alternativa promisoría en la producción de biomasa y en tratamientos de depuración de aguas residuales agroindustriales.

En esta investigación se hicieron pruebas comparativas de crecimiento entre las algas Clorificas *Chlorella vulgaris* Beijerinck y *Scenedesmus dimorphus* (Turp.) Kütz. Aisladas de un sistema de lagunas de estabilización. Se emplearon como medios de cultivo, los medios minerales Bold y C30, además de agua residual agroindustrial proveniente del mismo sistema de lagunas. Los cultivos de las dos especies se hicieron en lote, en reactores circulares de vidrio de 4L de capacidad (volumen de trabajo de 2L) y además, para *C. vulgaris* se utilizó un reactor de sección triangular de 50L de capacidad (volumen de trabajo de 30L). Los cultivos se mantuvieron a temperatura ambiente (20 °C), bajo iluminación continua (60 micromol/m²/seg) y burbujeo constante.

Según los resultados, *C. vulgaris* presentó un crecimiento más rápido y una mayor densidad celular que *S. dimorphus*.

En aguas residuales con contenidos promedio de amonio (8 ppm), nitratos (4 ppm), fósforo total (52 ppm), DQO (173 ppm) y sólidos totales en suspensión (49 ppm), la eficiencia de *C. vulgaris* en remoción de amonio fue de 93%, fósforo de 59%, sólidos totales de 57% y DQO de 52% en reactor de sección triangular y remoción de amonio de 97%, fósforo de 9%, sólidos totales en suspensión de 57% y DQO de 15% en reactor de sección triangular; *S. dimorphus* presentó una eficiencia en la remoción de amonio del 92%, fósforo del 33%, sólidos totales en suspensión de 66% y DQO de 1%.

Los resultados obtenidos muestran que las dos especies de microalgas utilizadas, ofrecen una buena alternativa en el tratamiento biológico de aguas residuales agroindustriales, específicamente en la remoción de nitrógeno y fósforo.

III. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

III. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

AUMENTO DE LA PRODUCCION DE SOLVENTES POR *Clostridium acetobutylicum*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: EDELBERTO SILVA G (1)
COINVESTIGADORES: DOLLY MONTOYA (2); EVA R. KASHKET (3)

(1) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Ciudad Universitaria

Santafé de Bogotá D. C. Teléfono: (57-1) 316 5045. Fax: (57-1) 316 5060.

E-Mail: esilva@ciencias.ciencias.unal.edu.co

(2) Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Ciudad Universitaria

Santafé de Bogotá D. C. Teléfono: (57-1) 316 5450. Fax: (57-1) 316 5415.

E-Mail: domontoy@ciencias.ciencias.unal.edu.co

(3) Boston University. School of Medicine. USA.

OBJETIVOS

- Organización y manejo del cepario de *Clostridium acetobutylicum*
- Aislamiento de cepas nativas de *C. acetobutylicum* de suelos colombianos
- Aislamiento de mutantes de *Clostridium acetobutylicum* resistentes al butanol por transconjugación.
- Estudio de mecanismos de resistencia al butanol mediante estudios de función y composición de la membrana celular en *C. acetobutylicum* DSM 1732 y mutantes espontáneos resistentes al butanol.
- Aislamiento de mutantes de *Clostridium acetobutylicum* hiperproductoras de hidrógeno.

RESUMEN

La organización y manejo del cepario de *Clostridium acetobutylicum* se desarrolló mediante el establecimiento de los procedimientos de crecimiento, conservación, mantenimiento y reactivación de las diferentes cepas obtenidas por aislamiento, o las desarrolladas por mutaciones espontáneas o de transposición. Este trabajo también incluye un programa de revisión de viabilidad para hacer control sobre la calidad del material conservado.

El aislamiento de cepas nativas de *Clostridium acetobutylicum* se hizo de 155 muestras de suelos colombianos. Se lograron 178 aislados, los cuales fueron evaluados para producción de acetona (100 dieron reacción fuerte y 78 reacción débil); para producción de butanol (100 producen más de 2 g/l). Se encontró una mayor producción de solventes totales en los suelos donde se cultivan tubérculos (9,5 g/l) seguido de café (7,7 g/l) y pasto (7,5 g/l). Respecto al pH del suelo, los de suelos ácidos son el 63,64% de los aislados con una producción global media de solventes totales de 6,0 g/l, mientras los de pH neutro son el 36,36% con una producción media de 6,6 g/l. Solo el 8,5% tienen mayor producción de solventes totales que la cepa de referencia *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824 (14 g/l de solventes totales). Dos de los aislados (66A y 125C) superaron la producción de butanol de la cepa de ATCC 824 (8,4 g/l), los aislados 18A y 63D superan en producción de acetona a la cepa *Clostridium acetobutylicum* ATCC 824

(4,2 g/l). Por último, aquellos aislados que dan evidencia de activación (turbiedad y producción de gas) a las 24 horas de incubación tiene una mayor probabilidad de ser productoras de solventes, no así las que se activan a las 48 horas.

En cuanto a la obtención de los mutantes por transposición se logró recuperar 451 aislados resistentes a eritromicina (25 g/ml) y butanol (1,25% p/v) de 29 eventos de transconjugación. De estos, 110 se activaron por choque térmico (70°C/10 min.), de los cuales 95 son mutantes esporulantes. De los 95 aislados, 58 resisten a la tetraciclina (10 g/ml). De los 58 aislados, 9 resisten 2% p/v de butanol, 8 resisten 1,8%, 29 resisten 1,25% y 12 resisten 1,0% de butanol. En las mutantes resistentes al butanol se encuentran tanto hiperproductoras como hipoproductoras de solventes. Se encontró que el 63,8% de estas mutantes superan la producción de etanol, el 5% la de acetona y el 10,3% la de butanol con respecto al *C. acetobutylicum* ATCC 824. Para resaltar, las mutantes 21K1 y 22A9 producen 19.9 y 19,2 g/l de solventes totales.

El estudio de la composición de los lípidos y ácidos grasos de membrana se hizo en *C. acetobutylicum* DSM 1732, ATCC 824 y de tres mutantes espontáneas de DSM 1732 resistentes al butanol. En este trabajo se encontró aparte de los fosfolípidos reportados en la literatura para *C. acetobutylicum* un tercer fosfolípido al cual no se le pudo determinar su estructura, en las cepas DSM 11732 y sus mutantes espontáneas. Con relación al contenido de fosfolípidos totales, se demostró que este es mayor en las cepas mutantes que en las otras dos. Se determinó la presencia de los ácidos grasos C12, C14, C16, C18, C18:2 y C18:1 en todas las cepas; C16:1 en 04M, C22 en DSM 1732 y 10 AN; y C26 en 10 AN. El contenido de ácidos grasos saturados e insaturados disminuye a las 48 horas en las cepas DSM 1732 y 04M, mientras en la cepa 10 AN aumenta. La relación ácidos grasos saturados vs. insaturados aumenta alas 48 horas y vuelve a disminuir a las 72 horas en todas las cepas.

En cuanto a la determinación de pH en cultivos con *C. acetobutylicum* DSM 1732 y tres mutantes espontáneas resistentes al butanol. Se comprobó que este es mayor en las cepas mutantes que en la cepa silvestre, lográndose su máximo valor a las 24 horas, que es cuando se establece el cambio a la fase solventogénica. Este valor a su vez es mayor para la cepa mutante hiperproductora (10 AN), y sigue siendo mayor a las 48 horas.

Respecto a los mecanismos de resistencia al butanol se demostró que la composición inicial de la membrana del microorganismo lo capacita para hacer frente a altas concentraciones de butanol, pero adicionalmente, la cepa debe ser capaz de presentar una respuesta al ataque de los solventes, representada en un cambio en la composición de la membrana. Este cambio se ve representado por la síntesis de nuevos lípidos, un aumento en el contenido de los fosfolípidos y en la posibilidad de aumentar el contenido de ácidos grasos saturados a expensas de los insaturados. Lo anterior capacita al microorganismo para mantener un gradiente de pH transmembrana en un alto valor, y así acumular altas concentraciones de solventes.

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE LAS PECTINAS DE FRUTAS TROPICALES (*)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SALOMON FERREIRA ARDILA (1)

(1) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias Departamento de Farmacia. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá, D.C. Teléfono: (57-1) 316 5080. Fax: (57-1) 316 5060

(*) Proyecto cofinanciado por COLCIENCIAS y por el Programa Multinacional de Biotecnología y Tecnología de Alimentos (PMBTA, OEA)

OBJETIVOS

- Caracterizar las pectinas y los subproductos de procesamiento de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) y de la Uchuva (*Physalis peruviana*) con el objeto de diseñar posibles procesos para su producción a nivel industrial.
- Caracterizar las pectinas y los subproductos del procesamiento de la Mora de Castilla y de la Uchuva.
- Determinar la influencia de los parámetros de pH, la temperatura, los tiempos de calentamiento sobre el proceso de extracción y sobre la calidad de las pectinas de la Mora de Castilla y de la Uchuva.
- Diseño de procesos a nivel de laboratorio y planta piloto empleando como materia prima los residuos del procesamiento o de manejo (como las frutas o los vegetales descartados en los procesos de selección por daño mecánico o por otros factores de calidad como tamaño, variedad, grado de maduración, etc. o los mismos procesos productivos como cáscaras, penachos, residuos de pulverización y afinado de pulpas).

RESUMEN

En la actualidad Colombia invierte una cantidad apreciable de dinero en la importación de materias primas, entre ellas pectinas, aunque cuenta con una gran variedad de productos naturales perecederos que contienen pectina especialmente frutas. Estos se pierden en grandes cantidades por falta de un mejor aprovechamiento, además en las líneas de mercadeo y procesamiento de las frutas se producen una serie de residuos o desechos que en su mayoría son basuras, no son empleados y pasan a engrosar el gran volumen de materia orgánica contaminante de la cual hay que disponer aumentando así los costos de los procesos productivos y los efectos negativos sobre los ecosistemas.

La producción de pectina a partir de desechos industriales de las frutas es una posible solución a éste problema y está encaminada a disminuir las pérdidas mediante la utilización racional de los productos de desecho del procesamiento y su posterior comercialización.

El propósito de éste proyecto es caracterizar las pectinas presentes en las frutas y en los subproductos del procesamiento de la mora de Castilla (*Rubus glaucus*) y la uchuva (*Physalis peruviana*) con el fin de diseñar posibles procesos para su producción a nivel industrial. Adicionalmente se determinará la influencia del pH, la temperatura y los tiempos de calentamiento sobre el proceso de extracción y sobre la calidad de la pectina.

Para la mora de Castilla se hicieron extracciones a pH 2,2 y 3,6 y tiempos de hidrólisis de 45 y 75 minutos con relaciones de pulpa: medio de extracción 1 : 1 y 1 : 5 p/p. Se hicieron dos extracciones para tratar de agotar la pectina de los tejidos vegetales. Para ajustar acidez se emplearon ácido clorhídrico y soda para pH 3,6. En total se procesan once (11) lotes piloto los cuales tuvieron rendimientos entre 0,390% y 1,366% p/p los cuales fueron mayores a pH 3,6 que a pH 2,2. Para tratar de disminuir la coloración impartida por las antocianinas presentes en la mora se hicieron ensayos de laboratorio para seleccionar el mejor método de decoloración empleando tierra de diatomeas, redispersión en agua y reprecipitación, filtración por un lecho de carbón activado y paso por columna con resina catiónica 50WX4.

La caracterización se hizo según las normas de la OMS y la FAO y los datos se compararon con una muestra de pectina cítrica comercial Unipectine RS 150.

Los análisis realizados a las pectinas de mora de Castilla provenientes de los 11 lotes piloto permiten concluir en forma resumida que:

1. El mayor rendimiento se obtiene con pH 3,6; tiempo de hidrólisis 45 min. y relación fruta medio de extracción 1 : 3
2. No se justifica hacer más de una hidrólisis debido a los altos costos de vapor, alcohol para la separación, tiempo de procesamiento, etc.
3. La adición de hexametáfosfato de sodio no aumenta la extracción y si desmejora la calidad de la pectina.
4. La resina de intercambio iónico Dowex 50W-X4 no mejora en forma significativa el color de la pectina aunque puede producir un producto de mejor calidad.
5. La extracción de pH 3,6 produjo los valores más altos de rendimiento y peso equivalente a los más bajos de acidez libre.
6. Las condiciones de extracción para pectina de alto metoxilo, tiempo de asentamiento rápido y alto grado de gelificación son: pH 3,6; tiempo de hidrólisis 45 minutos y relación pulpa: agua 1 : 1 p/p, a pH 2,2 se pueden obtener pectinas de bajo metoxilo.

En el caso de las pectinas de uchuva (10 lotes) se obtuvieron las siguientes conclusiones:

1. Las mejores condiciones de extracción son pH 3,2; tiempo de hidrólisis 75 minutos, relación pulpa: agua 1 : 1 y temperatura de hidrólisis 90°C.
2. Se encontró que existe relación entre las condiciones de extracción y la calidad de la pectina obtenida y que no se presentan problemas con el color del producto.
3. El uso de tierra de diatomeas, supercel y hexametáfosfato de sodio en los procesos de extracción no mejoran la calidad de producto.
4. La pectina obtenida de uchuva es de bajo metoxilo (<7%) y de asentamiento rápido en todos los 10 lotes procesados y sus propiedades viscosantes no cambian con las condiciones de extracción. Pueden emplearse en productos con bajas calorías.

EXTRACCIÓN Y CARACTERIZACIÓN DE LA PECTINA DE MORA DE CASTILLA (*Rubus glaucus*)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SALOMON FERREIRA ARDILA (1);
IRMA MARITZA CONTRERAS DÍAZ (1); JANENETH ALEXANDRA ESTUPIÑAN (1).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Ciudad Universitaria.

Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 316 5080. Fax: (57-1) 316 5060.

(*) Proyecto cofinanciado por COLCIENCIAS y por el Programa Multinacional de Biotecnología y Tecnología de Alimentos (PMBTA, OEA)

OBJETIVOS

- Caracterizar las pectinas y los subproductos de procesamiento de la Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) con el objeto de diseñar posibles procesos para su producción a nivel industrial.
- Caracterizar las pectinas y los subproductos del procesamiento de la Mora de Castilla.
- Determinar la influencia de los parámetros de pH, la temperatura, los tiempos de calentamiento sobre el proceso de extracción y sobre la calidad de la Mora de Castilla.
- Diseño de procesos a nivel de laboratorio y planta piloto empleando como materia prima los residuos del procesamiento o de manejo (como las frutas o los vegetales descartados en los procesos de selección por daño mecánico o por otros factores de calidad como tamaño, variedad, grado de maduración, etc. o los mismos procesos productivos como cáscaras, penachos, residuos de pulverización y afinado de pulpas).

RESUMEN

En busca de aprovechar la gran variedad de productos perecederos de nuestro país y teniendo en cuenta que la Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) por sus aspectos agrícolas es una buena alternativa para el desarrollo de productos agroindustriales se pretendió extraer y caracterizar la pectina de la Mora de Castilla, estandarizando condiciones del proceso relacionadas con pH, tiempo de hidrólisis, relación pulpa-agua y su influencia en la cantidad y calidad de la pectina obtenida.

Se encontró como el método de extracción más eficiente, debe dirigirse hacia la obtención de un producto de alto o bajo metoxilo, empleando como parámetro de selección el pH de hidrólisis, pH 2,2 para pectinas de bajo metoxilo y pH 3,6 para pectinas de alto metoxilo. Las condiciones de extracción para obtener una pectina de alto metoxilo, tiempo de asentamiento rápido y alto poder de gelificación, según los estándares internacionales de la Organización Mundial de la Salud (OMS) y el Fondo de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Infancia. (FAO) fueron: pH 3,6, tiempo de hidrólisis 45 minutos y relación pulpa:agua 1:1 peso/peso.

EXTRACCION Y CARACTERIZACION DE LA PECTINA DE UCHUVA (*Physalis peruviana*)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SALOMON FERREIRA ARDILA (1);
CELAY MARCELA CERA (1); SANDRA PATRICIA HURTADO(1).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia. Ciudad Universitaria.

Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 316 5080. Fax: (57-1) 316 5060.
[*] Proyecto cofinanciado por COLCIENCIAS y por el Programa Multinacional de Biotecnología y Tecnología de Alimentos (PMBTA, OEA)

OBJETIVOS

- Caracterizar las pectinas y los subproductos de procesamiento de la Uchuva (*Physalis peruviana*) con el objeto de diseñar posibles procesos para su producción a nivel industrial.
- Caracterizar las pectinas y los subproductos del procesamiento de la Uchuva.
- Determinar la influencia de los parámetros de pH, la temperatura, los tiempos de calentamiento sobre el proceso de extracción y sobre la calidad de la Uchuva.
- Diseño de procesos a nivel de laboratorio y planta piloto empleando como materia prima los residuos del procesamiento o de manejo (como las frutas o los vegetales descartados en los procesos de selección por daño mecánico o por otros factores de calidad como tamaño, variedad, grado de maduración, etc. o los mismos procesos productivos como cáscaras, penachos, residuos de pulverización y afinado de pulpas).

RESUMEN

La industria farmacéutica y de alimentos del país, demanda cantidades crecientes de pectina para sus procesos industriales, pero las características de calidad y comportamiento de la misma no son suficientemente conocidas lo que conlleva un uso poco racional del producto y la pérdida de calidad del mismo.

Esta propuesta pretende extraer y caracterizar la pectina de la Uchuva (*Physalis peruviana*). Se ensayaron diferentes sistemas de extracción, modificando el pH, el tiempo de hidrólisis y la relación en peso fruta: medio de extracción. El color y el rendimiento fueron ensayados empleando hexametáfosfato de sodio, supercel y tierra de diatomeas. La evaluación de calidad determinó contenido de cenizas, peso equivalente, acidez libre, porcentaje de metoxilo, grado de esterificación, contenido de ácido anhidrourónico, calcio, magnesio, hierro, viscosidad y grado de gelificación.

Se encontró como pH óptimo 3,2; tiempo de hidrólisis 75 minutos y una relación fruta: medio de extracción 1:1. La pectina obtenida a partir de la uchuva presenta las siguientes características: es de bajo metoxilo, posee un número grande de grupos esterificados, son de asentamiento rápido y pueden utilizarse en la elaboración de jaleas con bajo contenido de azúcar, pues gelifican con 35 % de sólidos solubles.

OBTENCION Y CARACTERIZACION DE PECTINA A PARTIR DE DESECHOS INDUSTRIALES DE MANGO (CASCARA) (*)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SALOMON FERREIRA ARDILA (1).
COINVESTIGADORAS: ADRIANA PERALTA (1) GIULIANA RODRIGUEZ (1).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Ciencias. Departamento de Farmacia.
Ciudad Universitaria.

Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 316 5080. Fax: (57-1) 316 5060.

(*) Proyecto cofinanciado por COLCIENCIAS y por el Programa Multinacional de
Biotecnología y Tecnología de Alimentos (PMBTA, OEA)

OBJETIVOS

- Determinar las mejores condiciones de extracción de la pectina contenida en la cáscara del mango (*Mangifera indica*) y establecer sus características de calidad.

RESUMEN

El objetivo de este trabajo fue establecer las mejores condiciones de pH y tiempo de hidrólisis para la obtención de pectina a partir de cáscara de mango común (*Mangifera indica*) y observar la influencia del uso de hexametáfosfato de sodio como adyuvante de hidrólisis en el proceso de extracción.

La materia prima para esta investigación se obtuvo de desechos industriales del procesamiento de mango común. Se realizaron extracciones de pectina a partir del exocarpio, empleando como parámetros de selección del proceso de extracción ácida, el pH (3,2; 3,4 y 3,6) y el tiempo de hidrólisis (45; 60 y 75 minutos) para obtener la pectina de mejor calidad y rendimiento. Los parámetros analizados fueron: humedad, cenizas, alcalinidad de cenizas, acidez libre, peso equivalente, grado de esterificación y comportamiento reológico, contenido de ácido hialurónico, contenido de calcio, magnesio y hierro.

Los resultados mostraron que las mejores condiciones para la extracción son pH 3,2 y un tiempo de hidrólisis de 75 minutos y que la adición de hexametáfosfato de sodio aumenta el rendimiento del proceso en un 23% pero duplica la cantidad de ácido clorhídrico necesaria para la hidrólisis.

Adicionalmente se encontró que:

Es posible obtener pectinas de buena calidad a partir de las cáscaras del procesamiento industrial del mango (50% son residuos), comparadas con una pectina de uso comercial que se tomó como patrón.

La gran mayoría de las pectinas extraídas demostró ser de bajo contenido de metoxilo lo que las hace útiles en la obtención de geles con bajo contenido de sólidos solubles (azúcar) y por lo tanto de alimentos (mermeladas y jaleas) de bajo poder calórico.

De las pectinas obtenidas la mejor fue la que se obtuvo por hidrólisis a pH 3,2 y con 75 minutos de calentamiento, incluyendo en el proceso hexametáfosfato de sodio, condiciones que permitie-

ron obtener el más alto grado de ácido anhidrourónico, AUA y un rendimiento de 23-24% aunque duplica la cantidad de ácido clorhídrico necesario para hacer la hidrólisis.

Los residuos de la extracción de la pectina podrían ser empleados como materia prima en la producción de concentrados para animales.

OLETTOS ADVIETLO

RESUMEN

PRODUCCION DE PECTINASA POR FERMENTACION SUMERGIDA UTILIZANDO DESECHOS CITRICOS COMO SUSTRATO (*)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: CLAUDIA ORTIZ (1).
COINVESTIGADOR: FERNANDO ACEVEDO (2).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Ciencia y Tecnología de Alimentos, ICTA. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 368 4194 – 368 1276. Fax: (57-1) 368 1452

(2) Universidad Católica de Valparaíso. Escuela de Ingeniería Bioquímica. Chile. Teléfono: (56-32) 257 331. Fax: (56-329) 233 393.

(*) Proyecto cofinanciado por COLCIENCIAS y por el Programa Multinacional de Biotecnología y Tecnología de Alimentos (PMBTA, OEA).

OBJETIVOS

- Desarrollar un proceso productivo para pectinasa fungal por fermentación sumergida (FS), utilizando los desechos cítricos como sustrato.
- Determinar la composición de los desechos cítricos a utilizar como sustrato.
- Diseñar los medios de cultivo para la producción de enzimas pécticas en FS.
- Evaluar el potencial efecto de inducción del sustrato utilizado a nivel de matraces.
- Seleccionar la cepa a utilizar con base en la caracterización de pectinasas con el fin de evaluar el comportamiento de la cepa y su potencial productivo.
- Determinar las condiciones más adecuadas para la recuperación de la enzima obtenida por FS.

RESUMEN

Este trabajo tuvo como objetivos desarrollar un proceso productivo para pectinasa fungal por fermentación sumergida (FS) utilizando desechos cítricos como sustrato y establecer el diseño de los medios de cultivos adecuados, el efecto potencial de la inducción del sustrato utilizado y determinar cuales eran las condiciones más adecuadas para la recuperación de la enzima obtenida por FS. Con tal fin se estudiaron parámetros cinéticos con la cepa del hongo *Trichoderma auriviridae* 7-121 y la cepa mutante *Aspergillus niger* CH4. El sustrato utilizado se obtuvo a partir de desechos sólidos del procesamiento de la naranja valencia y los parámetros evaluados fueron concentración celular, sulfato de amonio, proteína extracelular, actividad pectinesterasa >(PE) y actividad exo-poligalacturonasa (EXO-PG).

En los estudios de la cinética de crecimiento y producción en matraces se observó en todos los casos una producción de proteína asociada al crecimiento celular y un aumento de la actividad enzimática EXO-PG, durante la fermentación, que alcanzó su máximo durante la fase estacionaria del crecimiento para posteriormente disminuir con el aumento simultáneo de la actividad PE. Además, fue evidente que los cultivos se encontraban limitados por la fuente de carbono aportada

por los desechos cítricos y la pectina, obteniéndose un rendimiento cercano a 3g célula/g de sulfato de amonio.

Los mayores niveles de producción de pectinasa (PE y ECO-PG) se alcanzaron con un medio de cultivo en el cual se realizó control automático de pH. En esta modalidad de cultivo también se obtuvieron los mejores valores en todos los parámetros cuantificados para la actividad PE y EXO-PG.

OBJETIVOS

- Estudiar la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina.
- Estudiar la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH.
- Estudiar la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH y la concentración de sulfato de amonio.
- Estudiar la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH y la concentración de sulfato de amonio, y la concentración de pectina.
- Estudiar la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH y la concentración de sulfato de amonio, y la concentración de pectina, y la concentración de nutrientes.

RESUMEN

Se estudió la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina. Se estudió la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH. Se estudió la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH y la concentración de sulfato de amonio. Se estudió la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH y la concentración de sulfato de amonio, y la concentración de pectina. Se estudió la producción de pectinasa por *Aspergillus niger* en un medio de cultivo con desechos cítricos y pectina, controlando el pH y la concentración de sulfato de amonio, y la concentración de pectina, y la concentración de nutrientes.

IV. BIOTECNOLOGIA PECUARIA

IV. BIOTECNOLOGÍA Pecuaria

DESARROLLO DE UN NUEVO METODO DIAGNOSTICO PARA LA TUBERCULOSIS BOVINA UTILIZANDO LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MANUEL ELKIN PATARROYO (1).
 COINVESTIGADORES: JUAN G. RODRIGUEZ (1); GLORIA A. MEJIA (1);
 PATRICIA DEL PORTILLO (1); LUIS A. MURILLO (1).

(1) Instituto de Inmunología. Centro Hospitalario San Juan de Dios. Avenida 1ª Carrera 10ª. Santafé de Bogotá, D. C. Teléfonos: (57-1) 233 4698 - 2339648. Fax: (57-1) 280 3999.

OBJETIVOS

- Desarrollar un método diagnóstico utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para evaluar la presencia de tuberculosis de origen bovino en poblaciones animales y humanas y para la detección de *Mycobacterium bovis* en biopsias y secreciones de humanos sospechosos de sufrir tuberculosis zoonótica.
- Identificar una secuencia de nucleótidos especie-específica de *Mycobacterium bovis* que no este presente en otras micobacterias o en otras bacterias relacionadas.
- Aislar y caracterizar las secuencias reconocidas como exclusivas, utilizando para ello técnicas convencionales de biología molecular.
- Realizar la secuencia completa de nucleótidos del fragmento genómico escogido, mediante la reacción enzimática de los dideoxinucleótidos.
- Determinar y sintetizar químicamente los oligonucleótidos que servirán como iniciadores para PCR.
- Estandarizar la reacción de PCR a partir de ADN purificado de *M. bovis* utilizando para ello los oligos sintetizados en el objetivo anterior.
- Determinar la especificidad de la reacción de PCR empleando ADNs purificados de otras especies de micobacterias y otros microorganismos implicados en el diagnóstico diferencial de TBC bovina.
- Determinar el límite de sensibilidad de la reacción en el ADN altamente purificado de *M. bovis* y en muestras de leche previamente contaminadas con el bacilo.

RESUMEN

La tuberculosis bovina es corrientemente una importante zoonosis alrededor del mundo y la posibilidad de infección humana con *Mycobacterium bovis* no puede ser ignorada. Aunque muy escasa información epidemiológica se encuentra disponible, *M. bovis* es la causa de un 6 a un 30% de los casos de tuberculosis humana en los Estados Unidos antes de la pasteurización de la leche, según reportes de Karlson y Carr en 1970. También es la causa de un 6,3% de casos confirmados bacteriológicamente de tuberculosis en Irlanda. Además, en un estudio realizado en Nueva Zelanda, se encontró un incremento de casos de tuberculosis bovina entre los años de 1983 (3,7%) a 1989 (14,6%).

A pesar del hecho de que en algunas regiones de América Latina el diagnóstico de tuberculosis humana continúa siendo realizado por métodos tradicionales, como el extendido directo de muestras clínicas, se estiman 7.000 nuevos casos de tuberculosis humana de origen bovino de acuerdo a datos de la OPS hacia 1991.

Con el objetivo de prevenir la enfermedad a nivel del humano, un esquema de control y erradicación de *M. bovis* en el ganado se hace esencial. Sin embargo, las campañas de erradicación han sido poco satisfactorias debido a la baja sensibilidad y especificidad de las pruebas cutáneas diagnósticas, corrientemente usadas en la detección de animales infectados. Por lo tanto, el hecho de no tener un método preciso de diagnóstico para la detección del agente causal en el ganado, conlleva no sólo a un aumento del riesgo de infección en el humano, sino a pérdidas económicas en la industria ganadera.

La identificación especie-específica de las micobacterias con miras hacia el diagnóstico definitivo ha sido siempre difícil. Diferentes acercamientos desde el punto de vista serológico han sido realizados pero han fallado debido a la baja sensibilidad y especificidad, ocasionado por la alta reactividad cruzada a nivel de antígenos micobacteriales. Recientemente, las técnicas de biología molecular han mostrado ser de gran valor en el diagnóstico de micobacterias, incluso para poder distinguir entre especies, siendo la PCR muy útil en este propósito. La mayoría de estos ensayos amplifican fragmentos del llamado complejo tuberculoso y por lo tanto no pueden distinguir entre infecciones causadas por *M. tuberculosis* de aquellas causadas por *M. bovis*.

Aunque existen técnicas de identificación específica de *M. bovis*, el procedimiento requiere la amplificación previa de un fragmento común a todas las micobacterias y luego la detección específica usando sondas radioactivas o enzimas de restricción. Como consecuencia de la alta reactividad antigénica cruzada y la estrecha relación genómica entre las micobacterias, la identificación de una secuencia especie-específica no es una tarea fácil.

Nuestro grupo previamente reportó el uso de la PCR para el diagnóstico de la tuberculosis humana basado en una secuencia especie-específica de *M. tuberculosis*. En el presente trabajo se describe el uso de la técnica *Ramdon amplified polymorphic DNA (RAPD)*, para la identificación de un fragmento genómico especie-específico de *M. bovis* y el desarrollo de un ensayo de PCR en un solo paso, que podría ser una herramienta poderosa en estudios epidemiológicos que conducirían a un eficiente control de la tuberculosis bovina.

La técnica de *RAPD* fue empleada en la identificación de un fragmento especie-específico de *Mycobacterium bovis*. Un fragmento de 500 pb fue amplificado dentro del genoma de 15 diferentes cepas de *M. bovis* incluyendo *M. bovis BCG* cepa *Pasteur* y ausente en 26 diferentes cepas de micobacterias y 20 aislados clínicos diferentes de *M. tuberculosis*. Dicho fragmento fue usado como sonda de análisis tipo *Southern blot*, mostrando diferentes señales radioactivas comunes tanto a *M. tuberculosis* como *M. bovis*. Sin embargo, un fragmento de aproximadamente 2.900 pb fue detectado específicamente en el genoma de *M. bovis* el cual se encontraba ausente tanto en *M. tuberculosis* como en *M. avium*. Basados en la secuencia parcial de nucleótidos del fragmento de 500 pb, dos oligonucleótidos sintéticos fueron diseñados en el desarrollo de un método basado en la PCR, utilizando como templado muestras de ADN genómico puro de diferentes micobacterias, solo *M. bovis* y *M. bovis BCG* presentaron señales positivas de amplificación. Dicha técnica es capaz de detectar hasta 10 fg de ADN puro de *M. bovis*, lo cual corresponde aproximadamente a encontrar 3 bacilos en la muestra. Este ensayo es también útil en la identificación de bacilos no cultivados provenientes de muestras clínicas como leche.

Identificación del fragmento especie-específico. Con el propósito de identificar un fragmento genómico específico de *M. bovis*, ensayos de *RAPD* fueron realizados utilizando como templado

ADN tanto de *M. bovis* como de *M. tuberculosis* [especie más estrechamente relacionada]. Los iniciadores utilizados en el RAPD se usaron solos o en combinación. Aunque muchos productos de amplificación fueron visualizados en geles de agarosa, la mayoría fueron comunes a ambas especies micobacterianas. Utilizando uno de los iniciadores (JB2), una banda de amplificación única de aproximadamente 500 pb se obtuvo, la cual estaba presente en tres diferentes aislados de *M. bovis* pero ausente en la cepa de *M. tuberculosis* H37Rv. Para determinar si el fragmento era específico de *M. bovis*, ADN aislado de 22 diferentes cepas micobacterianas y 3 diferentes aislados de *M. bovis* fueron utilizados en el ensayo de RAPD con el iniciador JB2. De este experimento, muchas bandas de amplificación se obtuvieron de los diversos genomas de las micobacterias haciendo difícil un claro reconocimiento de la presencia o ausencia del fragmento de 500 pb previamente identificado.

Por lo tanto, estos productos fueron transferidos a membranas de Nylon e hibridadas con el fragmento radiomarcado de 500 pb de *M. bovis*. Una señal positiva de hibridación fue observada solamente en los genomas de *M. bovis* y no en las restantes micobacterias. El fragmento radiomarcado fue utilizado como sonda en un Southern blot de ADN genómicos de *M. bovis*, *M. tuberculosis* y *M. avium* cortados con la enzima de restricción Eco RI.

La autoradiografía reveló regiones homólogas entre *M. bovis* y *M. tuberculosis*. Sin embargo, el fragmento de 500 pb identificó además una región polimórfica de aproximadamente 2.900 pb en el genoma de *M. bovis* el cual no tenía homólogo en los genomas de *M. tuberculosis* y *M. avium*.

PCR Específica de *M. Bovis*. El fragmento específico de *M. bovis* fue clonado y los extremos del fragmento fueron secuenciados. Basados en esta secuencia parcial se diseñaron, sintetizaron y purificaron los iniciadores llamados JB21 y JB22.

Utilizando estos iniciadores, la técnica de PCR fue optimizada usando como templado ADN de *M. bovis* y *M. tuberculosis* H37Rv, Un total de 30 ciclos de amplificación fueron aplicados observándose una banda de amplificación de 495 pb exclusivamente en el genoma de *M. bovis*. No se observaron otros productos de amplificación en ninguno de los genomas analizados.

Especificidad y sensibilidad de la PCR. La especificidad de la reacción fue valorada utilizando ADN aislado de 14 especies micobacteriales de referencia. El producto de amplificación de 495 pb se encontró solo en el ADN de *M. bovis*. Para demostrar que este ensayo de PCR podría ser útil en distinguir *M. tuberculosis* de *M. bovis*, 20 aislados clínicos de *M. tuberculosis* y 11 de *M. bovis* fueron amplificados con los iniciadores JB 21 y JB22. Solo se obtuvo señal positiva de amplificación exclusivamente en *M. bovis* confirmando los resultados obtenidos con las cepas de referencia.

Para demostrar que el ensayo de PCR puede ser realizado directamente de muestras clínicas, 1 ml de leche cruda fue contaminada con *M. bovis* o con bacterias comúnmente presentes en leche. De nuevo, el producto de amplificación sólo se presentó en las muestras contaminadas con *M. bovis*, demostrando no sólo que el ensayo es específico para detectar la micobacteria sino también que los componentes de la leche no contienen inhibidores de la reacción.

En cuanto a la sensibilidad de la técnica, ésta se determinó utilizando cantidades decrecientes de ADN. Hasta 10 fg de ADN de *M. bovis* fueron detectado en geles de agarosa claramente.

El hecho de que exista una alta homología entre las varias especies micobacterianas a nivel del ADN y en particular aquellas que pertenecen al complejo tuberculoso (las cuales incluyen *M. tuberculosis*, *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* y *M. Microti*), permitio desarrollar un nuevo

método especie-específico, capaz de detectar exclusivamente a *M. bovis*. En este estudio, una combinación de dos técnicas comúnmente usadas en biología molecular fueron aplicadas para la identificación de un fragmento genómico especie-específico del bacilo bovino: con la técnica de RAPD se obtuvo un fragmento único de *M. bovis*, el cual fue luego usado en el diseño de iniciadores específicos en la reacción de PCR. La técnica de RAPD ha sido previamente utilizada para la tipificación de cepas de varios microorganismos, incluyendo *M. tuberculosis*. El acercamiento descrito aquí, nos permitió la diferenciación de *M. bovis* de otras especies micobacteriales y más importantes aún, de las cepas pertenecientes al complejo tuberculoso, las cuales comparten más de un 90% de homología a nivel genómico.

Los estudios tipo Southern blot usando la sonda de amplificación de 500 pb. detectaron 4 fragmentos comunes tanto a *M. bovis* como a *M. tuberculosis*, indicando posiblemente homologías parciales, lo que confirma aún más la estrecha relación entre estas dos especies. Una señal fuerte de hibridización de 2.900 pb se observó sólo en el genoma de *M. bovis*, sugiriendo la presencia de una región polimórfica que podría ser utilizada en análisis de patrones de restricción. Ya sea que este fragmento sea parte de secuencias repetidas previamente reportadas o parte de una región intergénica entre estas secuencias repetidas es algo que se desconoce, pero que se encuentra en investigación por nuestro grupo.

El ensayo de PCR utilizando los iniciadores JB21 y JB22 claramente amplifica un fragmento exclusivo en el genoma de *M. bovis*. La detección de este microorganismo por esta técnica presenta una ventaja enorme sobre técnicas previamente reportadas las cuales involucran un paso inicial de amplificación y subsecuentemente el uso de sondas diferenciales o análisis mediante enzimas de restricción. Debido al fenómeno de agregación característico de las micobacterias, la cuantificación, del número de micobacterias en un ensayo o en leche contaminada no se pudo realizar. Sin embargo, fuimos capaces de detectar hasta 10 fg de ADN lo cual corresponde aproximadamente a 3 bacilos de acuerdo a reportes previos.

Este nuevo método diagnóstico específico basado en la amplificación de un fragmento genómico de *M. bovis* mediante la PCR, permitirá la identificación del bacilo directamente de muestras biológicas tales como leche, haciéndola una buena prueba para el diagnóstico rápido, sensible y específico de *M. bovis*. La detección temprana de *M. bovis* por PCR puede ser útil ya sea como una herramienta epidemiológica en ensayos de campo en el ganado o en programas de seguimiento de casos clínicos humanos para poder determinar la real magnitud de la tuberculosis bovina.

V. BIOTECNOLOGIA SALUD

DISEÑO DE SONDAS DE ADN PARA EL DIAGNOSTICO DE LA FENILCETONURIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: LUIS ALEJANDRO BARRERA (1)(*)

COINVESTIGADOR: EDGAR VALBUENA (1); MARIA TERESA RUGELES (2); FELIPE GARCIA (2).

(1) Universidad de los Andes. Centro de Investigaciones en Bioquímica.
Carrera 1A No. 18A-70. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 29232.
Teléfono: [57-1] 282 4066 Ext. 2780 - 2781. Fax: [57-1] 286 6289.

(2) Universidad del Valle. Facultad de Salud. Departamento de Microbiología.
San Fernando. Cali. Teléfono: [57-2] 558 1946 - 558 1931.

(*) Hasta el año de 1994.

OBJETIVOS

- Establecer las técnicas de Biología molecular que permitan estudiar en primera instancia el estado de la fenilcetonuria y luego aquellos errores innatos del metabolismo, que por su elevada frecuencia en la población colombiana, o por tratarse de mutaciones no identificadas en otras poblaciones, presenten alguna ventaja comparativa en nuestro país.
- Establecer métodos para la identificación de portadores de fenilcetonuria y para la detección de nuevas mutaciones, partiendo de familias en las cuales se haya identificado la presencia de la enfermedad.
- Extender los estudios anteriores a poblaciones de alto riesgo, fundamentalmente personas recluidas en instituciones de retardo mental, que presenten rasgos clínicos de estar afectados por la fenilcetonuria.
- Avanzar en el estudio de las enfermedades metabólicas en nuestro país, correlacionando los datos que hasta ahora existen sobre actividades enzimáticas con los posibles errores del ADN.
- Establecer las metodologías que permitan en un futuro el diagnóstico intrauterino temprano, de éste y otros errores innatos del metabolismo.

RESUMEN

La fenilcetonuria es un error innato del metabolismo de la fenilalanina, autosómico recesivo y producido por una deficiencia de la enzima fenilalanina hidrolasa (PAH). Sus manifestaciones principales son hiperfenilalaninemia, desórdenes neurológicos, retardo mental y problemas dermatológicos, cuando no se diagnostica y se trata oportunamente. Teniendo en cuenta el polimorfismo del gen PAH (más de 100 mutaciones diferentes) y su correlación con el origen geográfico y étnico de algunas poblaciones y la posible relación entre el tipo de mutación y la severidad de la enfermedad, su estudio en la población colombiana es de gran interés desde el punto de vista clínico y antropológico.

En este proyecto se estudiaron cerca de 3500 pacientes con retardo mental encontrándose 4 familias fenilcetonúricas con cuadro clínico y valores de fenilalanina diferentes a los presentados en la patología típica. Mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), se amplificaron el exon 3 y los intrones 10 y 12 del gen PAH extraído a partir de leucocitos de 7 pacientes, 5

heterocigotos y 120 controles, obteniéndose segmentos de amplificación de 302 bp (exon 3), 350 bp (intron 10) y 375 bp (intron 12). Estos segmentos se hibridaron con sondas ASO de la siguiente manera: exon 3 (haplotipo 4) con la sonda ASO para la mutación R111X predominante en la población oriental; intron 10 (haplotipo 6) con sonda ASO para la mutación IVS 10 predominante en la población mediterránea y para el intron 12 (haplotipo 3) con sonda ASO para la mutación IVS12 predominante en el norte de Europa dando resultados negativos para la presencia de estas mutaciones en la población estudiada. Esto indica que la mutación presente en los pacientes colombianos es diferente a la encontrada más frecuentemente en pacientes fenilcetonúricos en Argentina, Chile, México y España

En los análisis de RFLPs de ADN genómico de pacientes hiperfilalaninémicos y de sus familiares empleando las endonucleasas de restricción: EcoRI, EcoRV, HindIII, MspI y PvuII no se han obtenido señales de hibridación con el cADN de PAH.

El proyecto permitió el establecimiento del laboratorio de biología molecular en el Centro de Investigaciones en Bioquímica de la Universidad de los Andes, así como el montaje de las siguientes técnicas: extracción de ADN a partir de muestras de sangre y de cultivo de tejidos, electroforesis de ADN en gel de agarosa y de poliacrilamida, digestión de ADN con endonucleasas de restricción, Southern Blot, Dot Blot, marcaje radioactivo y no radioactivo de sondas de ADN, transformación y clonación, extracción y purificación de plásmidos, PCR, RFLP, SSCP, tinción de geles con plata e hibridación en los cuales se iniciaron los estudios de los genes de las enzimas responsables de las mucopolisacaridosis tipo I y IV y la enfermedad de Tay Sachs.

RESUMEN

ESTANDARIZACION Y APLICACION DE LA TECNICA DE HIBRIDACION *IN SITU* EN EL DIAGNOSTICO DE ENFERMEDADES GENETICAS

INVESTIGADORA PRINCIPAL: GLORIA OSORIO SANABRIA (1).
COINVESTIGADOR: MARIA DEL PILAR HE RMANDEZ (1).

(1) Pontificia Universidad Javeriana, Facultad de Medicina. Instituto de Genética Humana.
Carrera. 7a. No. 40-62. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 56710.
Teléfono: (57-1) 320 8320 Ext: 2789. Fax: (57-1) 320 8320 Ext: 2793.

OBJETIVOS

- Estandarizar la técnica de hibridación *in situ*.
- Identificar y diagnosticar anomalías cromosómicas (minicromosomas y anomalías infracromosómicas).
- Localizar regiones con fragilidad cromosómica y alteraciones estructurales de oncogenes y puntos de ruptura implicados en los rearrreglos cromosómicos de algunas neoplasias.

RESUMEN

La técnica de hibridación *in situ* (HIS) combina las técnicas citogenéticas y las técnicas de biología molecular, para permitir la ubicación física de regiones cromosomales que presentan secuencias de ADN altamente repetitivo, secuencias hipervariables, genes implicados en patologías y pseudogenes. De la misma manera permite estudiar con más detalle aspectos relacionados con el mapeo genético, con los diferentes mecanismos de evolución, el diagnóstico en enfermedades hereditarias y el análisis de procesos cancerosos.

El proyecto contempla la realización de cultivos de linfocitos, de tejidos y/o el establecimiento de líneas linfoblastoides de individuos o familias con anomalías cromosómicas inframicroscópicas, para la obtención de cromosomas. Estas preparaciones cromosómicas se emplearán para la hibridación *in situ* con sondas previamente marcadas enzimática o radioactivamente, dependiendo del tipo de sonda.

El desarrollo del proyecto logró la estandarización de la técnica Hibridación *in situ* en individuos sanos, con sondas centroméricas y de cromosoma total, marcadas con dioxigenina. Posteriormente se analizaron pacientes con anomalías cromosómicas (trisomía parcial y universal, translocaciones, isocromosomas e isodicéntricos, fenotipos masculinos 46 XX y minicromosomas) para confirmar y/o determinar estos hallazgos encontrados con técnicas convencionales de citogenética, utilizando HIS.

ESTUDIOS DE CARACTERIZACION BIOQUIMICA DE HORMONAS HIPOFISIARIAS HUMANAS

INVESTIGADORA PRINCIPAL: MYRIAM SANCHEZ DE GOMEZ (1).

COINVESTIGADORES: STELLA CARRASCO DE RODRIGUEZ (1);

CECILIA ANZOLA (1); NORMA DE SAMBUCCETTI (1); ISMENA MOCKUS (1);

MARIA INES SILVA (1); LAURA ORTIZ (1); AUGUSTO RIVERA (1).

(1) Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias, Departamento de Química. Laboratorio de Hormonas. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá, D. C., Apartado Aéreo 14490.
Teléfono: (57-1) 368 1602 Fax: (57-1) 226 4139.

OBJETIVOS

- Obtener preparaciones puras de algunas hormonas peptídicas a partir de hipófisis humanas con el fin de utilizarlas como estándares y para la producción de anticuerpos específicos para iniciar la producción de kits para diagnóstico en Colombia.
- Estudiar las formas plasmáticas de algunas hormonas peptídicas en condiciones normales y patológicas mediante su caracterización bioquímica e inmunológica.
- Estudiar la interacción de dichas hormonas con receptores específicos presentes en células blanco, como base para una mejor comprensión de los mecanismos de señalización molecular y del efecto de condiciones patológicas o metabólicas alteradas a nivel de la síntesis de las proteínas y de la expresión de sus genes.

RESUMEN

El avance de la endocrinología moderna se ha debido en buena parte al mejor conocimiento bioquímico de las diferentes hormonas, de sus estructuras químicas, sus mecanismos de biosíntesis, secreción y destino y de sus mecanismos de acción.

Con la realización del presente proyecto se pretende contribuir al mejor entendimiento de las formas moleculares de las hormonas sintetizadas por la hipófisis humana y de sus patrones de secreción, en estados de salud y de enfermedad en la población colombiana. La interacción con receptores específicos en las células blanco, permitirá establecer posibles modelos que expliquen las bases moleculares de sus mecanismos de acción y de las rutas empleadas en la transducción de las señales, aspecto del cual se conoce muy poco.

Se desarrolló una metodología para la extracción a partir de hipófisis humanas de las siguientes cinco hormonas: prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona foliculo estimulante (FSH), hormona luteinizante (LH) y hormona estimuladora de la tiroides (TSH), con base en sus diferencias de solubilidad y propiedades iónicas.

Se obtuvo un porcentaje de recuperación y preservación de la integridad de las hormonas individualmente, de acuerdo con los estándares internacionales de referencia distribuidos por el Instituto Nacional de Salud (NIH) de los Estados Unidos. La contaminación residual en las preparaciones purificadas estuvo por debajo de los límites internacionalmente aceptados para este tipo de estándares hormonales.

Las potencias inmunológicas de las preparaciones finales fue para cada una de las hormonas, como sigue: para PRL de 10 UI/mg de proteína, para GH de 2,7 UI/mg de proteína, para FSH de 1,365 UI/mg de proteína, para LH de 28,169 UI/mg de proteína y finalmente para TSH de 3,187 mUI/mg de proteína. Estos valores permitieron corroborar la alta pureza lograda en cada caso. Las hormonas purificadas se utilizaron como antígenos para la producción de anticuerpos policlonales utilizables en el radioinmunoanálisis (RIA) de cada una de estas proteínas y su validación se realizó frente a anticuerpos de referencia suministrados por el NIH de los Estados Unidos.

En lo referente al estudio de las formas circulantes de estas hormonas en muestras provenientes de individuos con alteraciones metabólicas y/o patologías de la hipófisis, se realizaron estudios sobre PRL y GH. El análisis de sueros de hiperprolactinemia mostró la presencia de formas glicosiladas de alto peso molecular no detectables en suero normal y en acromegalia se encontró una producción acelerada de las tres especies de GH - 22K, 45K y 80K - pero no se detectaron formas adicionales a las encontradas en suero humano normal.

Finalmente, los estudios de interacción con receptores, empleando la rata como animal de experimentación mostraron amplia distribución somática del receptor para GH. El resultado más relevante fue la identificación de sitios de unión específicos para GH en el tejido linfoide, dando soporte al hallazgo reciente de la comunicación bidireccional entre los sistemas endocrino e inmune. En particular, los resultados pusieron en evidencia que los cambios nutricionales tienen un efecto sobre el nivel de expresión del receptor para GH en linfocitos de timo, bazo y de sangre periférica. Lo anterior podría tener implicaciones prácticas directas en el ser humano, ya que mediante el análisis del receptor para GH en linfocitos de sangre periférica, cuyo acceso es relativamente fácil, sería posible estudiar problemas de retardo de crecimiento asociados a alteraciones a la respuesta a la GH. Del mismo modo, este modelo podría ser utilizado también para profundizar en la comprensión de las interrelaciones desnutrición - infección.

MAPAS DE EXPRESION, ENSAYOS DE TRANSCRIPCION Y GENOTECAS DE SUSTRACCION EN *Saccharomyces cerevisiae* EN CONDICIONES DE STRESS. UNA PROPUESTA PARA EL DESARROLLO DE UNA METODOLOGIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: IVAN YUNIS (1).

(1) Instituto Nacional de Salud. Laboratorio de Inmunogenética.
Avenida. El Dorado. Carrera 50. CAN. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 80080.
Teléfono: (57-1) 222 0577.

OBJETIVOS

- Establecer las condiciones exactas para resolver por medio de electroforesis de campo pulsado fragmentos de cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* (cepa AB972) y generar un conjunto de membranas de ADN representativo (Southern Blots) de cada cromosoma.
- Realizar estudios de transcripción en *Saccharomyces cerevisiae* cultivado en YPD a 33 °C y 39°C con el fin de generar ARN marcado en cada una de las condiciones de cultivo.
- Localizar locis genéticos del *Saccharomyces cerevisiae* que presenten expresión en ambas condiciones de cultivo, hibridizando membranas de los geles de ADN con el ARN proveniente de los ensayos de transcripción.
- Comparar los patrones de bandas resultantes (tamaño, localización de las bandas e intensidad de la señal de hibridación) con el fin de determinar cuales bandas presentan cambios.
- Construir genotecas de sustracción de cADN a partir de mRNA de *Saccharomyces cerevisiae* cultivado en YPD a 33 °C y 39 °C, y sustraído en ambas direcciones (con mRNA en exceso) con el fin de aislar mensajes característicos - y si los hubiere- específicos de células cultivadas a ambas temperaturas.
- Hibridizar los Southern Blots de cromosomas de *Saccharomyces cerevisiae* con fracciones marcadas de las librerías de sustracción.

RESUMEN

Con las metodologías empleadas en la actualidad para secuenciar un genoma no está completamente claro de que manera se pueden interpretar los datos de secuencia y estructura física en términos de procesos celulares. Se puede deducir la secuencia de un gen, pero no puede establecerse con claridad en que proceso participa. Por tal razón, es necesario explorar tecnologías que permitan estudiar los cambios genéticos que se suceden *in vivo* en el momento en que se suceden y que proporcionen un mapa completo y preciso de los cambios celulares producidos durante un evento celular.

Para que el desarrollo de estas tecnologías no dependa de la existencia de una sonda o un anticuerpo debe cumplir dos características: la primera de ellas permitir el mapeo reproducible de

cada cromosoma del organismo a un nivel mayor que el actual y segundo diferenciar los genes que se expresan como resultado de un evento inductor.

En este proyecto se propone mediante el empleo de electroforesis en campo pulsado y ensayos de transcripción (Nuclear Transcripción Run-off Assays) y sondas provenientes de genotecas de sustracción enriquecidas en mensajes evento específico localizar y evaluar el nivel de expresión de los genes de *Saccharomyces cerevisiae* cepa AB 972.

Hasta la fecha se han llevado a cabo 29 experimentos de electroforesis de campo pulsado para dos cepas de *S. cerevisiae*, UN y UA. Todos los experimentos se hicieron usando una máquina de electroforesis comercial (Hula Gel, de Hoefler). Esta máquina, desarrollada por De Southern, permite reorientar físicamente el gel con respecto al campo electroforético, interrumpiendo la corriente durante la reorientación, y por consiguiente obviando la necesidad de corregir el paso de electrones mediante las modificaciones propuestas por Chu en el método de CCHEF (Contour Clamped Homogeneous Electroforesis Field).

PRODUCCION COMERCIAL DE REACTIVOS PARA HEMOCLASIFICACION BASADOS EN LA GENERACION Y USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES ANTI-GRUPOS SANGUINEOS A Y B

INVESTIGADORES PRINCIPALES: CAMILA MONROY (1); OSCAR OROZCO (1).

(1) LABORATORIOS HISTO-LAB. Calle 26 A No. 37-28. Santafé de Bogotá, D. C.
Teléfonos: (57-1) 368 4994 - 368 4987. Fax: (57-1) 269 4909.

OBJETIVOS

- Desarrollar un prototipo para la estandarización de los métodos de producción y escalamiento industrial de anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de importancia a nivel diagnóstico en medicina humana.
- Desarrollar la tecnología de producción y escalamiento industrial de anticuerpos monoclonales que pueda ser aplicable al estudio y detección de antígenos de importancia para el diagnóstico en medicina humana.
- Obtener anticuerpos monoclonales que permitan hacer una hemoclasificación utilizando técnicas de aglutinación al menos para los grupos mayores A, B, O.
- Desarrollar un prototipo de prueba de laboratorio que utilice estos anticuerpos como base para la tipificación sanguínea A, B, O.
- Desarrollar un prototipo de estuche comercial que permita ofrecer al mercado este producto y definir las condiciones de pre-escalamiento en término de unidades que a largo plazo puedan satisfacer y/o conquistar el mercado nacional.

RESUMEN

Las pruebas de hemoclasificación sanguínea tienen un amplio uso a nivel de laboratorio clínico y de banco de sangre. Para la detección de antígenos del sistema ABO se utiliza una prueba de aglutinación sencilla, rápida y sensible en la cual se ponen en contacto los glóbulos rojos que se estudiarán con antígenos específicos para la proteína A o B de los glóbulos rojos.

La tendencia actual a nivel mundial es la fabricación de antisueros tipificadores del sistema ABO de origen monoclonal. Mediante esta tecnología se obtiene un anticuerpo específico para estas sustancias con las características de especificidad y sensibilidad que se requieren para hacer la hemoclasificación sanguínea en forma confiable y reproducible evitándose además el riesgo biológico de utilizar antisueros de origen humano, tal como se venía haciendo tradicionalmente.

El propósito fundamental de este proyecto es el desarrollo de un prototipo para la estandarización de los métodos de producción y escalamiento industrial de anticuerpos monoclonales contra diferentes antígenos de importancia a nivel diagnóstico en medicina humana, así como el ofrecimiento al mercado de un estuche comercial del producto y definición de las condiciones de pre-escalamiento en término de unidades que a largo plazo puedan satisfacer y/o conquistar el

mercado nacional. Para tal fin se emplearán técnicas de cultivo y fusión nuclear, selección de hibridomas productores de anticuerpos, escalamiento a nivel comercial (cultivo *in vivo* o *in vitro*, purificación del anticuerpo e identificación de clases y subclases de inmunoglobulina), formulación del reactivo prototipo y elaboración de un lote experimental y ensayos del producto.

En la actualidad el proyecto cuenta con varios hibridomas productores de anticuerpos monoclonales específicos para la sustancia A y B de los glóbulos rojos. Estos anticuerpos han sido caracterizados en cuanto a isotipos, especificidad y los resultados obtenidos hasta ahora permiten concluir que estos anticuerpos podrían aplicarse en la formulación de un estuche comercial para identificación de grupos sanguíneos.

Adicionalmente se trabaja en la producción de estos anticuerpos en sistemas *in vitro* e *in vivo* en ratones y en la formulación de un producto final con características de especificidad, potencia y estabilidad requeridas

PRODUCCION DEL ALERGENO MAYOR DEL ACARO *Blomia tropicalis* MEDIANTE TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE

INVESTIGADOR PRINCIPAL: LUIS CARABALLO (1).
COINVESTIGADOR: LEONARDO PUERTA LLERENA (1).

(1) Universidad de Cartagena. Instituto de Investigaciones Inmunológicas. Cartagena.
Apartado Aéreo 445. Telefax: (57-5) 669 8491.

OBJETIVOS

- Clonar el gen del alergen mayor del ácaro *Blomia tropicalis*
- Secuenciar el gen clonado y deducir la estructura primaria de la proteína (alergeno), codificada por éste.
- Purificar el alergen recombinante.

RESUMEN

Los ácaros *Blomia tropicalis* y *Dermatophagoides pteronyssinus* (Dp), son una fuente importante de componentes alérgicos capaces de sensibilizar a un alto porcentaje de la población. En las poblaciones alérgicas se han investigado marcadores genéticos como los alotipos de inmunoglobulinas del sistema mayor de histocompatibilidad (HLA), obteniendo resultados interesantes respecto al posible control genético de los fenómenos alérgicos (especialmente el asociado al asma alérgica). Se requiere de estudios detallados a nivel de inmunquímica y de biología molecular que permitan determinar el control genético de la respuesta IgE a nivel de epítopes alérgicos y experimentos de presentación antigénica *in vitro* que confirmen o faciliten el conocimiento del papel decisivo del HLA en los procedimientos alérgicos.

Se construyó una biblioteca de cADN del ácaro *Blomia tropicalis* en fago lambda gIII y se expresó en la cepa Y1090 de *E. coli*. Varios de los alérgenos recombinantes se subclonaron para fines de expresión y análisis de composición y secuencia de ADN y aminoácidos en diferentes plásmidos como pBlueScript, pCRII, pGMEX y pGEX, los cuales se conservan en diferentes cepas de *E. coli* transformadas.

De esa biblioteca se han aislado 5 clones recombinantes (BtM, BtIIa, Bt2, Bt6b y A2a) que codifican para sendos alérgenos nativos. Se espera que la biblioteca contenga otros alérgenos recombinantes, los cuales podrán detectarse con posteriores sondas de, ya sea con antisueros (IgE de pacientes alérgicos) o con sondas diseñadas por homología con las secuencias ya obtenidas.

Además, se ha purificado y caracterizado dos recombinantes BtM y BtIIa, los cuales corresponden a los alérgenos más comprometidos en el desencadenamiento del asma alérgica. Los restantes han sido parcialmente estudiados en términos de secuencia de ADN y porcentaje de unión a IgE.

Segunda sección

PROYECTOS EN EJECUCION

PRODUCCION DEL ALERGENO MAYOR DEL ACARO Blattella tropica MEDIANTE TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE

RODRIGO GONZALEZ, CAROLINA GONZALEZ, JUAN
CARLOS GONZALEZ Y ANTONIO GONZALEZ

INSTITUTO VENEZOLANO DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CALLE 2147, LA VILLA, CAROLINA, GUAYAS, VENEZUELA

RESUMEN

Se describen los procedimientos para la producción de un alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica* mediante tecnología de ADN recombinante.

Se diseñó un vector de expresión que contiene un promotor fuerte, un sitio de inicio de la traducción, un sitio de corte de restricción y un sitio de salida.

Se clonó el gen que codifica el alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica* en el vector de expresión.

Se transformó *Escherichia coli* con el vector recombinante y se purificó el alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica*.

Se demostró que el alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica* producido por este método es idéntico al alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica* natural.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Palabras clave: alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica*, tecnología de ADN recombinante.

Introducción: Los alérgenos de los acaros son una de las principales causas de alergia respiratoria en el mundo.

El alérgeno mayor del acaro *Blattella tropica* es el principal alérgeno de los acaros y es responsable de la mayoría de las reacciones alérgicas.

Este alérgeno es una proteína de 24 kDa que pertenece a la familia de las lipocalinas.

La producción de este alérgeno mediante tecnología de ADN recombinante es una alternativa viable para la producción de grandes cantidades de alérgeno puro.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

Este método puede ser utilizado para la producción de otros alérgenos de acaros.

I. BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

I. BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

CARACTERIZACION GENETICA DEL PATOSISTEMA *Phytophthora infestans/Solanum tuberosum* Y SU RELACION CON POLIMORFISMOS MOLECULARES

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SONIA JARAMILLO (1).

COINVESTIGADORES: MARIA HELENA MARQUEZ (1); JUAN B. LOPEZ (1).

(1) Universidad Nacional de Colombia. Departamento de Agronomía y Biología.

Autopista Norte Calle 65 con Carrera 64. Medellín. Apartado Aéreo 568.

Teléfonos: (57-4) 230 9637, 260 7333 Ext: 123-138. Fax: (57-4) 230 0420.

OBJETIVOS

- Identificar cepas de *Phytophthora infestans* resistentes al fungicida sistémico Metalaxil.
- Caracterizar por Zimodemas y RFLP's aislamientos de *P. infestans* susceptibles y resistentes a fungicidas.
- Establecer cultivos *in vitro* de clones de papa por vía embriogénica y/o organogénica con resistencia de campo a *P. infestans*.
- Obtener cultivos monospóricos a partir de zoosporas de *P. infestans* colectadas en diferentes regiones de Colombia principalmente en el Oriente Antioqueño.

RESUMEN

En el país se siembran aproximadamente 170.000 hectáreas de papa. El consumo per capita es de 67 Kilogramos y su producción genera un gran número de empleos directos e indirectos. Dentro de los primeros se generan 150 jornales por hectárea aproximadamente, que corresponden al sostenimiento de 90.000 familias y dentro de los segundos, un gran número de empleos en el sector del transporte, industrialización y comercialización.

De las 30 variedades mejoradas que el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y el Convenio Universidad Nacional de Colombia - ICA, han entregado a nivel comercial, hasta el momento, solo se cultivan 6 ó 7, entre las cuales se encuentran: Parda Pastusa, Diacol Monserrate, Diacol Capiro, ICA-Purace, UNICA y Morita. La variedad Diacol Capiro, se utiliza para consumo como papa fresca y para papa procesada (Industria), lo que ha incrementado significativamente su demanda en el país y en algunas empresas procesadoras de papa en Venezuela y Ecuador.

La siembra sucesiva de esta variedad ha generado erosión genética y la ha vuelto más susceptible a las infecciones ocasionadas por los patógenos, esto eleva los costos de control del Hongo *Phytophthora infestans*, puesto que en muchas zonas se realizan cerca de 14-16 aplicaciones de fungicidas en la producción del tubérculo.

Este proyecto propone coleccionar, multiplicar, caracterizar y conservar algunas Cepas del hongo *P. infestans*, mediante técnicas de electroforesis de isoenzimas (Zimodemas) y técnicas moleculares ampliamente utilizadas como RFLP's, PCR y RADP's.

Hasta 1998 se han obtenido los siguientes resultados:

- Estandarización de métodos para la caracterización fisiológica del hongo *P. infestans*, lo que ha permitido detectar una gran complejidad en cuanto al número de factores de virulencia del hongo, una gran homogeneidad entre los diferentes aislamientos de las zonas de monocultivo de papa, pero una gran diversidad en los aislamientos procedentes de minifundios de papa mezclados con otras Solanaceas (tomate, pepino de agua, pimentón, uchuva) y especies silvestres.
- Para los estudios moleculares en donde se requieren muestras homogéneas, se han establecido los cultivos monozoospóricos por diferentes métodos.
- Se han extraído las proteínas para la caracterización isoenzimática de Glucosa fosfato isomerasa, Peptidasa y Esterasas **a** y **b**, encontrándose hasta ahora, una gran homogeneidad en los aislamientos evaluados.
- Se estandarizó la técnica de extracción del ADN, lo que ha permitido hacer las siguientes evaluaciones:
 - Electroforesis de campo pulsado, con la cual se observó la aparición de cuatro bandas, lo que implica que el genoma de *P. infestans* tiene como mínimo cuatro cromosomas diferentes.
 - Amplificación (PCR) para RADP, lo que ha permitido observar preliminarmente, polimorfismos entre aislamientos procedentes de diferentes huéspedes.
 - Se ha iniciado la estandarización de la técnica RFLP con la sonda RG57.
 - Se han detectado varios aislamientos del hongo resistentes al Metalaxyl, utilizando la técnica *in vitro*.
Estos aislamientos serán evaluados para determinar si existe relación con polimorfismos moleculares.
- No se ha encontrado reproducción sexual en las poblaciones evaluadas del hongo, solamente se ha observado el tipo de apareamiento A1.
- Se ha constituido un banco de aislamientos de *P. infestans*, provenientes de diferentes zonas paperas de Colombia, especialmente del Departamento de Antioquia. Hasta el presente la colección cuenta con 85 accesiones.
- Con inoculaciones en laboratorio, se ha detectado la compatibilidad cruzada entre aislamientos procedentes de diferentes solanaceas huéspedes, lo que implica mayor riesgo a nivel de fuentes de inóculo en el campo.
- Se han estudiado algunos mecanismos bioquímicos de defensa de la papa hacia el hongo.

Las evaluaciones preliminares de síntesis de compuestos terpenicos inducidos por razas complejas de *P. infestans*, indican correlación entre los niveles de tales compuestos y la resistencia de las variedades evaluadas: Tuquerreña (muy susceptible), Diacol Capiro (susceptible) y UNICA (Tolerante).

CARACTERIZACION ISOENZIMATICA Y MOLECULAR DE CLONES DE PLATANO DE LA COLECCION COLOMBIANA DE *Musaceas*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: INES SÁNCHEZ (1); DUVERNEY GAVIRIA (1);
GERARDO DALLEGO (1); JOE TOHME (1); WILLIAM ROCA (1);
LUZ MARINA REYES (2);
MARTHA CECILIA GIRALDO (3); DIEGO FAJARDO (3); MARIO LOBO (3);
JORGE ALBERTO VALENCIA (4).

(1) Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. Cali. Teléfono: (57-2) 445 0000.

(2) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Santafé de Bogotá. D.C.
Teléfono: (57-1) 316 5000 Ext: 19085. Fax: (57-1) 316 5146/66

(2) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA .

Centro de Investigaciones de Tibaitata. Km 14 vía a Mosquera. Santafé de Bogotá, D.C.
Teléfono: (57-1) 344 3000. Fax: (57-1) 344 3054.

(3) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA. Llano Grande. Rionegro.
Antioquia.

Teléfono: (57-94) 537 1133. Fax: (57-94) 94 - 537 01 46.

(4) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA.
Hacienda el Agrado. Armenia. Teléfono: (57-67) 52 4111.

OBJETIVOS

- Caracterizar clones de plátano de la colección colombiana de musáceas (CCM) por medio de marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares.
- Evaluar la diversidad genética de la colección para identificar posibles duplicaciones y analizar los parámetros de las especies.
- Analizar la información generada de los estudios de caracterización para uso posterior de los fitomejoradores.

RESUMEN

La familia de las Musaceae está compuesta de dos géneros: *Musa* y *Ensete*. *Musa* contiene aproximadamente 30 especies, incluyendo *Musa acuminata* e híbridos de *M. acuminata* y *M. balbisiana*, contando entre ellas la mayoría de bananos y plátanos comestibles; generalmente son triploides, partenocárpicos y propagados clonalmente. Colombia tiene una gran variedad de plátanos comestibles de los cuales solo 5 variedades son cultivadas. La Colección Colombiana de Musaceae (CCM) tiene 130 entradas pero pocas de ellas han sido caracterizadas a nivel morfológico y agronómico. Los estudios genéticos basados en una caracterización bioquímica, agronómica y molecular permitirán un mejor entendimiento de la diversidad genética de la CCM. Se utilizaron 23 sistemas isoenzimáticos, 32 oligonucleótidos de RAPD y una combinación de oligonucleótidos sintéticos (cebadores) para AFLP.

Las isoenzimas DIA, EST, GDH, MDH, ME, PRX, PGI, PGDH, PGM, RUB, SKDH presentan bandas claras y polimorfismórficas. EST y DIA representan el 48% del polimorfismo total. De los 32 oligonucleótidos de RAPD, ocho mostraron buen polimorfismo. Los AFLP, con la combinación

E-AAG+M-CAT, son los más polimórficos. Se detectaron 166 bandas representando, un 25% de polimorfismo. Para el análisis de resultados se usó el coeficiente de Dice, con una matriz de similitud, a partir de la cual se construyó un dendograma con el método de UPGMA. Los RAPD alcanzan a diferenciar los plátanos (AAB y ABB) de los *acuminata* (AA y AAA); mientras que los AFLP separan claramente y muestran diferencias al interior de los grupos de plátanos, bananos y silvestres, mostrando mayor diversidad genética dentro del grupo de los bananos que en el de los plátanos. Sin embargo dentro del grupo de los bananos, los Cavendish y los Gros Michel, presentan altos índices de similitud.

Estos resultados resaltan la eficiencia de los AFLP en la identificación de las diferentes entradas de la CCM, agilizando el diseño de estrategias de mejoramiento genético. Las actividades futuras, incluirán análisis con una combinación adicional de oligonucleótidos de AFLP, E-AAG+M-CTT, la cual, en ensayos preliminares ha mostrado alto polimorfismo. Una caracterización con oligonucleótidos para microsatélites enviados por el CIRAD está prevista para la continuación de este trabajo.

RESUMEN

RESUMEN

CARACTERIZACION Y OBTENCION DE CEPAS MEJORADAS DE HONGOS ENTOMOPATOGENOS

INVESTIGADOR PRINCIPAL: PATRICIA EUGENIA VELEZ ARANGO (1).

(1) Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café, CENICAFE.

Chinchiná. Caldas.

Teléfono: (57-68) 506 550. Fax: (57-68) 504 723 - 506 630 - 507 561.

OBJETIVOS

- Realizar una caracterización morfológica, bioquímica y molecular de los hongos *Beauveria bassiana* y *Metarhizium anisopliae* con el propósito de obtener cepas mejoradas para ser utilizadas en un programa de manejo integrado de broca del café.
- Determinar la patogenicidad y viabilidad de los aislamientos multiespóricos de los hongos procedentes de diferentes ordenes de insectos previamente reactivados en broca.
- Caracterizar morfológica y bioquímicamente los aislamientos seleccionados.
- Seleccionar, de los aislamientos con las mejores características establecidas previamente en el estudio morfológico y bioquímico, aquellos que presenten resistencia térmica y resistencia a la luz ultravioleta para la posterior obtención de cultivos monoespóricos.
- Obtener recombinantes con características deseables en cruces de aislamientos monoespóricos mediante las técnicas de fusión de protoplastos.
- Realizar una caracterización molecular de los diferentes aislamientos mediante el uso de las técnicas de RAPD.

RESUMEN

La eficiencia de los agentes de control biológico depende del conocimiento previo de los aspectos relacionados con su biología, del ambiente en el cual se aplican y de los mecanismos de interacción de éstos con el hospedante. Lo anterior constituye la base fundamental para su desarrollo y utilización eficiente. En este estudio, se ha llevado a cabo la caracterización de aislamientos, evaluando en aislamientos multiespóricos del hongo *B. bassiana* (Bb) las variables cuantitativas, porcentaje de patogenicidad a la broca, previamente reactivados en este insecto (PPB), tiempo en el cual la dosis empleada causa la muerte del 50% de la población (TL_{50}), concentración de esporas (CE), tasa de crecimiento diario (TCD), tamaño de esporas (TE), porcentaje de germinación (PG), resistencia a la luz UV (RLUV) y a la temperatura (RT) y RAPDs y las variables cualitativas, producción enzimática (PE) y tiempo de inicio de la reacción enzimática (TRE). En aislamientos multiespóricos del hongo *M. anisopliae* (Ma), las variables evaluadas fueron PPB, PG, PE, TRE, RLUV y RLUV.

En un primer análisis, se procedió a la clasificación de los aislamientos utilizando la variable PPB, teniendo en cuenta que ésta es una de las variables que determina el uso eficiente de los entomopatógenos en la regulación de insectos plaga. Fueron establecidos cuatro grupos de aislamientos de acuerdo con PPB promedio, así: Grupo 1, aislamientos con PPB promedio <25%; Grupo 2, entre 25% y 50%; Grupo 3, entre 50% y 80% y Grupo 4, superiores al 80%. Para Bb,

se establecieron cuatro grupos, los aislamientos menos virulentos, Grupo 1, fueron: Bb9009, Bb9010, Bb9108, Bb9115, Bb9120 y Bb9307 (Colombia - *H. hampei*), tres de los cuales provienen de Antioquía; Bb9017 y Bb9020 (otros países). Los más virulentos, Grupo 4, fueron: Bb9002, Bb9012, Bb9021, Bb9102, Bb9116, Bb9202, Bb9203, Bb9207, Bb9208, Bb9212, Bb9213 (Coleoptera: Scolytidae); Bb9216, Bb9218, Bb9301 (Coleoptera: Curculionidae); Bb9007 (Coleoptera: Scarabaeidae); Bb9016, Bb9018, Bb9019, Bb9112, Bb9203, Bb9204, Bb9205, Bb9217, Bb9401 (Lepidoptera) y Bb9027 (Homoptera). Diecisiete aislamientos de este grupo son procedentes de Colombia, cuatro de Antioquía y cuatro de Risaralda. Así mismo, se establecieron dos grupos en Ma, la mayoría de los aislamientos presentaron PPB superiores al 80% (Grupo 4), de los cuales 9 son procedentes de Colombia, tres de Antioquía y corresponden al orden Coleoptera, seis de la familia Scarabaeidae, excepto el aislamiento Ma9220 (Grupo3).

En el análisis de varianza, para la evaluación de los grupos, se observó el efecto de éstos con las variables PPB, TL50, CE, TCD, PG y TRE para el hongo Bb y con las variables PPB y PG para el hongo Ma; la prueba de comparación de promedios de Tukey (5%), mostró que grupos de Bb y Ma son diferentes estadísticamente en la variable PPB. El análisis de amplificación del DNA de Bb no mostró una separación evidente de aislamientos según hospedero y localidad. La caracterización realizada permite seleccionar cepas entre algunos de los aislamientos correspondientes a cada grupo, teniendo en cuenta sus características y las del ambiente en el cual interactúan con el insecto. Así mismo, establecer su especificidad de hospedero y su potencial para el control de la broca del café y de otros insectos que afectan cultivos de importancia económica en el país.

RESUMEN

CLONAJE Y EXPRESION DEL GEN DE LA TOXINA DE 98 kDa DE *Bacillus thuringiensis* subespecie. medellin EN UNA CIANOBACTERIA DE LOS CRIADEROS DE LARVAS DE MOSQUITO DE COLOMBIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SERGIO ORDUZ PERALTA (1).
COINVESTIGADORES: RANDY MURPHY (2); EDWARD STEVENS (2).

(1) Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Carrera 72A No. 78B-141.
Medellin. Teléfono: (57-4) 441 0855. Fax: (57-4) 441 5514.
E-mail: sorduz@epm.net.co

(2) Department of Biology. University of Memphis, TN 38152 USA.

OBJETIVOS

- Clonar y expresar el gen de 98 kDa de *Bacillus thuringiensis* subesp. medellin en una especie de cianobacteria nativa.
- Realizar un inventario de cianobacterias de los criaderos de mosquitos de las principales zonas endémicas de malaria en Colombia.
- Realizar estudios de ingestión y digestión con las cianobacterias más comunes en larvas de *Aedes aegypti* y *Anopheles albimanus*.
- Clonar el gen de la proteína de 98 kDa de *Bacillus thuringiensis* subesp. medellin en una cianobacteria seleccionada.
- Analizar la expresión de la proteína en la cianobacteria recombinante.
- Determinar la toxicidad de la cianobacteria recombinante en larvas de *A. aegypti* y *A. albimanus*.

RESUMEN

Se realizó un inventario de cianobacterias provenientes de criaderos de larvas de mosquito, por observación microscópica de sedimentos de las muestras recolectadas. Se encontraron cianobacterias unicelulares pertenecientes a los géneros *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., *Mycrocystis* sp., *Gloeobacter* sp y filamentosas como *Phormidium* sp., perteneciente al Grupo LPP (*Lyngbia*, *Plectonema* y *Phormidium*), *Oscillatoria* sp., *Spirulina* sp., *Anabaena* sp. y *Nodularia* sp. Las más ampliamente distribuidas fueron *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp., Grupo LPP y *Oscillatoria* sp. encontradas en cinco zonas en Colombia de las ocho que fueron evaluadas.

Se tienen cultivos de cianobacterias clasificadas como *Synechocystis* sp., *Synechococcus* sp. y filamentosas del género *Oscillatoria* y grupo LPP. Las pertenecientes al género *Synechocystis* sp. fueron las más frecuentemente aisladas de la mayoría de los criaderos estudiados seguida por el Grupo LPP y *Oscillatoria* sp.

Se pudo observar, por ensayos preliminares sobre desarrollo de larvas de *Anopheles albimanus* de primer estadio, mediante la adición diaria de 3×10^8 células por mililitro, de un cultivo no puro

de *Synechocystis* sp. nativa, que las larvas de *A. albimanus* sí pueden utilizar esta cianobacteria como alimento, pues fueron capaces de alcanzar el segundo estadio de desarrollo larval.

Se realizaron bioensayos de desarrollo larval con las bacterias acuáticas gram negativas, *Asticacaulis excentricus*, *Caulobacter crescentus* y *Ancylobacter aquaticus* y se adicionaron diariamente a larvas de *A. albimanus* como única fuente de alimento y en concentraciones de $1,5 \times 10^7$, $1,5 \times 10^8$ y $1,5 \times 10^9$ células por mililitro. Se encontró, que las larvas de *A. albimanus* alcanzaron el tercer estadio de desarrollo, cuando se les adicionó *A. excentricus* y solo en la concentración mas alta de $1,5 \times 10^9$ células por mililitro.

Debido a que la literatura ha reportado problemas de expresión de genes de *B. thuringiensis* en cianobacteria y a los resultados de desarrollo larval, el propósito actual es introducir el gen Cry11Bb en *A. excentricus*, *A. aquaticus* y *C. crescentus* utilizando el vector pEA1. Para lograrlo, se hizo el cambio de la orientación del gen que se tenía en el constructo pMAR3 donde su posición era inversa a la requerida en pEA1. Para completar la subclonación, se está trabajando desde tres estrategias diferentes ya que es necesario hacer ligación por extremos romos en un extremo del fragmento y con extremos cohesivos en el otro. Paralelamente, para evaluar la capacidad de expresión y toxicidad in vivo de las bacterias recombinantes, se prepararon y transformaron células competentes de *A. excentricus*, *A. aquaticus* y *C. crescentus* con pEA1. Con éstas últimas se llevó a cabo un bioensayo en el cual se halló una mortalidad a las 48 horas superior al 80% con diluciones de los cultivos bacterianos de 10^{-3} y cercanos a 60% con diluciones de 10^{-4} en larvas de *Culex quinquefasciatus*, lo que demostró la utilidad de dichas bacterias para los objetivos propuestos.

CONTRIBUCION AL DESARROLLO DE SISTEMAS DE TRASFORMACION GENETICA PARA LA OBTENCION DE PLANTAS RESISTENTES A LA BROCA DEL CAFE *Hypothenemus hampei*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MYRIAM DE PEÑA (1*)

COINVESTIGADOR: JOSÉ SALVADOR MONTAÑA (1)

(1) Federación Nacional de Cafeteros de Colombia. Centro Nacional de Investigaciones de Café.

«Pedro Uribe Mejía» – CENICAFE Chinchiná, Caldas.

Teléfono: (57-68) 50 6550. Fax: (57-68) 50 4728.

*Convenio Federación Nacional de Cafeteros - Universidad Javeriana.

Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.

Santafé de Bogotá, D. C. Teléfono: (57-1) 320 8320, Ext. 4101. Fax: (57-1) 2171021.

E-Mail: mpena@javercol.javeriana.edu.co

OBJETIVOS

- Evaluación de las condiciones para la transformación estable y recuperación de plantas a partir de protoplastos de café.
- Identificación de clones de ADN para proteínas de la semilla mediante «screening» de una biblioteca de cADN de semillas de café de la variedad Colombia.

RESUMEN

En el año de 1988, apareció por primera vez en Colombia la broca del café *Hypothenemus hampei*. Este insecto solo se reproduce y alimenta en el grano de café, causando gran daño al fruto. Las pérdidas por el ataque de la broca pueden ser hasta de un 60%. A diferencia de otros problemas fitosanitarios, en el caso de la broca no se han identificado fuentes de resistencia en el germoplasma de café hasta ahora evaluado. Esto limita las posibilidades de control a la utilización de algunas prácticas culturales y al uso de insecticidas que tienen impacto en el medio ambiente. Por este motivo, desde su aparición en Colombia en 1988, la Federación Nacional de Cafeteros a través del Centro Nacional de Investigaciones de Café (CENICAFE), está orientando el control de la broca mediante un Programa de Manejo Integrado (PMI), que busca reducir el impacto económico de la plaga, sin afectar el equilibrio ecológico de las zonas cafeteras. Dicho programa incluye, como objetivos de mediano plazo, el desarrollo de mejores sistemas de control cultural, y la aplicación de métodos de control biológico. Sin embargo, uno de los objetivos de largo plazo es producir plantas con resistencia al insecto a través de técnicas de transformación genética, como un complemento a los otros métodos de control.

Con el fin de lograr este objetivo, desde el año de 1991 la Federación viene trabajando en varios proyectos de investigación tendientes a desarrollar los protocolos de transformación, así como a evaluar compuestos potencialmente útiles para el control genético de la broca. La meta final de este programa de investigación será la de incorporar a la variedad Colombia, variedad altamente productiva y con resistencia a la roya, genes que le confieran resistencia a la broca del café. Con el presente estudio se busca lograr la regeneración de plantas transgénicas a partir de protoplastos. Y por otra parte, se plantea iniciar un trabajo sobre la identificación, clonación y caracterización de genes de la semilla de café, que nos permita posteriormente la obtención de promotores específicos para la expresión de los genes de resistencia en el fruto de café.

DESARROLLO DE METODOS DE DIAGNOSTICO PARA EL POTYVIRUS QUE INFECTA MARACUYA, *Passiflora edulis* SIMS, EN EL VALLE DEL CAUCA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ALVARO ALEGRIA (1).

(1) Departamento de Biología. Facultad de Ciencias. Universidad del Valle.
Ciudad Universitaria Meléndez. Cali. Teléfono: (57-92) 339 3243. Fax: (57-92) 339 2440

OBJETIVOS

- Obtener métodos de diagnóstico muy sensibles que combinen la inmunocaptura con la amplificación mediante PCR para la detección del *Potyvirus* que infecta maracuyá en el Valle del Cauca.
- Purificar las partículas virales después del crecimiento del virus en plantas de maracuyá.
- Obtener anticuerpos monoclonales específicos contra éste virus.
- Marcar los anticuerpos monoclonales con ADN sintético mediante unión covalente directa del ADN a las moléculas de anticuerpo.
- Usar el complejo ADN-anticuerpo para detectar el *Potyvirus* del maracuyá mediante una técnica de ELISA sandwich y amplificación mediante PCR del ADN.
- Mediante una metodología alternativa, capturar las partículas virales, usando los anticuerpos monoclonales, la transcriptasa reversa del ADN y amplificar el cADN por medio de PCR (PCR-INIA).

RESUMEN

Los inmunoensayos de tipo ELISA han sido extensamente usados para la detección de virus en plantas (Clark y Adams, 1971), sin embargo su sensibilidad y especificidad, especialmente cuando son usados anticuerpos policlonales no ha sido óptima. Recientemente la sensibilidad de los sistemas de detección basados en anticuerpos ha sido mejorada por la combinación de anticuerpos monoclonales y antígenos específicos marcados con una molécula de ADN y posterior amplificación del ADN marcado mediante la técnica de PCR en una técnica conocida como Inmuno-PCR. En la actualidad se une directamente el ADN al anticuerpo en vez de usar la quimera estreptavidina-proteína A como un ligante, lo que reduce la complejidad del ensayo y permite detectar simultáneamente múltiples antígenos. Este trabajo pretende extender esta técnica a la detección de virus en plantas, usando como modelo un *Potyvirus* que infecta maracuyá (*Passiflora edulis* var. Sims), planta de importancia económica en el Valle del Cauca y de gran demanda en los mercados nacionales e internacionales.

Se trabaja a partir de plantas sanas de maracuyá, infectadas con potyvirus suministrado por el Instituto Colombiano Agropecuario, ICA seccional Palmira. La presencia del virus, su pureza y su integridad se comprueba mediante microscopía electrónica. Se realizaron análisis electroforéticos de la proteína de la cubierta del *Potyvirus* del maracuyá empleando geles de poliacrilamida con

dodecil sulfato de sodio (SDS), empleando estándares de peso molecular conocido como anhidrasa carbónica 29.000, G3P 36.000 y ovoalbumina de 45.000 daltons, observándose bandas a la altura de 45.000 daltons.

La preparación se purificó utilizando un gradiente de Cloruro de Cesio (CLCs) y se determinó la concentración de proteínas por los métodos de Bradford y Harlow y Layne. El proceso de Inmunización se efectuó con ratones BALB/c endogámicos (Zola and Brooks, 1982) de 4 a 8 semanas de edad, la actividad de los anticuerpos existentes en el suero, se determina mediante ELISA indirecta por fijación del antígeno al plato (PTA-ELISA) utilizando como conjugado una anti-Ig G de ratón marcada con fosfatasa alcalina.

DESARROLLO DE UN METODO DIAGNOSTICO PARA *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* UTILIZANDO LA REACCION EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

INVESTIGADOR PRINCIPAL: PATRICIA DE PORTILLO (1); MARIO ALBERTO POSADA (1);
GERMAN ARVELAEZ (2).

(1) Corporación Corpogen, Calle 26A No. 37-28. Santafé de Bogotá, D.C.
Teléfono: [57-1] 368 5411, 368 4983. Fax: [57-1] 368 4987.

E Mail: corpogen@colomsat.net.co

(2) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá,
D.C.

Teléfono: [57-1] 316 51 18. Fax: [57-1] 368 14 48.

OBJETIVOS

- Desarrollar un sistema diagnóstico para *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).
- Validar el sistema en pruebas de campo, utilizando cepas del hongo aisladas en fincas comerciales de la sabana de Bogotá.

RESUMEN

Fusarium oxysporum f.sp. *dianthi* (Fod), es el patógeno causante del marchitamiento del clavel, enfermedad que representa grandes pérdidas al sector floricultor del país. El diagnóstico temprano de la enfermedad, sobre todo en el material básico de propagación, es esencial para un buen manejo del cultivo comercial. Los métodos diagnósticos disponibles actualmente no son del todo satisfactorios, debido a su complejidad, el tiempo que consumen y su poca capacidad discriminatoria entre la forma especial *dianthi* de otras formas especiales.

En una primera fase de este proyecto, utilizando la técnica de amplificación arbitraria de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD), logramos diferenciar entre (Fod) y otras formas especiales de *Fusarium oxysporum* aisladas de diferentes hospederos. El estudio nos permitió la identificación de cuatro grupos (HV), con patrones genéticos diferentes dentro del grupo taxonómico (Fod). Análisis de hibridación molecular con fragmentos escogidos del RAPD permitieron el reconocimiento selectivo de los cuatro grupos descritos. Los fragmentos genéticos identificados son candidatos para el desarrollo de un sistema diagnóstico por PCR.

En esta segunda fase los fragmentos genómicos identificados serán clonados y secuenciados. Con esta información, se diseñarán los iniciadores para la estandarización de un sistema de multiplex PCR que identifique la forma especial *dianthi*. La prueba será validada utilizando la colección de cepas disponibles en CorpoGen y cepas aisladas en un estadio de campo en fincas infectadas de la Sabana de Bogotá.

DESARROLLO DE UN SISTEMA DIAGNOSTICO PARA *Fusarium oxysporum f. sp. dianthi* UTILIZANDO TECNICAS DE BIOLOGIA MOLECULAR

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MARIO ALBERTO POSADA (1).
COINVESTIGADORES: PATRICIA DEL PORTILLO (1); GERMAN ARBELAEZ (2).

(1) Corporación CORPOGEN. Calle 26A No 37-28. Santafé de Bogotá, D.C.
Teléfonos: (57-1) 368 4983; 368 4985. Fax: (57-1) 269 4904/368 4987.
E Mail: corpogen@colomsat.net.co

(2) Universidad Nacional de Colombia. Facultad de Agronomía. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá,
D. C.
Teléfono: (57-1) 316 51 18. Fax: (57-1) 368 14 48.

OBJETIVOS

- Desarrollar un método de diagnóstico rápido, específico y sensible para el hongo *Fusarium oxysporum f.sp.dianthi* utilizando la técnica de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y la técnica del Random Amplified Polymorphic ADN (RAPD), con el ánimo de proporcionarle a los cultivadores una herramienta para el diagnóstico y manejo de esta enfermedad.
- Estandarizar la técnica del RAPD (Random Amplified Polymorphic ADN) y diseñar otros iniciadores de RAPD que sirvan para distinguir aislamientos de diferentes razas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* de otras especies y de aislamientos no patogénicos del hongo.
- Encontrar una correlación entre los patrones de bandeo de un aislamiento del hongo con iniciadores específicos y la patogenicidad de éste en pruebas con variedades de clavel susceptibles y resistentes.
- Tomar los iniciadores que den resultados positivos en las etapas uno y dos y con ellos secuenciar parte de los genes codificados, para encontrar iniciadores más largos que den una mayor especificidad a la prueba.

RESUMEN

El hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* es el agente causal del marchitamiento del clavel, enfermedad que ocasiona grandes pérdidas económicas en los cultivos de exportación y para cuyo control se emplean fungicidas y otros productos químicos nocivos al medio ambiente. Este *Fusarium* es difícil de erradicar por las estructuras de resistencia que presenta y el medio más efectivo de control es mediante el uso de material vegetal de propagación libre del patógeno. Los métodos convencionales de detección que miden la virulencia diferencial del patógeno no son enteramente confiables y tardan aproximadamente veinte semanas en presentar resultados.

Este proyecto propone desarrollar un método diagnóstico alternativo rápido, específico y sensible para la detección de razas fisiológicas y la diferenciación de formas patógenas de *Fusarium oxysporum f.sp. dianthi* mediante el desarrollo de las técnicas de reacción en cadena de la polimerasa, PCR y la técnica de Random Amplified Polymorphic ADN, RAPD.

EVALUACION DE CEPAS DE *Trichoderma* PARA EL CONTROL DE LA HORMIGA ARRIERA *Atta cephalotes*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SERGIO ORDUZ PERALTA (1).

(1) Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Carrera 72A No. 78B-141.
Medellín. Teléfono: (57-4) 441 0855. Fax: (57-4) 441 5514
E-Mail: sorduz@epm.net.co

OBJETIVOS

- Evaluar especies de *Trichoderma* como posible antagonista del hongo cultivado por *A. cephalotes*.
- Seleccionar una cepa de *Trichoderma* que tenga un rápido crecimiento y un alto potencial como inhibidor del hongo cultivado por *A. cephalotes*.
- Evaluar las diferentes cepas seleccionadas de *Trichoderma* contra el hongo de *A. cephalotes* mediante modelos *in vitro*.
- Evaluar las diferentes cepas seleccionadas de *Trichoderma* mediante bioensayos en laboratorio con colonias establecidas de *A. cephalotes*.
- Evaluar las mejores cepas seleccionadas de *Trichoderma*, mediante bioensayos en campo.

RESUMEN

Las hormigas cortadoras (Hymenoptera: Formicidae) son consideradas como una de las plagas que causan mayor daño a cultivos importantes como ajonjolí, palma africana, cocotero, yuca, caña de azúcar, mango, ciprés, naranjo, limonero, manzano. El control de estas hormigas se realiza fundamentalmente por medio de productos químicos, pero tiene gran dificultad debido a lo complicado de su comportamiento y a la gran cantidad de galerías que construyen dificultando la localización de la reina.

Investigamos la interacción de 19 aislamientos de *Trichoderma* y 4 de *Gliocladium* contra el hongo *Attamyces sp.* simbionte de la hormiga arriera. La mayoría de los aislamientos (82,6%) inhiben el crecimiento del micelio de *Attamyces sp.*, lo que fue probablemente debido a la habilidad de colonizar y de competir por el sustrato. El aislamiento *T. lignorum* (T-26) fue el que más fuertemente inhibió el crecimiento del simbionte (51,23 %), con una colonización del 50-60 %, posiblemente debido a sustancias inhibitorias presentes como enzimas, metabolitos secundarios (antibióticos, peptidos, y sustancias volátiles y no volátiles).

Las interacciones entre cepas antagonistas de *Trichoderma sp.* y *Gliocladium sp.* con *Attamyces sp.* se caracterizaron por pérdida de turgencia en la pared celular, vacuolación, granulación del material citoplasmático de las hifas de *Attamyces sp.* y finalmente lisis y desintegración total de la pared celular del hongo atacado en un lapso de 96 horas.

Microscopía electrónica de rastreo mostró que en las interacciones de *T. lignorum* (T-26) y *Gliocladium* (G-55) con *Attamyces sp.*, las hifas de *T. lignorum* (T-26) crecieron en asociación con

las hifas de *Attamyces sp.*, en un enrollamiento flojo y masivo; sin embargo, en algunas de las zonas observadas, las hifas de *Attamyces sp.* se encontraban desintegradas o la pared celular de las hifas presentaban lisis, lo que sugiere que un elemento tóxico o enzimas líticas pudiesen estar actuando, adicionalmente se observó una estructura en las hifas de *Attamyces sp.* semejante a una clamidospora, la cual no fue observada durante la interacción con *Gliocladium* (G-55) ni tampoco ha sido descrita en la literatura revisada. En las microfotografías con *Gliocladium* (G-55) se observaron protrusiones que posiblemente facilitan el contacto entre las hifas del antagonista con las hifas del hongo simbionte de la hormiga *Atta cephalotes*.

EXPRESION DE LOS GENES DE *Bacillus thuringiensis* subsp. medellín EN CEPAS TOXICAS Y NO TOXICAS DE *Bacillus thuringiensis* Y *Bacillus sphaericus*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: SERGIO ORDUZ PERALTA (1).

COINVESTIGADOR: ARMELLE DELÉCLUSE (2).

(1) Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). Carrera 72A No. 78B-141.

Medellín. Teléfono: (57-4) 441 0855. Fax: (57-4) 441 5514.

E-mail: sorduz@epm.net.co

(2) Unit de Bacteries entomopatogenes. Institut Pasteur, París. Francia.

OBJETIVOS

- Construir bacterias entomopatógenas con características mejoradas.
- Clonar los genes de *Bacillus thuringiensis* subsp. medellín en cepas de *Bacillus thuringiensis* no formadoras de cristal, en cepas tóxicas de *Bacillus thuringiensis* y en cepas tóxicas y no tóxicas de *Bacillus sphaericus*.

RESUMEN

Habiendo culminado la transferencia de los genes Cyt1Ab1 (proteína citolítica) y Cry11Bb1 (principal proteína mosquitocida) de *Bt* subsp. medellín hacia cepas tóxicas de *Bt*, como son los mutantes acristalíferos *Bt* subsp. israelensis 4Q2-81 y *Bt* subsp. *thuringiensis* SPL407, y la cepa silvestre *Bt* subsp. israelensis 1884; nos hemos concentrado en la transferencia de los mismos genes hacia cepas de *B sphaericus*.

Inicialmente se realizó la subclonación de los genes en un vector bifuncional compatible con *B sphaericus*, pMK3 allí se obtuvieron los constructos pMAR3 con el gen cry11Bb y pCytM con el gen cyt1Ab1. Con el último constructo se logró introducir el gen de la proteína citolítica de *Bt* subsp. medellín en la cepa 2297 de *B sphaericus*, de igual manera, se introdujo el plásmido pMK3 en una cepa carente de su sistema de modificación-restricción derivada de la cepa silvestre 2362 de *B sphaericus*; la primera cepa recombinante antes mencionada, fue probada contra mosquitos incluyendo una cepa de *Culex quinquefasciatus* resistente a las toxinas nativas de *B sphaericus*, la otra cepa se encuentra en proceso de caracterización molecular.

A raíz de la carencia de reproducibilidad y la frecuente dificultad a la transformación por parte de cepas silvestres de *B sphaericus* que contienen los sistemas de modificación-restricción los experimentos de electrotransformación, se decidió usar la conjugación como vía alternativa para transferir los genes de las proteínas mosquitocidas hacia *B sphaericus*. Para esto se obtuvo el origen de transferencia conjugacional del plásmido RK2 de *E. coli* clonado en el vector pCTC1 procedente del laboratorio del profesor Ferqus Priest, Heriot - Watt University, Edinburgh, Scotland.

El fragmento de ADN fue subclonado en el constructo pMAR3 para dar lugar al constructo pMAR4, el cual quedó así habilitado para ser transferido in trans por las funciones de movilización de cepas de *E. coli* donadoras portadoras de un plásmido ayudador derivado del sistema RK2. Los experimentos de conjugación bacteriana están siendo llevados a cabo en el laboratorio del profesor Priest en Edinburgo, así como la subclonación de los genes de *Bt* subsp. medellín en el vector pODA12, capacitado para la integración en el cromosoma bacteriano de *B sphaericus*, con el ánimo de obtener la máxima estabilidad posible por parte de las cepas recombinantes.

IDENTIFICACION Y AISLAMIENTO DE GENES DE RESISTENCIA A SIGATOKA NEGRA DE GERMOPLASMA DE BANANO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ANDRES LAIGNELET SIERRA(1)

COINVESTIGADORES: SILVIO BELALCAZAR(1); GUILLERMO RONDON(1); STELLA BARRERO (1);
CHARLES J. RNATZEN (2)

(1) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Centro de Investigaciones de Tibaitatá,

Km 14 vía a Mosquera. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 240142.

Teléfonos: (57-1) 344 3000 Ext: 1096. Fax: (57-1) 344 30 54.

(2) Plant Biotechnology Program Manager. Albert B. Alkek. Institut of Biosciences and Technology. 2121 W Holcombe Blvd Houston, Texas 77 030-3303 USA.

OBJETIVOS

- Identificar y aislar genes de defensa relacionados con la resistencia a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en cultivares de banano de la colección colombiana de musáceas.
- Estandarizar un método de inoculación/infección para *Mycosphaerella fijiensis* en las variedades de banano bocado común (genoma AA) y *Malaccensis* tipo Pahang (genoma AA), reconocidas respectivamente como altamente susceptibles y resistentes.
- Realizar un estudio citológico comparativo de la germinación del hongo y desarrollo de síntomas en el cultivar resistente y el susceptible inoculados con *M. fijiensis*.
- Aislar ARNm y construir librerías de cADN a partir de plantas susceptibles y resistentes a diferentes tiempos después de la inoculación con *M. fijiensis* y antes de la aparición de los síntomas de la enfermedad.
- Aislar por el método de hibridación sustractiva clones únicos de cADN inducidos por tratamiento con el patógeno en plantas resistentes y susceptibles.
- Estudiar y comparar la cinética de inducción de ARNm en materiales resistentes y susceptibles en respuesta a la infección.
- Comparar y seleccionar por el método de hibridación sustractiva los clones de cADN inducidos por el tratamiento exclusivamente en plantas resistentes y no en las susceptibles.
- Identificar los clones de cADN seleccionados por el método anterior mediante secuenciación parcial de los ácidos nucleicos y estudios de homología de secuencias reportadas en el banco de genes.

RESUMEN

El banano y el plátano son alimentos básicos en la canasta familiar de los colombianos y su exportación constituye un factor importante en la generación de divisas para la economía nacional. Colombia es el tercer productor mundial de

banano con un área cultivada de 30.000 Ha. aproximadamente. El plátano es cultivado en una extensión de 350.000 Ha. distribuidas por todo el país, el volumen de su producción supera los 2.5 millones de toneladas anuales, destinadas en un 86% al mercado interno y el resto a la exportación.

Las enfermedades causadas por hongos, bacterias y virus constituyen uno de los mayores limitantes de la productividad de los cultivos de banano y plátano. La enfermedad foliar más destructiva es la Sigatoka negra, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*.

El uso de técnicas no convencionales como la biología molecular y la ingeniería genética constituyen una alternativa promisoría para la obtención de plantas resistentes a éstas enfermedades. Existe todo un arsenal conocido de genes y químicos naturales de defensa que son inducidos en las plantas en respuesta al ataque de insectos y/o patógenos. Los métodos de biología molecular ofrecen la posibilidad de clonar y caracterizar genes relacionados con la defensa e introducirlos dentro de cultivos comerciales adecuados con el fin de transmitirles una resistencia genética.

El propósito de éste trabajo es identificar y aislar genes de defensa relacionados con la resistencia a Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet) en cultivos de banano de la Colección Colombiana de Musáceas.

Hasta el momento se han introducido y multiplicado *in vitro* a partir de cultivo de meristemos plantas de las variedades Malaccensis (altamente resistente), Bocadillo Común (susceptible), Gros Michel y Gran Enano (altamente susceptibles). Se introdujeron las dos últimas variedades debido a que Bocadillo Común puede ser tolerante bajo ciertas condiciones ambientales (R. Swennen, J. Valencia, comunicación personal). Estas variedades han sido transferidas a suelo para su utilización en la estandarización de un método de inoculación con *M. fijiensis*. Se ha logrado establecer y mantener una buena cantidad de cultivos monospóricos del hongo procedentes de diferentes regiones del país, los cuales han sido empleados para los ensayos biológicos de infección de plantas sanas.

Mientras se establece el modelo de infección, ha sido posible avanzar en los experimentos moleculares utilizando material vegetal resistente y susceptible de la Colección Colombiana de Musáceas localizada en el C.I. Turipana, Caribia, la cual es mantenida bajo condiciones naturales y se encuentra permanentemente expuesta a una alta presión del patógeno. Se estandarizó un método para el aislamiento eficiente de RNAs. Estos ARNs fueron los materiales de partida para construir tres librerías de cADN de los genotipos resistentes Malaccensis, Balbisiana y Gran Enano (éste último fue seleccionado por su tolerancia a la Sigatoka Negra). Se utilizaron los métodos de hibridación sustractiva y ARN fingerprinting (RAP-PCR y DDRT-PCR) para la identificación y aislamiento de secuencias de cADN diferenciales expresados como respuesta a la infección por el hongo en el cultivar resistente Malaccensis. Los métodos de ARN fingerprinting fueron más eficientes que la hibridación sustractiva.

El conocimiento que se derive del modelo de infección permitirá confirmar mediante análisis Northern Blot la expresión diferencial de los genes aislados por ARN fingerprinting. Las tres librerías de cADN preparadas a partir de materiales resistentes son reservorios de genes para contribuir al objetivo final del trabajo, es decir, el aislamiento de genes de defensa relacionados con la resistencia a la Sigatoka negra.

IDENTIFICACION Y CONTROL DE LOS VIRUS QUE AFECTAN EL CULTIVO DE MARACUYA (*Passiflora edulis*) EN COLOMBIA

INVESTIGADORES PRINCIPALES: FRANCIA VARON DE AGUDELO (1),
FRANCISCO MORALES (2); GUILLERMO GALVES (3).

(1) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Centro de Investigaciones de Tibaitatá,

Km 14 vía a Mosquera. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 240142.
Teléfonos: (57-1) 344 3000, Ext: 286 0223. Fax: (57-1) 282 8947, 285 7270.

(2) Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT. Cali. Apartado Aéreo 6713.
Teléfonos: (57-92) 445 0000, 445 0443. Fax: (57-92) 444 5027.

(3) Biotecnología de Colombia - BIOTECOL LTDA. Carrera 2ª oeste 5-286. Apto. 401. Cali.
Teléfonos: (57-2) 893 2574. Fax: (57-2) 893 2574

OBJETIVOS

- Caracterizar el complejo viral que afecta el cultivo de maracuyá en Colombia y desarrollar sistemas de diagnóstico para su detección.

RESUMEN

Entre 1996 y 1998, funcionarios de CORPOICA visitaron 11 departamentos productores de maracuyá (*Passiflora edulis*) en Colombia, donde se colectaron un total de 338 muestras de plantas de maracuyá aparentemente afectadas por enfermedades virales. El análisis de estas muestras se realizó en la Estación Experimental de CORPOICA y en la Unidad de Virología del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Palmira, Valle, mediante técnicas de patogenicidad, microscopía electrónica, serología con anticuerpos monoclonales y policlonales, electroforesis de ácidos nucleicos, amplificación de cDNA, clonación, hibridación y secuenciación de ácidos nucleicos. Las prospecciones y exámenes realizados, claramente demuestran que la situación fitosanitaria del maracuyá, es manejable en lo que respecta a la variabilidad y distribución de enfermedades virales del maracuyá en Colombia. Hasta la fecha solo se han detectado dos virus, siendo el más prevalente (incidencia en Colombia > 95%) un *Potyvirus* transmitido por áfidos. Un aislamiento de este *Potyvirus* (P83), procedente de Roldanillo, Valle, se amplificó mediante la técnica molecular de RT-PCR, se clonó y secuenció, estableciéndose una relación de similitud del 97% en la organización genómica de este aislamiento con el virus del Mosaico de la soya (Soybean mosaic *potyvirus*, SMP). Este virus es diferente del principal *Potyvirus* que infecta al maracuyá a nivel mundial, el virus del endurecimiento del fruto (Passion fruit woodiness, PWP). El segundo virus detectado en los departamentos del Valle, Antioquia y Santander, ha sido caracterizado como un miembro del grupo de los *Tymovirus*, algunos de los cuales pueden o no tener insectos vectores, específicamente coleópteros. El *Tymovirus* detectado en maracuyá en Colombia, no ha sido transmitido por coleópteros. Hasta el momento, los principales focos de los *Potyvirus* y *Tymovirus* en Colombia, parecen ser los departamentos del Valle y Santander, respectivamente. Estos dos virus ya pueden ser detectados en material reproductivo de maracuyá mediante técnicas serológicas y, en el caso del *Potyvirus*, mediante técnicas moleculares, como PCR e hibridación de ácidos nucleicos. En el caso del *Tymovirus*, se está intentando producir una sonda específica para realizar pruebas de detección del virus mediante hibridación de ácidos nucleicos, utilizando una región del genoma viral, altamente conservada en el de los *Tymovirus*, conocida como el "Tymobox". Mediante estas técnicas de indización, se dispone ya de material propagativo de maracuyá libre de virus, el cual se está sembrando en regiones productoras de maracuyá, con diversos grados de aislamiento, con el fin de determinar el mejor distanciamiento de los futuros viveros libres de virus, de plantaciones de maracuyá afectadas por estas virosis. La producción de material reproductivo de maracuyá libre de virus, coincide con un interés creciente por fomentar el cultivo y así suplir la creciente demanda interna y externa de maracuyá en Colombia y otros países consumidores.

INCIDENCIA, DISTRIBUCION Y TIPOS DE CEPAS VIRALES DE TRISTEZA CITRICA (CTV) EN UN ÁREA DE 350 HECTAREAS DEL DEPARTAMENTO DE ANTIOQUIA. ESTABLECIMIENTO DE UNA COLECCION DE CEPAS SUAVES DE CTV CON POTENCIAL PARA SER UTILIZADAS EN PRUEBAS DE PROTECCION CRUZADA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JOSE PEÑARANDA VALVERDE (1)

(1) Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Facultad de Medicina. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá. D.C. Teléfono: (57-1) 368 13 90. Fax: (57-1) 222 54 14.

OBJETIVOS

- Establecer la incidencia y distribución de los diferentes tipos de cepas del virus de la Tristeza de los cítricos (Citrus tristeza *Closterovirus*, CTV), suaves o severas, en un área de 350 hectáreas en el Departamento de Antioquia.
- Establecer una colección de cepas suaves de CTV con potencial para ser utilizadas en pruebas de protección cruzada.
- Proponer un plan piloto de certificación fitosanitaria de cítricos.
- Caracterizar molecularmente los diferentes tipos de cepas suaves o severas de CTV en el área de 350 hectáreas del Departamento de Antioquia, mediante técnicas de ELISA, inmunoblotting, utilizando anticuerpos poli y monoclonales, patrones electroforéticos de los dsRNA y secuenciamiento del cDNA del gene de la proteína de la cubierta de una cepa suave y una severa.
- Seleccionar cepas locales de CTV suaves (Mompox y Antioquia), mediante una evaluación biológica, producción en las nervaduras de las hojas de una clorosis suave en plantas como la lima Mexicana en condiciones de invernadero.
- Proponer un plan piloto de certificación fitosanitaria de cítricos.

RESUMEN

Durante los últimos 30 años, el virus de la Tristeza de los cítricos (Citrus Tristeza *Closterovirus*) ha sido catalogado como el agente patógeno viral más importante que afecta a cítricos de diferentes especies. El CTV infecta la mayoría de las especies, variedades e híbridos de cítricos (Rutacea) los cuales son especialmente susceptibles a las diferentes cepas de CTV, cuando están establecidos sobre patrones de naranja agria. En Colombia, el cultivo de los cítricos ha tomado una gran importancia económica debido a los programas de diversificación y a las nuevas condiciones internacionales de mercadeo. El área de plantaciones comerciales es de aproximadamente 12.000 Ha, mientras que el área de las semicomerciales es mayor de 20.000 Ha. En los próximos cinco años se espera un aumento en el área comercial de 7.000 Ha. Los estudios preliminares sobre la incidencia del CTV en las principales regiones cítricas de Colombia han mostrado que la incidencia del virus puede alcanzar un 95%.

En el presente trabajo se utilizarán las técnicas de DAS y DAS-ELISA para determinar la presencia de aislamientos de CTV suaves y severos complementándose con el análisis electroforético de los patrones de dsRNAs, en el Departamento de Antioquia y la región de los Llanos Orientales infectados con CTV. Con los resultados que se obtengan se ampliará la información de la epidemiología molecular de este virus en Colombia y se contribuirá en la escogencia de cepas de CTV que puedan tener un uso potencial en programas de protección cruzada, tanto naturalmente como plantas trasgénicas.

INGENIERIA GENETICA PARA LA RESISTENCIA AL VIRUS DEL MOSAICO DEL PEPINO (*Cucumber mosaic Cucumovirus, CMV*) EN ESPECIES COMERCIALES DE *Musa spp.* EN COLOMBIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ANDRES LAIGNELET SIERRA(1).
COINVESTIGADORES: ELENA REICHEL (1); MARTHA LUCIA OROZCO (1);
SILVIO BELALCAZAR (1).

(1) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria CORPOICA. Centro de Investigaciones de Tibaitatá.
Km 14 vía a Mosquera. Santafé de Bogotá, D. C. Apartado Aéreo 240142.
Teléfonos: (57-1) 344 3000 Ext: 1096. Fax: (57-1) 344 30 54.

OBJETIVOS

- Obtener y utilizar un sistema eficiente de transformación de banano mediado por *Agrobacterium*.
- Evaluar y seleccionar cepas de *Agrobacterium tumefaciens* capaces de transformar cultivariedades colombianas de plátano y banano, usando un vector de transformación que contenga el gen de Kanamicina NPTII como marcador de selección y el gen de antocinina como gen reportero.
- Evaluar la estabilidad y la heredabilidad del gen reportero introducido en especies transgénicas de musa después de varias etapas de propagación clonal y determinar la frecuencia de regeneración de las plantas quiméricas y medios para eliminar el quimerismo.
- Crear plantas transgénicas de banano usando un vector de transformación que contenga el gen de la cubierta proteica, CMV, bajo la regulación del promotor CaMV35S para la evaluación de la resistencia viral en condiciones controladas y en pruebas de campo.
- Amplificar y comparar las regiones de los genes que codifican para el virus de la cubierta proteica, CMV de diferentes aislados de CMV colombianos, usando la reacción en cadena de la polimerasa.
- Crear una librería cADN de CMV para los genes de la cubierta proteica del CMV aislados y clonados usando los fragmentos del gen amplificados mediante PCR como una sonda.
- Crear un vector de transformación *Agrobacterium*, que contiene el gen de Kanamicina NPTII como un marcador adecuado y el gen de la cubierta proteica del CMV.

RESUMEN

Se han establecido cultivos *in vitro* de los cultivares Dominico Hartón, Gros Michel, Grand Naine y Melaccensis, mediante la utilización de técnicas de cultivo de tejidos, con el objeto de emplearlas para los experimentos de mejoramiento genético.

También se han realizado diferentes experimentos de transformación por bombardeo de partículas en células embriogénicas de las variedades Dominico Hartón, y Three Hand planty, estas últimas provenientes de la Universidad Católica de Lovaina. Actualmente se cuenta con 47 contenedores

con células de plátano potencialmente transgénicas, bombardeadas con plásmidos que contienen el gen de la cubierta proteica del CMV y con el gen reportero Gus A. Estas células se encuentran en fase de regeneración *in vitro*, y se espera obtener plantas transgénicas regeneradas, en las cuales se verificará la presencia de los genes de interés por PCRs y posteriormente por medio de Southern y Northern blot podrá confirmarse el número de copias de los transgenes. Adicionalmente, se confirmará inicialmente la expresión de la cubierta proteica de CMV con pruebas de ELISA y posteriormente utilizando Western blot.

Además de la estrategia de transformación por bombardeo de partículas, se han venido adelantando estudios de transformación, evaluando la expresión transitoria de la β -glucoronidasa en células embriogénicas utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Hasta el momento los resultados no son comparables a los obtenidos utilizando biobalística, pero demuestran la posibilidad de aplicar la metodología en suspensiones celulares de plátano.

Paralelamente se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco, las cuales fueron transformadas con el gen de la CP del CMV, pertenecientes a la primera progenie de las obtenidas el año anterior las cuales se encuentran en el invernadero de bioseguridad, específicamente diseñado para trabajar con este tipo de material. Estas plantas serán retadas con un aislamiento colombiano de CMV para establecer los niveles de tolerancia de las plantas ante la infección, en condiciones de invernadero.

Con el objeto de obtener el inóculo necesario para el bioensayo, se inocularon plantas sanas de *Nicotina tabacum*, con un extracto de una planta infectada de un aislamiento colombiano de CMV obtenido del CIAT. Una vez purificado el virus y determinada la capacidad infectiva del mismo se procederá a hacer el bioensayo.

RESUMEN

MARCADORES MOLECULARES PARA LA CARACTERIZACION GENOTIPICA DE *Rubus glaucus* Y DOS ESPECIES FORESTALES *Cordia alliodora* Y *Alnus acuminata*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MARTA LEONOR MARULANDA ANGEL (1).
COINVESTIGADORES: LUIS GONZAGA GUTIERREZ (1);
AMPARO CASTRO VALLEJO (1).

(1) Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias Ambientales.
Pereira. Apartado Aéreo 97. Teléfono: (57-63) 212 443. Fax: (57-63) 212 443
E-Mail: ubioteve@utp.edu.co

OBJETIVOS

- Desarrollar marcadores genéticos (RAPDs) para la caracterización de las especies *Rubus glaucus*, *Alnus acuminata* y *Cordia alliodora*.
- Estudiar las relaciones genéticas entre 11 individuos seleccionados y compararlas con otras poblaciones naturales identificadas en sitios distantes como Santa Cecilia (límites de Risaralda y Chocó)
- Caracterizar las plántulas de *Cordia alliodora* propagadas *in vitro* y determinar mediante huellas digitales a qué clon corresponden
- Desarrollar la técnica de RAPDs para determinar y garantizar la estabilidad genética del material de *Rubus glaucus* (mora de castilla) propagado *in vitro*.
- Desarrollar la técnica de RAPDs para determinar y garantizar la estabilidad genética de *Alnus acuminata* (Aliso cerezo), propagado *in vitro* y evaluar la diversidad del germoplasma de dos cuencas hidrográficas diferentes.

RESUMEN

Este estudio es la continuación de un proyecto financiado por COLCIENCIAS en 1994 «Selección y Propagación de Nogal cafetero (*Cordia alliodora*) y propagación masiva de Mora de Castilla (*Rubus glaucus*) y Aliso Cerezo (*Alnus acuminata*)» en el cual se consiguió la propagación *in vitro* del Nogal y la Mora y la regeneración por embriogénesis somática del Aliso.

En Nogal cafetero, el desarrollo de marcadores moleculares (RAPDs) tiene como objetivo estudiar las relaciones genéticas entre 11 individuos seleccionados y compararlas con otras poblaciones naturales identificadas en sitios distantes como Santa Cecilia (Risaralda), caracterizar las plantas propagadas *in vitro*, y determinar a qué clon corresponden.

De otra parte, se tiene una metodología para la regeneración de aliso, siendo necesario desarrollar una técnica que permita certificar la estabilidad genética del material propagado *in vitro* y comparar molecularmente las poblaciones naturales de esta especie a nivel regional, en dos cuencas hidrográficas, como son las del río Quindío y las del río Otún. Asimismo con el fin de garantizar la estabilidad genética del material de *Rubus* producido *in vitro* y la calidad de los

clones es necesario desarrollar marcadores moleculares que como los RAPDs permitan un seguimiento a lo largo de los subcultivos hasta la obtención del material en vivero que permita certificar el material que se entregue al cultivador.

NOGAL CAFETERO

(*Cordia alliodora*)

Se cuenta con un banco de germoplasma local (semilla germinada *in vitro*) en cooperación con CENICAFE, quienes recolectan semilla de los árboles seleccionados en el departamento y la suministran al laboratorio debidamente identificada con el municipio y la vereda de donde proviene, a partir de la cual se realizan las extracciones de ADN.

Se tiene un protocolo de extracción de ADN que consiste en un buffer de extracción con CTAB y carbón activado para la limpieza de contaminantes. Se cuenta con una colección ADN genómico de cinco procedencias de semilla de árboles seleccionados en buenas condiciones para la amplificación.

Se han evaluado 60 primers Operon donados por el Centro de Agricultura Tropical CIAT, de los cuales 18 han resultado polimórficos.

MORA DE CASTILLA

(*Rubus glaucus*)

Tenemos un banco de germoplasma de 5 localidades del eje cafetero, en cooperación con CORPOICA quien selecciona y remite el material al laboratorio, como parte del convenio interinstitucional para la propagación masiva de mora entre el COMITÉ DEPARTAMENTAL DE CAFETEROS, CORPOICA Y UTP.

Se tienen extracciones de DNA de muestras aleatorias de plantas en diferentes ciclos de multiplicación del proceso de producción masiva de plantas *in vitro*, para el estudio de estabilidad genética de la especie durante el cultivo *in vitro* y después de 10 ciclos de multiplicación. Se desarrolló un protocolo de extracción de DNA utilizando buffer con CTAB y carbón activado para la limpieza de contaminantes. Se tiene almacenado el ADN de las 10 procedencias y de los clones *in vitro* para su posterior análisis de estabilidad genética.

Se han evaluado 60 primers Operon de los cuales ocho son polimórficos.

ALISO CEREZO

(*Alnus acuminata*)

Se tienen ubicadas las zonas de las cuencas hidrográficas río Otún en Risaralda y río Quindío en el Quindío donde se tomarán las muestras del material foliar de los árboles adultos.

Se cuenta con un protocolo de extracción para forestales utilizando buffer con CTAB y carbón activado para la limpieza de contaminantes.

Se tiene una población de plántulas *in vitro* de alisos de la cuenca del río Quindío que han sido regenerados por embriogénesis somática y se encuentran en evaluación en vivero.

MICROPROPAGACIÓN DE MATERIALES JUVENILES Y ENSAYOS DE REVIGORIZACIÓN DE MATERIALES ADULTOS DE ESPECIES FORESTALES (*Decussocarpus rospigliosi* (Pilger) de Laub y *Quercus humboldtii* Bondpland) UTILIZABLES EN CUENCAS HIDROGRAFICAS DE BOYACA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JOSE C. PACHECO MALDONADO(1)
COINVESTIGADOR: MARIA CRISTINA CASTELLANOS(1)

(1) Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. Laboratorio de Bioplasma. Tunja.
Apartado aéreo 608. Teléfono: (57-87) 425 254, Ext: 1740. Fax: (57-87) 742 52 68.

OBJETIVOS

- Desarrollar un procedimiento que permita la micropropagación de materiales juveniles, aplicable en programas de multiplicación masiva de material vegetativa utilizable en cuencas hidrográficas.
- Evaluar la técnica del microinjerto como una alternativa para inducir revigORIZACIÓN de materiales adultos, con el fin de facilitar la clonación de árboles seleccionados.

RESUMEN

Debido al desequilibrio que el hombre ha causado sobre los ecosistemas, especialmente con la tala indiscriminada de árboles, la inadecuada utilización de las tierras, la mala utilización de, o inexistencia de tecnologías para el adecuado manejo de los recursos naturales, especialmente de los sistemas forestales, las cuencas hidrográficas y sus áreas circunvecinas están abocadas a un continuo deterioro, y por tanto la disponibilidad de recursos hídricos aprovechables es cada día más escasa. Tanto la conservación como la recuperación de cuencas exige, entre otros recursos, la disponibilidad continua de materiales vegetativos de especies nativas y/o adaptadas a áreas geográficas específicas.

Desafortunadamente la mayoría de especies utilizables en estas actividades, y particularmente las forestales, presentan problemas de regeneración natural, aspecto que limita drásticamente su disponibilidad en sus hábitats naturales.

Decussocarpus rospigliosi y *Quercus humboldtii* son dos especies comunes de las cuencas hidrográficas de Boyacá y que presentan problemas de región natural. Debido a la tala de árboles antes de que alcancen su madurez sexual, la producción de semilla se ve progresivamente limitada. Por la importancia de estas especies en los sistemas forestales de dichas cuencas es necesaria la aplicación de nuevas tecnologías que permitan su multiplicación vegetativa, eludiendo las restricciones que impone la reproducción sexual mediante semilla.

Para suplir las necesidades de material vegetativo de especies forestales, utilizables en cuencas hidrográficas, se plantea como alternativa la utilización de la micropropagación para el establecimiento de procedimientos eficaces que permitan la propagación vegetativa y, por tanto el desarrollo de programas de multiplicación masiva, la creación de huertos semilleros o de huertos de propagación clonal de las especies mencionadas. Las técnicas propuestas para el desarrollo de este proyecto están basadas sobre procesos de organogénesis directa en materiales juveniles y de microinjerto para los ensayos de revigORIZACIÓN de materiales adultos.

PRODUCCION DE AVISPA *Cephalonomia stephanoderis* PARA EL CONTROL BIOLÓGICO DE LA BROCA DEL CAFÉ

INVESTIGADOR PRINCIPAL: GUILLERMO LEON HERNANDEZ (1).
COINVESTIGADOR: DIEGO MIGUEL SIERRA (1).

(1) Biocaribe Ltda. Carrera 12 No. 52A-27. Medellín.
Teléfono: [57-4] 361 4646. Fax: [57-4] 255 0640

OBJETIVOS

- Adaptar y mejorar la metodología ideada por Cenicafé para producir *Cephalonomia stephanoderis*.
- Producir 15.000.000 de avispas (*Cephalonomia stephanoderis*) por mes.

RESUMEN

Se estima que de 1.100.000 hectáreas plantadas en café desaparecerán entre 250.000 y 300.000 en las zonas por debajo de los 1.300 m.s.n.m. como ya viene sucediendo en algunos municipios colombianos, y que las 800.000 restantes convivirán con la broca. El ritmo de dispersión de esta broca según la propia Federación Nacional de Cafeteros ha sido del 10% en 1992, 30% del área en 1993; 70% en 1994 y llegó al 100% en 1995.

Ante esta situación se hace necesario complementar las prácticas culturales impulsadas por la Federación (RE-RE) (revise, recoja, repase y repele) con los beneficios obtenidos por la producción y uso de la avispa *Cephalonomia stephanoderis* como método de control biológico contra la broca del café. Teniendo en cuenta el impacto sobre la productividad y sobre la calidad del grano de café producido por la broca, así como su dispersión se hace necesario la implementación de técnicas de control biológico.

El proyecto está dirigido a mejorar la metodología desarrollada por CENICAFE para producir *Cephalonomia stephanoderis* (avispa parásito de la broca) y a producir 15 millones avispas/mes.

En la actualidad se ha iniciado la multiplicación masiva de la avispa y se han entregado 600.000 avispas a la Federación Nacional de Cafeteros.

PROPAGACION IN VITRO Y CARACTERIZACION MOLECULAR DE LA ESPECIE FORESTAL *Aniba perutilis* Hemsley Y LA ESPECIE *Musa acuminata* Collar SELECCIONADAS COMO PROMISORIAS POR LA COMUNIDAD DEL ALTO SAN JUAN, RISARALDA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MARTA LEONOR MARULANDA ANGEL (1)

(1) Universidad Tecnológica de Pereira. Facultad de Ciencias Ambientales.

Pereira. Apartado aéreo 97. Teléfono: (57-63) 212 443 Fax: (57-63) 212 443.

E-Mail: ubioteve@utp.edu.co

OBJETIVOS

- Propagar mediante el cultivo de tejidos *in vitro* la especie forestal *Aniba perutilis* y la especie *Musa acuminata* seleccionadas como promisorias por la comunidad del Alto San Juan, Risaralda.
- Caracterizar genéticamente las especies *Aniba perutilis* y *Musa acuminata*.
- Establecer y micropropagar mediante técnicas de embriogénesis somática y organogénesis las especies *Aniba perutilis* y *Musa acuminata*
- Realizar un estudio de polimorfismos, aplicando técnicas de biología molecular y utilizando RAPDs, en las especies *Aniba perutilis* y *Musa acuminata*.

RESUMEN

Aniba perutilis (Comino crespo) es una Lauracea nativa sometida a fuertes presiones antrópicas por su valiosa madera. *Musa acuminata* (plátano primitivo) es una Musacea comestible sustento alimenticio para la población del Alto San Juan (límites entre Risaralda y Chocó). Se pretende con este proyecto realizar la propagación masiva, mediante el cultivo de tejidos *in vitro*, de comino crespo y plátano primitivo, así como su caracterización molecular a nivel regional a partir de RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA).

PLATANO PRIMITIVO

(*Musa acuminata*)

En este estudio se seleccionaron 10 microcuencas tributarias del alto Río San Juan en predios de agricultores tradicionales de la zona, donde se recolectó colino para la multiplicación *in vitro*. Se tiene un protocolo para la multiplicación masiva *in vitro* de plantas de plátano primitivo (*Musa acuminata*) y un stock de 5300 plantas *in vitro* en cámara de crecimiento.

Mensualmente se transfieren a invernadero 100 plantas que son endurecidas en condiciones controladas en el invernadero de CARDER, vecino a la UTP, al mes son transportadas a Santa

Cecilia, Alto San Juan, Risaralda. Se ha establecido conjuntamente con la CARDER una parcela demostrativa de plantas de primitivo procedentes del laboratorio, para evaluar su comportamiento agronómico y fomentar entre los agricultores la siembra de material vegetal producido en el laboratorio.

Se ha desarrollado un protocolo de extracción de ADN de la especie Musa, habiéndose extraído DNA de siete procedencias diferentes de plátano primitivo.

Durante la investigación con los marcadores moleculares RAPDs, se han empleado 60 primers de Operon donados por el Centro Internacional de Agricultura Tropical CIAT, de los cuales 11 han evidenciado polimorfismos que permitirán la caracterización regional de la especie.

COMINO CRESPO

(Aniba perutilis)

Se han seleccionado árboles en la zona de Santa Cecilia, Alto San Juan Risaralda, los cuales serán utilizados para el estudio de diversidad genética en la especie. Se tienen en invernadero 20 árboles procedentes del Magdalena Medio y adquiridos a la UCO (Universidad Católica de Oriente) que son utilizados como fuente de explantes para el desarrollo de un protocolo para la multiplicación *in vitro* de la especie. Se ha desarrollado un protocolo para el establecimiento *in vitro* de fragmentos de tejido foliar de árboles de vivero y para la inducción y proliferación de callo. Se están evaluando diferentes medios de cultivo y concentraciones hormonales para inducir la producción de embriones somáticos y/o brotes. Se cuenta con un protocolo de extracción de ADN (Dellaporta modificado y limpieza del extraído con carbón activado) en condiciones que permiten su amplificación.

II. BIOTECNOLOGIA AMBIENTAL

COMINO CRESCO

Comino Cresco

IL BIOTECNOLOGIA AMBIENTALE

INMOVILIZACION DE BACTERIAS Y MICROALGAS EN ALGINATO PARA REMOVER NITROGENO INORGANICO DE AGUAS RESIDUALES AGROINDUSTRIALES

INVESTIGADOR PRINCIPAL: LUZ ESTELA GONZÁLEZ (1), YOAV BASHAN (2).

- (1): Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias. Departamento de Biología.
Programa de Saneamiento y Biotecnología Ambiental.
Carrera 7 No. 43-82. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 56710.
Teléfono (571) 320 8320 Ext: 4089. Fax. (571) 285 0503.
E-Mail: legonzal@javercol.javeriana.edu.co
- (2) Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste CIB. Grupo de Microbiología.
La Paz, B.C.S. México 23000. AP. 128. Teléfono: (52-112) 53 663 Ext: 219/200.
Fax: (52-112) 54710. E Mail: bashan@cibnor.mx

OBJETIVOS

- Evaluar la remoción de nitrógeno inorgánico en agua residual agroindustrial mediante la utilización de un co-cultivo de microalgas y bacterias inmovilizadas en esferas de alginato.
- Determinar la capacidad de *Azospirillum brasilense*, para reducir nitratos microaerofilicamente.
- Determinar la actividad nitrificadora de *Chlorella vulgaris* bajo condiciones microaerofilicas.
- Comparar la efectividad en la eliminación de nitrógeno inorgánico del agua entre diferentes tipos de co-cultivos de bacteria – microalga inmovilizados en alginato.

RESUMEN

La utilización de cultivos de microalgas como forma de tratamiento terciario presenta grandes ventajas frente a los sistemas convencionales físicos y químicos, sin embargo, uno de los principales problemas que presentan los cultivos de microalgas en suspensión es la recuperación de la biomasa producida. Para evitar este problema, se han diseñado sistemas que utilizan microalgas inmovilizadas en diferentes medios de soporte, tales como carragenina, quitosina, alginato, agar, y poliuretano, entre otros.

Dentro de los resultados obtenidos en el Programa de Saneamiento y Biotecnología Ambiental, hemos encontrado que la cloroficea *Chlorella vulgaris* remueve hasta un 97% del amonio de aguas residuales agroindustriales; sin embargo, debido a la actividad nitrificadora que se presenta en los cultivos con microalgas, la concentración de nitratos aumenta significativamente (hasta un 600%).

Teniendo en cuenta tanto la dificultad de cosechar la biomasa de microalgas en cultivos en suspensión, como la necesidad de eliminar de manera más eficiente el nitrógeno inorgánico (NO₂, NO₃, NH₄) de las aguas residuales, el presente proyecto busca evaluar la actividad conjunta de la microalga *Chlorella vulgaris* y la bacteria *Azospirillum brasilense*, inmovilizadas en esferas de alginato. La primera oxida eficientemente el amonio hasta nitratos, mientras que la segunda, aunque no se ha utilizado nunca para el tratamiento de agua residual, es capaz de reducir nitratos a nitrógeno gaseoso en condiciones anaerobias y microaerofilicas.

REMOVED FROM THE ORIGINAL COPY OF THE
REPRODUCED FROM THE ORIGINAL COPY OF THE
REPRODUCED FROM THE ORIGINAL COPY OF THE

III. BIOTECNOLOGIA INDUSTRIAL

III. BIOTECNOLOGÍA INDUSTRIAL

ESCALADO DEL PROCESO DE PRODUCCION DE LA VACUNA ANTITETANICA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: NESTOR ARIEL ALGECIRAS (1)
COINVESTIGADOR: JOSE GRANADOS(1)

(1) Instituto Nacional de Salud. Carrera 50 zona ó. Santafé de Bogotá, D.C.
Teléfono: (57-1) 222 0577 Ext: 101. Fax: (57-1) 222 0194 - 222 3055

OBJETIVOS

- Establecer el proceso de producción de vacuna antitetánica a escala industrial.
- Escalar el proceso de producción de toxina tetánica por fermentación del *Clostridium tetani*.
- Seleccionar las operaciones unitarias para el pretratamiento del medio de cultivo y para la purificación de la toxina tetánica.
- Establecer las condiciones de operación de las etapas mencionadas.

RESUMEN

El *Clostridium tetani* es el agente causal del tétanos, una enfermedad mortal producida por la contaminación de heridas con esporas del microorganismo las cuales germinan y producen una potente toxina (toxina tetánica) que es la responsable directa de la enfermedad.

La enfermedad se puede prevenir por vacunación, consiste en administrar a la persona susceptible el antígeno atenuado (toxóide) por vía intramuscular, lo cual activa la producción de anticuerpos neutralizantes contra la toxina. Para obtener el antígeno (toxina tetánica) es necesario cultivar el microorganismo y extenderlo a los filtrados al final de la etapa de autólisis.

El *Cl. tetani* se cultiva para la producción de toxina a 35°C, bajo anaerobiosis, en un medio enriquecido y a pH neutro, no es proteolítico y la actividad glucidolítica depende específicamente de la cepa. Los requerimientos de energía se satisfacen por una reducción directa de aminoácidos como el glutámico, aspártico e histidina, a CO₂, NH₃ y ácidos acético y butírico.

Desde los años 40 se ha estudiado al microorganismo con miras a obtener un medio de cultivo adecuado para su crecimiento y producción de toxina, el medio actual es el Latham - Mueller. También se han estudiado diferentes sistemas de cultivo: por lotes, continuo, semi-continuo, con y sin agitación. En el Instituto Nacional de Salud (INS) se utiliza un sistema de cultivo sumergido sin agitación y en jarros de vidrio de 30 litros, con 10 litros de cultivo c/u. Cada semana se cultivan ó jarros simultáneamente los cuales son transportados manualmente al autoclave, de ahí se llevan a enfriar por inmersión en una cuba con agua fría, y luego se lleva al cuarto de incubación a 35°C.

El Instituto Nacional de Salud (INS) produce a nivel nacional una gran variedad de productos biológicos para uso humano con los cuales cubre los programas ampliados de inmunización y otras necesidades del sector salud del país. Uno de los productos de mayor importancia es la

vacuna antitetánica. La demanda en Colombia para 1996 fue de 13.5 millones de dosis, de los cuales el INS produjo nueve millones e importó las restantes.

En la producción de la vacuna, la etapa más importante consiste en obtener por fermentación del *Cl. tetani*, la toxina específica que se convierte, a través de diferentes operaciones del proceso (inactivación, purificación y adsorción) en un producto no tóxico con alta capacidad antigénica constituyendo la parte fundamental de la vacuna.

Para poder controlar más fácilmente el proceso se hace necesario cultivar el microorganismo en un fermentador cuyo nivel de producción sea suficiente para la demanda requerida, que posea sistemas adecuados de control automático de las variables más importantes, y que exista una conexión en línea con los equipos pre y pos fermentación, lo que llevaría a una mínima manipulación de materiales durante el proceso, mínimo riesgo biológico e indudablemente sería un gran avance para alcanzar los niveles de calidad enunciados por la OMS en su manual sobre Buenas Prácticas de Manufactura (GMP).

Actualmente se han determinado las condiciones de operación del fermentador con base en los criterios de escalado: potencia por unidad de volumen y relación altura/diámetro; se ha obtenido información experimental del cultivo a nivel de laboratorios (5 litros) y se ha establecido el procedimiento de preparación del medio de cultivo requerido para la producción de la toxina tetánica.

ESTUDIO DE UNA FRUCTOSILTRANSFERASA DE *Aspergillus niger* EN LA SINTESIS DE FRUCTOOLIGOSACARIDOS

INVEGADOR PRINCIPAL: SONIA AMPARO OSPINA (1);
AGUSTIN LOPEZ MUNGUÍA(2)

(1) Universidad Nacional de Colombia. Instituto de Biotecnología. Departamento de Farmacia. Ciudad Universitaria. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo: 14490.
Teléfono: (57-1) 316 5285. Fax: (57-1) 316 5060
E Mail: saospina@ciencias.unal.edu.co

(2) Universidad Nacional Autónoma de México. Instituto de Biotecnología.
Apartado Aéreo 510-3 C.T. 62210.

OBJETIVOS

- Estudiar la producción de fructooligosacaridos a partir de sacarosa utilizando la enzima fructosiltransferasa de *Aspergillus niger*.

RESUMEN

Los fructooligosacaridos (neosacaridos) son oligomeros de sacarosa, a la cual se unen unidades de fructosa por enlaces glicosídicos (β -2-1), son resistentes a la digestión por alfa-amilasa, sacarasa y maltasa de mamíferos por lo cual no son digeribles para humanos, pero pueden ser empleados por organismos Gram positivos como bifidobacterias. Esta actividad permite un crecimiento en la flora intestinal, evitando la constipación, incrementando los lípidos en sangre y suprimiendo la producción de sustancias putrefactivas, además reduce los metabolitos tóxicos y enzimas dañinas y previene la diarrea patogénica.

En este trabajo se pretende producir la enzima fructosiltransferasa de *Aspergillus niger* por fermentación con el objeto de estudiarla en la reacción de síntesis de oligosacáridos. Se estudiarán diferentes métodos de purificación de la enzima, así como las condiciones de reacción empleando sacarosa como sustrato con el objeto de optimizar la producción de fructooligosacaridos.

BIOCONVERSION EXTRACTIVA PARA LA PRODUCCION DE *Mucor Miehe's* RENNET

INVESTIGADOR PRINCIPAL: AIDA DE STOUVENEL (1)

COINVESTIGADOR: JOSE MARIA ESCOBAR (2)

(1) Universidad del Valle. Facultad de Ingeniería. Departamento de Ciencia y Tecnología de Alimentos.

Ciudad Universitaria Meléndez. Cali.

Teléfonos: (57-2) 330 7285, 330 2479. Fax: (57-2) 333 4907.

(2) Sucromiles Investigación y Desarrollo. Recta Cali-Palmira Km 19. Palmira.

Teléfono: (57-2) 444 4330 ext. 172. Fax: (57-2) 444 5559.

OBJETIVOS

- Integrar un proceso de ultrafiltración con un proceso de producción continua de la enzima renina a partir del zigomyceto *Mucor miehei*.
- Determinar la eficiencia en la separación de los subproductos responsables de la represión sin afectar la producción de la enzima.
- Determinar si es posible mejorar la productividad del proceso y que tanto, al integrar la unidad de ultrafiltración con el fermentador productor de la enzima.
- Determinar que aminoácido(s) son responsables de la represión en la producción de la enzima.

RESUMEN

El zigomyceto *Mucor miehei* produce una enzima proteasa de tipo ácido cuya síntesis se ve sujeta a procesos de represión de tipo feed back por los subproductos de la fermentación. Frente a ésta limitación fisiológica se plantean dos alternativas para obtener la enzima; la primera de ellas consiste en integrar los pasos de producción y recuperación de la enzima para mejorar la productividad total del bioproceso, y la segunda consiste en aplicar la técnica denominada bioconversión extractiva.

Este proyecto propone integrar un proceso de separación por membranas, tal como la ultrafiltración, con la producción de la enzima renina en un proceso continuo en un sistema denominado biorreactor de membrana, que cuando permite acoplar la producción y la recuperación de la enzima se denomina bioconversión extractiva.

PRODUCCION POR FERMENTACION EN LEVADURAS DEL ANTIGENO DE SUPERFICIE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS B POR TECNOLOGIA DEL ADN RECOMBINANTE

INVESTIGADOR PRINCIPAL: ESTEBAN OSORIO CADAVID (1).

(1) Universidad del Valle. Departamento de Biología. Ciudad Universitaria Meléndez. Cali.
Teléfono: (57-2) 227 2490. Fax: (57-2) 339 7264.

OBJETIVOS

- Desarrollo de una metodología para la obtención de la proteína de la cápside del virus de la hepatitis B a partir de procesos fermentativos en *Saccharomyces cerevisiae*.

RESUMEN

A nivel mundial la Hepatitis B es la causa de un grave y creciente problema de salud. Las cifras publicadas por la OMS son preocupantes: más de 2 mil millones de personas han sido infectadas, casi 300 millones son portadores crónicos y 2 millones de personas mueren por su causa al año. El nivel de infección de la Hepatitis B es 100 veces mayor que HIV que causa el SIDA.

Este virus es altamente infeccioso y comúnmente asociado con el cáncer de hígado (hepatocarcinoma), con la cirrosis y la hepatitis crónica. Se requieren pequeñas cantidades del mismo para iniciar el proceso de infección y el posterior desarrollo de la enfermedad, que resulta mortal en la mayoría de los casos. El virus ha sido detectado en semen, saliva, orina, heces, bilis, sangre menstrual, secreciones vaginales y fluido pleural.

Los grupos de más alto riesgo de contraer Hepatitis B son los profesionales de la salud, los contactos familiares con personas infectadas, homosexuales, prostitutas, drogadictos, viajeros a áreas endémicas, pacientes sometidos a transplantes renales y hemodiálisis, residentes y personal de instituciones siquiátricas.

En nuestro país a pesar de los esfuerzos realizados por diversas instituciones en la producción de vacunas existe la necesidad de desarrollar procesos productivos de moléculas biológicas (anticuerpos monoclonales, proteínas recombinantes) para uso biomédico, alimenticio, farmacéutico y/o industrial.

En el caso de la vacuna contra la Hepatitis B se trabaja con un fragmento de virus (fragmento de proteína de la cápside) llamado antígeno de superficie (HBsAg). La producción del antígeno está controlada por un gen dentro del virus el cual se inserta en una cepa de levadura a través de un plásmido recombinante, que se ha amplificado inicialmente usando la bacteria *E. coli* como medio de expresión.

Este proyecto de investigación propone la producción del antígeno de superficie del virus de la Hepatitis B a partir de microorganismos recombinantes. Una vez obtenidos los microorganismos recombinantes en los diferentes tipos de levaduras, *S. cerevisiae* y otras levaduras, se evaluará la producción de la proteína viral en cada una de ellas y luego se estudiarán las características medioambientales que influyen en la producción de proteína.

PURIFICACIÓN Y ESTUDIO DE LAS PROPIEDADES DE LAS PEPTIDASAS DEL HEPATOPANCREAS DEL CANGREJO *Paralithodes camtschatica*

INVESTIGADOR PRINCIPAL: IVAN YUREVICH SAKHAROV. (1).
COINVESTIGADOR: JANETH AIDE PEREA VILLAMIL (1).

(1) Universidad Industrial de Santander. Escuela de Química. Facultad de Ciencias. Bucaramanga. Carrera 27. Calle 9ª. Ciudad Universitaria. Teléfono: (57-76) 346 141. Fax: (57-76) 346 141. E mail: sakharov@uis.edu.co

OBJETIVOS

- Purificar y caracterizar las peptidasas presentes en el preparado Colagenasa de Cangrejo.
- Evaluar las propiedades moleculares de las peptidasas puras del cangrejo: masa molecular, punto isoeléctrico, composición de aminoácidos e hidratos de carbono.
- Estudiar las propiedades catalíticas de las peptidasas puras, las condiciones óptimas de máxima actividad enzimática y la especificidad sustrática.
- Evaluar la estabilidad de las peptidasas del cangrejo bajo diferentes condiciones de desnaturalización.

RESUMEN

Existe un fuerte incremento en la utilización de preparaciones enzimáticas en diferentes ramas de la industria, alimenticia, textil, cueros, medicamentos, perfumería y veterinaria. Las proteasas, celulasas y lipásas son las enzimas más utilizadas abarcando en la actualidad alrededor del 60% del mercado mundial de estos productos, aunque también se emplean peptidasas, oxidasas y fosfatasa.

Artyukov y Sakharov aislaron y extrajeron un complejo multienzimático del hepatopancreas del Cangrejo *Paralithodes camtschatica* al cual denominaron «Colagenasa de Cangrejo» (CC). Los estudios iniciales mostraron que este preparado contiene como mínimo tres proteasas con actividades catalíticas, cuyas características han sido determinadas. Para la detección de las peptidasas en el preparado (CC) se emplearon métodos espectrofotométricos y cromatográficos usando los sustratos: Hipuril-L-Fenilalanina (Hip-L-Phe), Hipuril-L-Arginina (Hip-L-Arg), Hipuril-L-lisina (Hip-L-Lis), Paranitroanilida de L-alanina (L-Ala-pNa) y Paranitroanilida de L-leucina (L-Leu-pNa). Se encontró que las carboxipeptidasas presentan una alta actividad, mientras que las aminopeptidasas poseen una baja actividad.

La purificación de la carboxipeptidasa del cangrejo se efectuó por Cromatografía Líquida de Baja Presión. En primer lugar se hizo uso de la cromatografía de intercambio iónico, probando tres soportes (DEAE-Toyopearl; DEAE-Sepharosa y DEAE-celulosa). Los mejores resultados se obtuvieron con el soporte DEAE-celulosa. La muestra proveniente de la cromatografía de intercambio iónico se sometió posteriormente a cromatografía hidrófoba sobre Fenil-Sepharosa obteniéndose

un alto grado de purificación de las carboxipeptidásas. La fase final utilizó la cromatografía de filtración en gel sobre Sephadex G-75 y Sephacril S 100. Ambos soportes fueron efectivos para la purificación, pero sobre Sephadex G-75 se obtuvieron los mejores resultados.

Para la caracterización de la carboxipeptidasas se realizó electroforesis en poliacrilamida al 12.5% en presencia de SDS y 2-mercaptoetanol. Se determinó en 40000 Da la masa molecular del preparado, el pH óptimo de actividad se encontró a 7.5 y se comprobó dependencia de la actividad frente a la concentración de NaCl en el sustrato. La actividad máxima de la carboxipeptidasa se encontró a una concentración 1M de NaCl.

Con el preparado puro se ha estudiado la estabilidad térmica de la enzima y se encontró que ésta se inactiva a temperatura ambiente y es estable a 5°C.

DECLARATION OF THE BOARD OF DIRECTORS

The Board of Directors of the Corporation has reviewed the financial statements of the Corporation for the year ended December 31, 2008, and has approved the same for release to the public.

SIGNATURES

Signature of the President: _____
Signature of the Treasurer: _____
Signature of the Secretary: _____

DATE

Date of the meeting: _____
Date of the declaration: _____

IV. BIOTECNOLOGIA PECUARIA

IV. BIOTECNOLOGIA PECUARIA

APLICACION DE LA BIOTECNOLOGIA ANIMAL PARA LA PRESERVACION Y PROPAGACION DE GANADO CRIOLLO COLOMBIANO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JOSÉ LUZARDO ESTRADA L. (1) JORGE OSSA (2)
MARK WESTHUSIN (3)

(1) Convenio Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA y Universidad Nacional de Colombia.

Av. El Dorado 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 240142 Las Palmas.
Teléfono: (57-1) 368 6253. Fax: (57-1) 368 6218.

(2) Universidad de Antioquia. Centro de Investigaciones Médicas. Facultad de Medicina.
Medellín. Carrera 51D No. 62-29. Teléfono: (57-4) 510 6060/63.

(3) Texas A&M University. Department of Veterinary Physiology and Pharmacology.
College of Veterinary Medicine College Station, Tx 77843, USA.

OBJETIVOS

- Desarrollar procedimientos adecuados para obtener un gran número de embriones de ganado criollo colombiano en estado de preimplantación.
- Efectuar la criopreservación de 300 a 500 embriones de cada una de las siete especies de ganado criollo colombiano (Blanco Orejinegro, Casanare, Chino Santandereano, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle, Romosinuano y San Martinero).

RESUMEN

Las razas bovinas criollas de Colombia, han sufrido un proceso de adaptación a las condiciones tropicales de nuestro país. Dentro de este proceso de selección genética natural, se han ido creando fenotipos deseables que incluyen: resistencia/tolerancia a parásitos internos y externos, habilidad para soportar ambientes externos en temperatura y humedad, habilidad para sobrevivir con forrajes de baja calidad, alta eficiencia reproductora y resistencia o inmunidad a ciertas enfermedades. Sin embargo, dada la entrada de razas seleccionadas para producción aunque no para adaptación a nuestro medio, este material genético se ha ido perdiendo, llegando a peligrosos niveles de extinción.

Este proyecto pretende por lo tanto mediante la aplicación de biotecnologías embrionarias como la superovulación, y la congelación de embriones y la fertilización *in vitro*, evaluar el comportamiento de las siete razas criollas de Colombia ante tratamientos superovulatorios, conservar este material genético en forma de embriones y buscar nuevas alternativas como la fertilización *in vitro* para preservar y multiplicar este recurso genético único.

Se han efectuado evaluaciones de los siguientes parámetros reproductivos; tasa de fertilización, clivaje, formación de blastocitos y concentración óptima de espermatozoides. Se demostró la factibilidad de producir embriones F, BON y se logró la implantación en útero de un embrión bovino producido *in vitro*.

Una de las fuentes de variación en la respuesta superovulatoria en bovinos, es la raza de los

animales. En este, sentido, sobre las razas bovinas criollas de Colombia no se tiene información científica, por lo que se ha estado evaluando la respuesta de las siete razas criollas colombianas a dos dosis de hormona foliculo estimulante. Para tal fin se empleó un producto comercial Folltropin (FSH β Vetrepharm - Canadá Inc.). Las dosis utilizadas fueron 24 mg como dosis baja (Ba) y 36 mg como dosis alta (Al). Las dos dosis fueron administradas en fracciones decrecientes con dos inyecciones diarias durante cuatro días. La respuesta fue medida por el número de cuerpos lúteos (CL) detectados a la palpación, el número de embriones colectados y la calidad de estos embriones. Considerándose como transferibles aquellos embriones con más del 70% de sus células viables. Los resultados de este trabajo se presentan en la siguiente tabla:

Valores promedios de la respuesta superovulatoria de siete razas bovinas criollas de Colombia a dos dosis de FSH (Folltropin).

Raza	No. Obs.	No. CL	Número de embriones					
			Colectados			Transferible		
			Al	Ba	Al	Ba	Al	Ba
Romo	10	5	6,2 \pm 1,0	5,6 \pm 1,1	2,6 \pm 0,7 ^{ab}	3,0 \pm 1,5 ^{ab}	1,2 \pm 0,5 ^{ab}	1,6 \pm 0,9 ^{ab}
BON	10	5	5,4 \pm 1,0	5,8 \pm 1,3	4,1 \pm 1,2 ^a	5,4 \pm 1,5 ^a	1,0 \pm 0,4 ^{ab}	1,6 \pm 0,6 ^{ab}
San Mart.	10	5	5,7 \pm 1,5	3,6 \pm 2,3	2,3 \pm 1,0 ^{ab}	1,0 \pm 0,8 ^{ab}	0,7 \pm 0,4 ^b	0,8 \pm 0,6 ^{ab}
CCC	10	4	3,3 \pm 0,8	2,8 \pm 1,6	0,9 \pm 0,5 ^b	0,0 \pm 0,0 ^b	0,8 \pm 0,4 ^{ab}	0,0 \pm 0,0 ^b
Casanare	8	4	6,5 \pm 1,3	6,0 \pm 2,3	4,1 \pm 1,2 ^a	5,0 \pm 2,2 ^a	1,0 \pm 0,6 ^{ab}	2,0 \pm 0,9 ^{ab}
Hartón	6	5	5,5 \pm 1,7	7,4 \pm 2,5	3,5 \pm 1,7 ^{ab}	4,8 \pm 3,2 ^a	2,3 \pm 1,2 ^a	3,0 \pm 2,3 ^a
Chino	7	1	6,8 \pm 1,3	6,0	4,8 \pm 1,4 ^a	30 ^{ab}	2,8 \pm 1,1 ^a	10 ^{ab}

Datos en la misma columna con distinto superscripto son diferentes. (P \leq 0,10)

El análisis estadístico fue corrido en el programa Statistix con base en un diseño completamente aleatorio. El ANOVA mostró diferencias entre las razas para el número de embriones colectados, con la más baja respuesta para el CCC y no existieron diferencias estadísticas entre las otras razas, igualmente hubo diferencias en número de embriones transferibles con la respuesta más baja nuevamente para el CCC y la mejor para el Hartón del Valle (aunque no difirió estadísticamente de las otras razas), confirmando lo reportado por la literatura en relación con la variación que se presenta entre razas, a los tratamientos superovulatorios. No hubo diferencias significativas entre las dos dosis de Folltropin para los diferentes parámetros evaluados, así como tampoco, se observó interacción entre dosis y raza para los mismos parámetros. Este es el resultado del primer año de evaluación y deberá continuarse con este trabajo por otros cuatro años.

Un resumen de este trabajo fue presentado en Enero de 1998 en la Annual Conference of the International Embryo Transfer Society, en Boston, MA., USA y publicado en la revista Theriogenology 49 (1): 377 de 1998.

CARACTERIZACION MOLECULAR Y SEROLOGICA DE CEPAS DE *Leptospira hardjo* y *Leptospira spp.* AISLADAS EN GANADO DE LECHE DE LA SABANA DE BOGOTA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JUAN FERNANDO GALLEGO BELTRAN (1).

COINVESTIGADOR: ESPERANZA CORTES (1).

(1) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA/CEISA.
Avenida El Dorado No. 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 29743.
Teléfonos: (57-1) 368 6212 . Ext.: 1760. Fax: (57-1) 368 6212

OBJETIVOS

- Conocer la distribución de los diferentes serovares de leptospiros y más específicamente de las cepas del serovar *hardjo*, en ganado de leche de la sabana de Bogotá, mediante el desarrollo y normalización de técnicas de laboratorio que permitan la diferenciación interserovares e intraserovar *hardjo* (Hardjoprajitno y Hardjobovis).
- Aislar, cultivar, serotipificar y conocer la prevalencia de cepas de los diferentes serovares de leptospira, encontrados en material clínico-patológico y de matadero provenientes de ganado de leche de la sabana de Bogotá.
- Determinar las diferencias y similitudes entre cepas de Hardjoprajitno y Hardjobovis mediante el análisis de DNA genómico total, empleando para ello endonucleasas de restricción.
- Diferenciar entre cepas del serovar *hardjo* y entre serovares mediante reacciones serológicas cruzadas para las cuales se emplearan antígenos específicos de cepa (Hardjoprajitno y Hardjobovis) y de serovar (*hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *balcánica*, *javanica* y *vietnam*).

RESUMEN

La leptospirosis es una enfermedad zoonótica diagnosticada desde hace muchos años en diferentes especies animales en Colombia. Internacionalmente se reconoce como una de las enfermedades bacterianas de mayor importancia desde el punto de vista reproductivo (pérdidas gestacionales) y por ende productivo (interrupción de la preñez o disminución en la producción de leche) en la especie bovina. En las últimas dos décadas se han realizado encuestas serológicas las cuales reportan una incidencia promedio del 21,7% en diferentes regiones ganaderas de Colombia; sin embargo aún no ha existido la investigación y la divulgación suficientes que permitan conocer la magnitud del impacto de la enfermedad en la ganadería nacional. En Colombia no se conocen estudios que determinen la diferenciación y distribución entre las cepas del serovar *hardjo* (Hardjobovis y Hardjoprajitno) y otros serovares presentes en los bovinos. Estas diferencias taxonómicas entre los miembros del género *Leptospira* conllevan a su vez diferencias en su patogenicidad, antigenicidad e inmunogenicidad. El conocimiento de las mismas, es por lo tanto indispensable en el diseño de estrategias racionales y efectivas para el control de la enfermedad en poblaciones animales (incluido el hombre).

El presente proyecto propone, el análisis y comparación del ADN genómico total, a través de herramientas moleculares tales como endonucleasas de restricción, reacción en cadena de la polimerasa (PCR), y/o «Random Amplified Polymorphic ADN» (RAPD), para determinar las diferencias y similitudes entre los diferentes serovares y más específicamente de las cepas del serovar *hardjo* (Hardjoprajitno y Hardjobovis), al igual que, mediante reacciones serológicas cruzadas con antígenos específicos de las cepas Hardjobovis y Hardjoprajitno y de los serovares (*hardjo*, *icterohaemorrhagiae*, *balcánica*, *javánica* y *vietnam*), establecer la diferenciación inter e intra serovar, de cepas de leptospira aisladas en ganado de leche de la sabana de Bogotá. Con lo anterior se pretende aclarar la etiología de la leptospirosis, conocer la distribución de los serovares y determinar sus implicaciones epidemiológicas.

En cuanto al uso de técnicas de biología molecular se desarrolló la metodología para cultivar leptospiras en pequeña escala, se aisló el ADN y se estandarizó la técnica con endonucleasas de restricción. Mediante el análisis con esta técnica no se encontraron, hasta ahora similitudes para pensar que las cepas bajo estudio son Hardjoprajitno o Hardjobovis por lo tanto los objetivos de este proyecto cobran más importancia con respecto a la presencia del serovar *hardjo* en el hato bovino. Un aspecto muy importante es mejorar la metodología de aislamiento con el fin de aumentar la posibilidad de éxito en el aislamiento de cepas.

SELECCION GENETICA PARA RESISTENCIA NATURAL CONTRA BRUCELOSIS Y AFTOSA EN GANADO CRIOLLO COLOMBIANO

INVESTIGADOR PRINCIPAL: JOSÉ BARRERA VELANDIA (1); JORGE OSSA (2);
GARRY ADAMS (3)
COINVESTIGADORES: OLGA MARINO (4); LUZARDO ESTRADA (5); FABIO ZULUAGA (2);
JOE, TEMPLETON (3)

- (1) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA/CEISA.
Avenida El Dorado No. 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 240142 Las Palmas.
Teléfonos: (57-1) 368 6212. 368 6253. Fax (57-1) 368 6218.
- (2) Universidad de Antioquia. Centro de Investigaciones Médicas. Facultad de Medicina.
Carrera 51D No. 62-29. Medellín. Teléfonos: (57-4) 510 6060/6063.
- (3) Texas A&M University. Department of Veterinary Physiology and Pharmacology.
College of Veterinary Medicine. College Station, Texas 77843. USA.
- (4) Instituto Colombiano Agropecuario - CORPOICA/CEISA.
Av. El Dorado 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo. 29743. Teléfono: (57-1) 368 6829.
- (5) Convenio Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA y
Universidad Nacional de Colombia.
Av. El Dorado 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 240142 Las Palmas.
Teléfono: (57-1) 368 6253. Fax: (57-1) 368 6218

OBJETIVOS

FASE I (2 años)

- Identificar 250 bovinos (BON) para resistencia (o susceptibilidad) a *Brucella abortus* virulenta, usando un ensayo bacteriostático *in vitro*, con macrófagos derivados de monocitos de sangre periférica.
- Identificar 250 bovinos (BON) para resistencia o (susceptibilidad) al virus de la fiebre aftosa, serotipo O usando un ensayo *in vitro* con fibroblastos o macrófagos para evaluar la tasa y magnitud de la replicación viral y ensayar anticuerpos protectores neutralizantes en sueros.
- Establecer un banco de leucocitos, fibroblastos y ADN de cada bovino BON muestreados para análisis genéticos moleculares.
- Seleccionar dos toros y doce hembras resistentes a brucelosis y aftosa fundadores de un hato para estudios genéticos.

FASE II (3 años)

- Establecer un hato BON para estudios genéticos a través de fertilización *in vitro* y transferencia de embriones, obteniendo treinta descendientes de cada uno de los siguientes grupos de apareamiento RXR, RXS, SXR y SXS.
- Determinar *in vivo* el fenotipo de quince descendientes de cada grupo de apareamiento

mediante descargas estandarizadas de *Brucella abortus* virulenta y/o virus de la fiebre aftosa serotipo O.

- Producir e identificar fenotípicamente *in vitro*, progenie de retrocruces, como una base para segregación genética y análisis de ligamiento para identificar marcadores moleculares genéticos de resistencia natural contra brucelosis y/o fiebre aftosa en ganado criollo colombiano.

RESUMEN

Debido a que la capacidad del ganado para resistir o tolerar patógenos de origen bacterial, viral y parasitario es influenciada marcadamente por factores genéticos, el objetivo principal de este proyecto es el de identificar genes (o marcadores genéticos) que controlan la resistencia natural a enfermedades infecciosas de importancia económica.

Para lograr este objetivo, inicialmente se propuso usar pruebas funcionales biológicas *in vitro* para caracterizar fenotípicamente al ganado criollo colombiano Blanco orejinegro (BOJ) con respecto a su resistencia natural específica a Brucellosis y fiebre aftosa.

Se han realizado cultivos de fibroblastos de biopsias de oreja de 47 animales BON que fueron infectados con el virus de aftosa - O1 campos para evaluar el efecto citopático. Los resultados han sido variables.

Se han realizado ensayos de purificación de macrófagos a partir de sangre periférica de bovinos BON para ser utilizados en pruebas de infección con *Brucella abortus*. Algunas modificaciones en el protocolo original de purificación de macrófagos fueron introducidas por el equipo de investigadores de la Universidad de Antioquía y luego transferidas a los investigadores de CORPOICA.

Sobre la base de la estandarización de la técnica de cultivo de fibroblastos a partir de tejido auricular de bovinos, se adelantó la titulación del virus de la fiebre aftosa tipo O en 47 cultivos de fibroblastos de diferentes bovinos BON. Los resultados parciales obtenidos sugieren una menor permisibilidad de los fibroblastos para la replicación del virus de la fiebre aftosa con respecto a la observada en células BHK21 (control), obteniéndose índices de infecciosidad que fluctuaron entre 0,437 y 1,0. La distribución de índices de infecciosidad se presentan en la siguiente tabla:

Distribución de los índices de infecciosidad del virus de fiebre aftosa O1-Campos en cultivos de fibroblastos de tejido auricular de bovinos criollos de la raza Blanco orejinegro (BON).

Intervalo índice de infecciosidad *	VI.	No. Bovinos
0.4<0.5		1
0.5<0.6		1
0.6<0.7		7
0.7<0.8		8
0.8<0.9		13
0.9<1.0		7
S.I		10
Total		47

S.I.= Sin información. Células no aptas para titulación de virus.

a Índice de infecciosidad = DICC50/ml en fibroblastos / DICC50/ml en células BHK21

Actualmente se cuenta con muestras almacenadas de leucocitos, fibroblastos y ADN de aproximadamente 120 bovinos BON, para posteriores análisis genéticos moleculares.

La información que se viene generando será utilizada para seleccionar y caracterizar fenotípicamente pies de cría de toros y vacas mediante desafío in vivo con patógenos virulentos para producir familias de ganado de linaje en gran parte con transferencia de embriones cosanguíneos que segreguen estas características. Estas familias nucleares serán la mayor fuente para un análisis profundo tendiente a identificar los genes que codifiquen por resistencia natural a Brucelosis y fiebre aftosa.

Adicionalmente, la identificación de estos marcadores ayudará a la selección de poblaciones resistentes a estos agentes patógenos lo cual reducirá la dependencia del uso de antibióticos y vacunas como alternativa en la prevención y control de estas enfermedades.

GENETICA MOLECULAR Y POBLACIONAL DE GANADO CRIOLLO COLOMBIANO

INVESTIGADORES: JOSÉ LUZARDO ESTRADA L. (1); JORGE OSSA (2); JAMES DERR (3)
COINVESTIGADORES: JOSE BARRERA V. (4) FERNANDO ARIZA B. (4);
ANDRÉS RUIZ-LINARES (2); SCOTT DAVIS (5)

(1) Convenio Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA y
Universidad Nacional de Colombia

Av. El Dorado 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 240142 Las Palmas.
Teléfono: (57-1) 368 6253. Fax: 368 6218

(2) Universidad de Antioquía. Centro de Investigaciones Médicas. Facultad de Medicina. Medellín.
Carrera 51D No. 62-29. Teléfono: (57-4) 510 6060/63.

(3) Department of Veterinary Physiology and Pharmacology. Texas A&M University
College Station, Texas 77840, USA

(4) Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria - CORPOICA-CEISA
Avenida El Dorado 42-42. Santafé de Bogotá, D.C. Apartado Aéreo 240142. Las Palmas.

Teléfono: (57-1) 368 6253. Fax: 368 6218

(5) Texas A&M University. Animal Science Department, College Station, TX 77843, USA.

OBJETIVOS

- Obtener ADN nuclear de leucocitos y establecer líneas celulares a partir de cultivos de fibroblastos de las siete razas de ganado criollo bovino.
- Colectar datos de las secuencias del ADN del genoma mitocondrial y microsatélites del genoma nuclear con el fin de obtener información relativa a los parámetros genéticos poblacionales de cada una de las siete razas de ganado criollo (polimorfismos).
- Determinar la relación filogenética entre las siete razas criollas y su relación con otras razas de bovinos.
- Identificar marcadores moleculares (microsatélites) asociados con características de importancia económica (producción, reproducción, resistencia a enfermedades, adaptación).

RESUMEN

Algunas de las razas de ganado criollo colombiano (Blanco Orejinegro, Casanare, Chino Santandereano, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle, Romosinuano y San Martinero) poseen características especiales que les han permitido adaptarse a las condiciones locales y que incluyen resistencia a parásitos internos y externos, habilidad para resistir condiciones ambientales extremas; tales como altas temperaturas y humedades, habilidad para utilizar un forraje de baja calidad, alta eficiencia reproductiva y resistencia a las enfermedades infecciosas.

Cada una de éstas razas representan un recurso natural único. Con el fin de hacer el mejor uso de éstos recursos junto con sus características genéticas definidas, es de trascendental importancia entender completamente su potencial genético, así como su historia filogenética. Con éste proyecto se propone usar la información de la secuencia del genoma mitocondrial y los marcadores microsatélites del genoma nuclear para determinar la relación filogenética y el origen de éstas

razas y mapear las características genéticas de importancia económica que son únicas en éstas razas. Con esta información, se analizará la genética molecular y poblacional de los bovinos criollos de Colombia determinando la variabilidad genética que pueda existir dentro y entre estas razas, así como entre ellas y otras no nativas de Colombia. Este conocimiento es crítico para futuras estrategias de mejoramiento y para que los esfuerzos de conservación de éstas razas sea igualmente eficiente.

En el momento se ha genotipificado y analizado en cuanto a la heterocigocidad (variabilidad genética); endogamia y equilibrio de H.W así como la relación filogenética por medio de agrupamiento utilizando Nigbor Joining y UPGMA de las razas criollas colombianas: Blanco Oreginegro, Casanareño, Chino Santandereano, Costeño con Cuernos, Hartón del Valle, Romosinuano y San Martinero.

El número de muestras y el número de marcadores STR fue diferente para cada población, siendo la mayor para BON y los resultados quedaron afectados por estos hechos, mostrando agrupaciones que no estaban totalmente de acuerdo con la distribución geográfica; en cuanto al potencial genético. Razas como BON mostró valores 0,68 semejantes al de razas africanas, es decir no intervenidas de manera extensiva.

En la actualidad se está tratando de aumentar el número de muestras para aquellas razas de las cuales se tienen pocas, por ejemplo para Hartón del Valle, San Martinero, Casanareño y Chino Santandereano, así como Cebú que se utilizó como raza externa.

Los resultados parciales obtenidos en cumplimiento del primer objetivo se presentan en la tabla uno, en donde se observa ya una buena cantidad de animales muestreados dentro de cada una de las siete razas criollas y una buena cantidad de material genético del cual ya se han enviado algunas muestras tanto a la Universidad de Antioquia como a la Universidad de Texas A&M.

Tabla 1. Muestras de leucocitos, DNA y fibroblastos procesados de bovinos de las diferentes razas criollas colombianas

RAZA	N. BOVINOS	LEUCOCITOS (NO. Viales)	DNA			FIBROBLASTOS (Viales congelados)
			BUENO	REGULAR	DEGRADADO	
Casanare	42	38(98)	36	3	3	7(38)
Costeño con cuernos	25	25(76)	25	2	-	11(24)
Romosinuano	25	25(70)	20	2	2	11(26)
BON	113	106(200)	73	-	23	18(57)
Hartón de Valle	22	19(89)	6	-	16	18(61)
Sanmartinero	47	34(76)	44	-	3	5(21)
Chino Santandereano	5	5(10)	2	3	-	-
TOTAL	279	252(619)	206	10	47	70(227)

En la tabla No. 2 se encuentran algunos resultados parciales de la evaluación de 11 microsatélites suministrados por la Universidad de Texas A&M.

Tabla 2. Resultados parciales sobre los microsatélites evaluados en las razas bovinas criollas de Colombia.

Microsatélite	VII.	No. de alelos	VIII.	No. de razas que marcan
BM4307		6		3
BM723		6		6
BM4311		2		2
BM6501		2		2
BM1905		1		7
HEL5		5		3
ETH225		3		6
ADCY2		0		0
INRA005		5		3
INRA063		3		7
ILST005		2		7
MAF45		0		0

Los datos mostrados en estas dos tablas son parciales y corresponden a la fase inicial del proyecto que contempla la evaluación de al menos 30 microsatélites para tener información de un marcador por cada cromosoma de los bovinos.

V. BIOTECNOLOGIA SALUD

DESARROLLO DE PRUEBAS DE DETECCIÓN PARA HORMONAS (TSH hCG) BASADAS EN EL USO DE ANTICUERPOS MONOCLONALES

INVESTIGADOR PRINCIPAL: OSCAR OROZCO (1); CAMILA MONROY (1)

(1) Histo-Lab Ltda. Calle 26A No. 37-28. Santafé de Bogotá, D.C.

Teléfonos: (57-1) 368 4994 368 4983. Fax: (57-1) 368 4987.

OBJETIVOS

- Consolidar la línea de desarrollo tecnológico de la Aplicación de Anticuerpos monoclonales en la Producción de Sistemas diagnósticos en Medicina Humana.
- Producir anticuerpos monoclonales que detecten la hormona estimulante tiroidea (TSH) y la hormona Gonadotropica humana (hCG).
- Formular un prototipo de laboratorio para la detección de hormonas.
- Formular una prueba de tamizaje para la detección de TSH, útil para los programas de detección precoz de hipotiroidismo congénito.
- Formular una prueba de embarazo para usuario final (home-test).
- Escalar la producción de estas pruebas mediante la producción de lotes comerciales que sean competitivos en costos de producción y calidad con relación a los productos similares existentes en el mercado.

RESUMEN

Uno de los propósitos fundamentales de la biotecnología es la generación de productos que permitan a la Industria Nacional ser competitiva tanto en el mercado nacional como en el internacional. Los productos diagnósticos basados en Anticuerpos Monoclonales cumplen con estas premisas. Esto ha sido ampliamente evidenciado en la primera etapa de este proyecto en la cual se desarrolló por primera vez en el país y se fabricaron lotes comerciales de pruebas para identificación de los grupos sanguíneos ABO basadas en Anticuerpos Monoclonales. Dichos productos se encuentran en la actualidad en el mercado nacional de productos para diagnóstico han tenido una excelente aceptación por parte de los laboratorios del país

En este proyecto se propone el desarrollo de pruebas diagnósticas para identificación de hormonas de importancia clínica con miras a fabricar por primera vez en el país una prueba para hormona hCG TSH útiles para diagnóstico de embarazo y tamizaje para hipotiroidismo congénito respectivamente.

El hipotiroidismo congénito constituye un problema de salud pública ya que representa una de las causas más comunes de retardo mental que puede prevenirse. El objetivo a mediano plazo es ofrecer una prueba de tamizaje que pueda aplicarse a todos los recién nacidos en el país como ya se hace en otros países.

DESARROLLO DE UN PRODUCTO COMERCIAL PARA LA TIPIFICACION DE ANTIGENOS HLA-DR MEDIANTE LA TECNICA DE PCR-SSP

INVESTIGADOR PRINCIPAL: MARCELA SALAZAR (1)
COINVESTIGADORES: PATRICIA DEL PORTILLO (1)
WALTER OCAMPO (1)

(1) Corporación CORPOGEN. Calle 26A No. 37-28. Santafé de Bogotá, D.C.
Teléfono: (57-1) 368 5411, Fax: (57-1) 368 4987.
E Mail: corpogen@trauco.colomsat.net.co

OBJETIVOS

- Desarrollar un sistema para la tipificación de los antígenos HLA-DR basado en la técnica de PCR-SSP. Este sistema tendrá un nivel de resolución compatible con las necesidades del trasplante renal.
- Prestar la asesoría técnica y la capacitación del personal en los laboratorios que deseen implementar esta tecnología en reemplazo de los métodos serológicos tradicionales.

RESUMEN

La identificación del polimorfismo de los loci del Complejo Mayor de Histocompatibilidad (CMH) es de gran utilidad en el trasplante, especialmente el trasplante renal y de médula ósea. Los métodos de tipificación son variados, pero por definición, la técnica ideal de tipificación debe ser rápida ya que en el trasplante renal de cadáver los resultados deben obtenerse dentro del tiempo de la isquemia fría, y debe ser exacta ya que el éxito del trasplante depende en gran parte de la compatibilidad tisular entre el donante y el receptor. Los métodos serológicos tradicionales para la tipificación de los antígenos HLA-DR, han sido abandonados en los países desarrollados debido al alto porcentaje de error el cual supera el 25%. Sin embargo en nuestro medio, a pesar de que este porcentaje de error es aún más elevado, estos métodos continúan empleándose en la gran mayoría de los laboratorios de HLA.

Este proyecto pretende desarrollar un sistema comercial para la identificación de los antígenos HLA-DR mediante la metodología de PCR-SSP. Este sistema será mucho más exacto en la tipificación que la serología, y será superior a esta desde el punto de vista de costo-beneficio. Aunque sistemas similares ya existen en los países desarrollados, nuestro sistema tendrá la ventaja de poder prestar toda la asesoría técnica necesaria para los laboratorios que deseen implementar estos nuevos métodos de tipificación.

ESTUDIO DE LA VARIACION MOLECULAR EN INDIVIDUOS Y SU UTILIDAD EN LA CRIMINALISTICA EN COLOMBIA

INVESTIGADOR PRINCIPAL: TC. ROCIO DURAN VALENCIA (1); TE. YAKELINE SALAZAR C. (1);
TE. BLANCA Y. BOCANEGRA C. (1); BS. MARTHA L. ACEVEDO N. (1); BS. MARITZA ALVAREZ F. (1)
COINVESTIGADORES: GENOVEVA KEYEUX (2); MANUEL RUIZ G. (3)

(1) Policía Nacional. Laboratorio Central de Criminalística. Grupo de Biología.
Escuela de Cadetes de Policía General Santander. Autopista sur No. 44-01. Santafé de Bogotá, D.C.
Teléfonos: (57-1) 270 3111. Fax: (57-1) 270 3111 Ext: 410.

E Mail: rduran1@insat.net.co

(2) Pontificia Universidad Javeriana. Instituto de Genética Humana. Laboratorio de Genética Molecular.
Carrera 7a No. 40-62. Santafé de Bogotá, D.C. Teléfono: (57-1) 320 8320 Ext: 4085. Fax: (57-1) 285
0503.

E Mail: gkeyeux@javercol.javeriana.edu.co

(3) Pontificia Universidad Javeriana. Laboratorio de Genética Evolutiva.
Carrera 7a No. 40-62. Santafé de Bogotá, D.C. Teléfono: (57-1) 320 8320 Ext: 4054

E Mail: mruiz@javercol.javeriana.edu.co

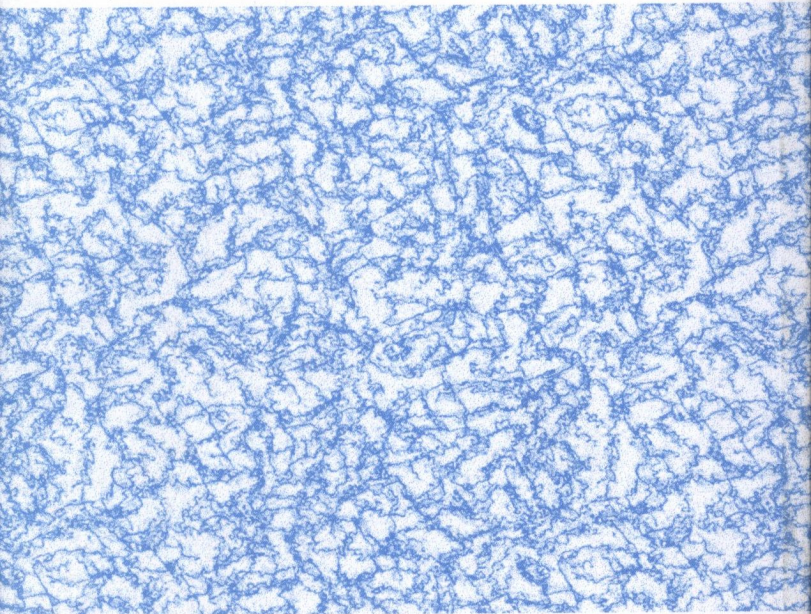
OBJETIVOS

- Describir las frecuencias alélicas y genotípicas en una muestra de población Colombiana de ocho sistemas para aplicación en identificación de individuos.
- Determinar la existencia de variantes no descritas en otras poblaciones en el mundo.

RESUMEN

De acuerdo a datos históricos, los individuos que conforman nuestro país provienen de mezclas de razas de diverso origen conformando lo que algunos autores denominan los mestizos. Esta es una de las muchas formas de expresar la variabilidad genética que en nuestro país se manifiesta tanto en la flora como en la fauna. La aplicación de métodos del área de la Biología Molecular a la identificación de individuos es novedosa al aplicarla al campo de la Criminalística en nuestro medio.

Este proyecto pretende determinar en individuos pertenecientes al grupo de mestizos, la heterocigocidad de frecuencias alélicas de los sistemas HUMvWA, HUMTH01, D1S80, D1S7, D4S139, D5S110, D8S358 y D17S79, con el fin de dar una correcta interpretación a los resultados obtenidos, al analizar evidencias provenientes de procesos penales o en reconocimiento de restos humanos. Durante el desarrollo de la investigación será posible determinar las diferencias o similitudes con estudios de los mismos sistemas en otras poblaciones con características similares y diferentes a las nuestras; además de estandarizar tres metodologías diferentes (STRs, AMPLIFLIP, y VNTRs) de forma que se adquiera un adecuado conocimiento, que permita manejar evidencias dentro del sistema legal Colombiano.



COLCIENCIAS

Transversal 9A N° 133-28 Tel.: (57-1) 216 9800 Fax: (57-1) 625 1788
Apartado Aéreo 051580 • E-mail: simbiosis@colciencias.gov.co
<http://www.colciencias.gov.co/simbiosis/>
Santafé de Bogotá, D.C. Colombia