

Las salas limpias

iberica

**actualidad
tecnológica**

FUNDADA EN 1914 • AÑO 78
Nº 408 • MAYO 1998

**Esterilización por
haz de electrones**

**El aroma y sabor en la
industria quesera**

Las plantas transgénicas

**VII Congreso Farmacéutico
de la alimentación**

Cáceres, 10-13 Junio 1998

La fitoterapia

QUÉ SON Y CÓMO SE HACEN LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS

Desde que el hombre cultiva plantas, la agricultura está basada en la elección de unas especies determinadas y, dentro de ellas, de variedades con características especialmente favorables, ya sea por su cultivo o para obtener de ellas una mayor cantidad o calidad de un producto. La mejora genética es la aplicación de la metodología científica a este proceso, por lo que ha conseguido semillas con las que alcanzar junto con la aplicación de productos agroquímicos y de técnicas agronómicas modernas, los actuales niveles de rendimiento en la agricultura. La mejora genética tiene su base en la variabilidad natural de las especies cultivadas o en parientes próximos que puedan cruzarse con ellas. Si en una especie fuera interesante introducir un carácter determinado y éste no existe en el conjunto de variedades disponibles, la mejora genética no puede hacer nada. Es ahí donde, desde hace poco menos de quince años, interviene la biología molecular.

Avances de la biología molecular

La primera publicación sobre plantas transgénicas se produce en 1983. En los años precedentes se había avanzado enormemente en varias direcciones que confluyen en este descubrimiento. Hay que considerar en primer lugar los avances rapidísimos que se producen en los años 60 y que resultan en 1971 en el establecimiento de las técnicas del ADN recombinante. Estas metodologías abren las puertas a la identificación de genes tanto en bacterias como en organismos superiores. Hacia 1980 se describen los primeros genes de plantas y por esta época ya se sabe cortar y pegar fragmentos de ADN de cualquier procedencia.

Cultivo de tejidos

Desde unos intereses científicos muy distintos, las metodologías de los cultivos *in vitro* de vegetales progresan enormemente. Eran conocidas desde tiempo atrás las propiedades de las plantas de regenerar organismos enteros a partir de partes separadas de ella. Entre los años 50 y 60 se establecen los métodos por los que se pueden cultivar en el laboratorio explantes de plantas y regenerar plantas enteras a partir de ellos. Desde entonces, una cantidad creciente de especies vegetales se propaga por estos medios, incluso a nivel industrial.

El estudio que presentamos en estas páginas es una colaboración de la Sociedad Española de Biotecnología.

DR. D. PERE PUIGDOMÈNECH

Profesor de Investigación. Departamento de Genética Molecular. Centro de Investigación y Desarrollo CID-CSIC, Barcelona

Fusión de protoplastos

De las células vegetales se pueden preparar protoplastos, que son células a las que se les ha eliminado la pared celular quedando en cierta manera en un estado similar a las células animales. Con los protoplastos se ensayan nuevas técnicas para la mejora de plantas, como pueden ser la fusión de protoplastos de especies distintas tratando de cruzar la barrera infranqueable de las especies que limita la mejora genética. Estas investigaciones no dan grandes resultados y en cualquier caso se trata de mezclar genomas enteros o grandes fragmentos de ellos.

Interacciones patógeno/planta

Otra línea de trabajo que contribuye de forma decisiva al establecimiento de plantas transgénicas son las investigaciones sobre las interacciones de patógenos con plantas. Se pueden mencionar los avances en el conocimiento de muchos virus de plantas pero, sobre todo, hay que destacar los estudios sobre el mecanismo de acción de un grupo de bacterias patógenas de plantas, los *Agrobacterium*, que son investigados por varios grupos tanto en Europa como en Estados Unidos. Entre las distintas agrobacterias, *Agrobacterium tumefaciens* resulta ser un organismo fascinante. Infecta plantas que han sufrido heridas: la infección produce un engrosamiento en la planta, conocido como "agalla", que es un verdadero tumor. De hecho, se descubrió que *Agrobacterium* transmite a la planta unos genes que producen este crecimiento desorganizado y, al mismo tiempo, otros genes que desvían el metabolismo de la planta hacia unas sustancias conocidas como "opinas", que son utilizadas por la bacteria para alimentarse. Por lo que se ve, *Agrobacterium* es un ingeniero genético natural. Una vez llegados a este resultado los investigadores se dedicaron a utilizar el mecanismo de *Agrobacterium* para introducir un gen cualquiera en las plantas y regenerar plantas normales pero con un gen más. El primer ensayo demostró que podían obtenerse plantas resistentes a un antibiótico. Esto es lo que se publicó en 1983.

Técnicas para la transformación genética de plantas

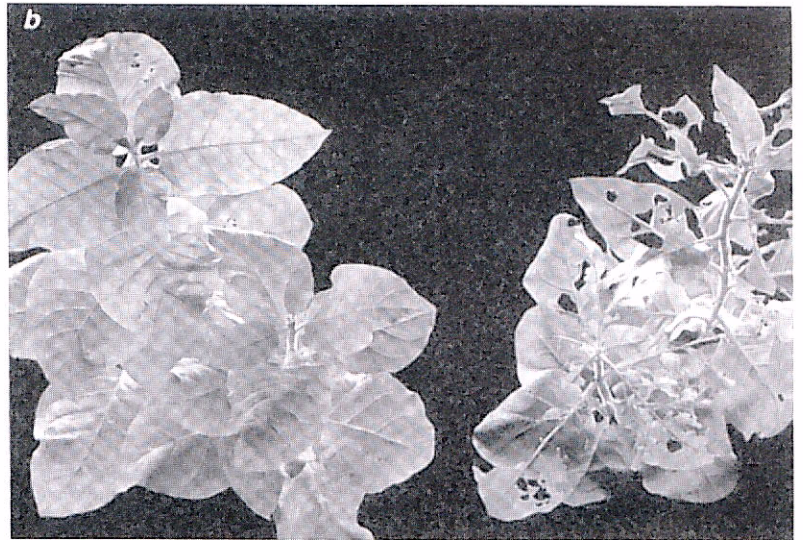
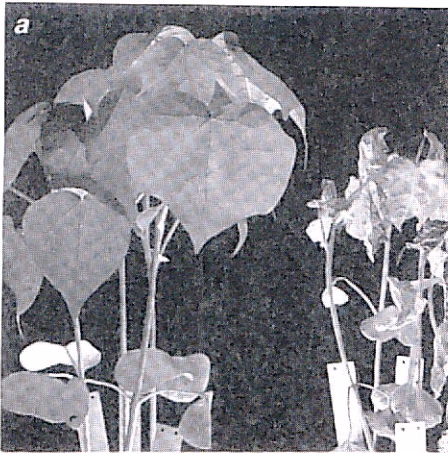
El uso de *Agrobacterium* es una de las técnicas más utilizadas hoy en día para obtener plantas transgénicas, pero no la única. En algunas especies se utiliza también la transformación de protoplastos, que consiste simplemente en incubar éstos con el ADN que se quiere introducir en la planta. Los protoplastos se tratan entonces con algún procedimiento que permeabiliza la membrana, por ejemplo, con pequeños impulsos eléctricos. De esta forma, el ADN entra en el protoplasto y se incorpora al genoma de la planta. El problema con los protoplastos una vez transformados es regenerar plantas a partir de ellos, algo que sólo sabe hacerse en algunas especies.

Una de las limitaciones de *Agrobacterium* es que tiene un rango limitado de especies en que se puede utilizar para la transformación de plantas.

Una alternativa surgió con la aparición del microbombardeo. Esta técnica se basa en un principio sencillo: sobre unas partículas de un metal inerte (tungsteno u oro, generalmente) se deposita el ADN que se desea introducir en la planta. Estas partículas son lanzadas a gran velocidad realmente disparadas sobre el tejido vegetal mediante distintos dispositivos que utilizan la presión de helio, una descarga eléctrica o un cartucho de pólvora. Las partículas a gran velocidad penetran en las células que encuentran a su paso. En las células que sobreviven, el ADN llega al núcleo celular y se incorpora a su genoma. Esta técnica tiene la ventaja de que, en principio, puede aplicarse a cualquier especie vegetal. Como puede verse de lo dicho hasta ahora, a finales de los 80 teníamos ya metodologías que permiten la introducción de genes en prácticamente cualquier especie vegetal.

Requerimientos para la expresión de los genes en las plantas transgénicas

Cualquiera que sea la técnica que se emplee en la transformación de una planta, el gen introducido tiene que ser funcional en la célula. Es decir, la célula debe reconocer esta nueva secuencia de su genoma como un gen propio y debe hacer que su maquinaria de expresión funcione adecuadamente. La expresión de los genes en todos los organismos vivos necesita de la transcripción del ADN en ARN, un proceso que requiere que diversos elementos o "factores" de la célula interaccionen con fragmentos del gen, en general en la zona de su inicio. Esto es lo que se llama el promotor del gen. El promotor determina la cantidad de ARN que se va a sintetizar a partir del gen y en qué condiciones. Por ejemplo, existen pro-



Plantas transgénicas. En ambas fotos la planta de la izquierda es la transgénica. A la derecha, la planta normal. Foto (a) Planta de algodón tolerante a los herbicidas. Foto (b) Planta de tabaco resistente a los insectos.

Las fotos son de La Redacción

motores que hacen que un gen se ponga en marcha sólo en el grano, o cuando la planta es atacada por un insecto. Para que funcione adecuadamente hay que dotar también al gen de una secuencia que indique la terminación de la transcripción. En resumen, en el laboratorio hay que realizar un trabajo de construcción del gen que se desea introducir en la planta. Este trabajo requiere poseer el gen, un promotor y un terminador adecuado. De la correcta elección de estos elementos resultará en gran manera el que la planta adquiera un nuevo carácter funcionando correctamente y que no afecte a ningún elemento positivo de la planta.

El elemento funcional del gen es la proteína, que es el producto de la traducción de la información que lleva el ARN mensajero. De la misma forma que se necesita que el gen funcione en el momento adecuado, también es preciso que la proteína actúe en el lugar apropiado. Entre otros, este lugar puede ser el núcleo celular, el cloroplasto, la vacuola o el espacio exterior a la célula. Hoy sabemos que el destino que tendrá la proteína dependerá de unos fragmentos determinados en su estructura que, añadidos a la proteína que queremos introducir en la célula, asegurarán que su destino en ella será el que esperamos.

Actualmente no es fácil predecir de forma precisa el nivel de expresión de los genes. Esto es en gran parte debido a que con las técnicas disponibles, el gen que se introduce puede colocarse en cualquier parte del genoma. También sabemos que pueden insertarse un número variable de copias del gen según la técnica empleada, lo que hace que el nivel final del efecto buscado pueda variar bastante. Esto tiene aspectos positivos y negativos. Los negativos son obvios, ya que sería

mejor poder predecir de antemano todos los parámetros de la planta transgénica buscada. Sin embargo, lo que se obtiene en general es una colección de plantas en las que los niveles de expresión del gen varía mucho. Esto puede ser positivo porque con ello, en realidad, tenemos una mayor variabilidad que puede ser conveniente para el proceso de mejora posterior de la variedad en el campo.

Estabilidad de las modificaciones genéticas

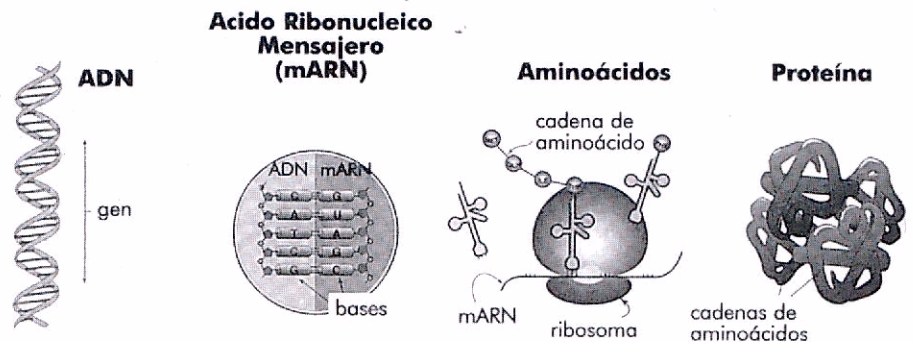
Durante todo este proceso de transformación hay que asegurar la estabili-

dad del gen introducido; sin embargo, a veces ocurre que al cabo de un número de generaciones el gen se silencia, con lo que el carácter que se ha introducido desaparece. En el campo hay que ensayar que el nuevo carácter introducido funciona como previsto y que esto lo hace a través de las sucesivas generaciones de semillas. Es éste un importante trabajo que demuestra que la intervención del mejorador genético "clásico" es esencial antes de llegar al mercado una variedad "transgénica".

Tipos de transformaciones

Las construcciones genéticas que

Síntesis de una proteína



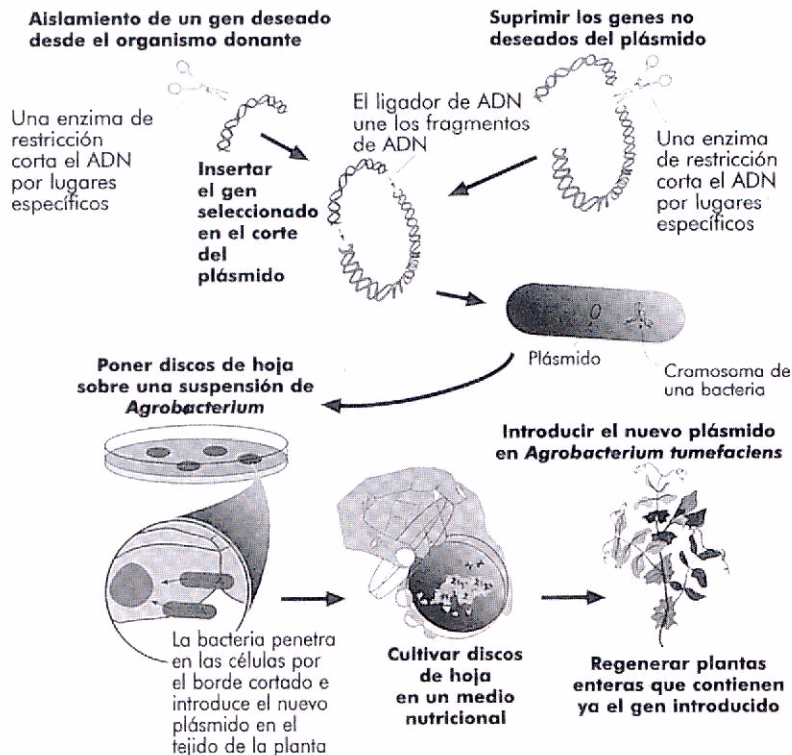
El ADN determina las características hereditarias dirigiendo la información de determinadas proteínas.

El fragmento de ADN que lleva las instrucciones precisas para producir una proteína concreta se llama "gen".

El ADN opera a través de un intermediario, el ARN. La secuencia de bases en la molécula de ADN actúa como modelo para la producción del ARN mensajero (mARN).

El mARN se une a los ribosomas, donde dirige la producción de la proteína que codifica. Tres bases de mARN en fila especifican cada uno de los aminoácidos a añadir a la proteína.

La(s) cadena(s) de aminoácidos de la(s) que provienen las proteínas, dan lugar a precisas estructuras tridimensionales que contribuyen a fijar las propiedades y función de las proteínas.



Agrobacterium infecta de forma natural algunos tipos de plantas e introduce un ADN nuevo en ellas. Los biólogos utilizan formas especialmente diseñadas de Agrobacterium para modificar plantas genéticamente.

se hacen, dependen del efecto que se quiera obtener. En principio podemos distinguir dos posibilidades. Podemos pretender introducir un nuevo carácter en la planta y, por ello, lo que interesa es que el gen se exprese. Pero puede también interesar suprimir la expresión de un gen.

Por ejemplo, una de las primeras variedades vegetales en llegar al mercado fue un tomate que tenía retardado su proceso de maduración. Para ello, la construcción que se realizó suprimía la acción del etileno, que es la hormona que controla la maduración del fruto. En este caso, lo que interesa es rebajar o anular la expresión del gen que codifica para la proteína que produce el etileno, con lo que la maduración no se produce. Lo que se expresa, pues, no es el gen mismo, sino su misma secuencia pero en sentido inverso: es lo que se llama un gen antisentido. Se supone que el ARN producido en este caso se une al ARN del gen, los mecanismos celulares se encargan de degradar el complejo suprimiendo de esta manera su expresión.

Finalmente puede interesar simplemente expresar el gen fuera de su lugar normal de expresión, lo que puede hacerse cambiando el promotor. En cualquier caso podemos ver que, aparte de sus aplicaciones agrícolas, las plantas transgénicas son un extraordinario instrumento para estudiar cómo funcionan los genes en plantas. En la actualidad estamos reescribiendo muchos de los conceptos que creíamos saber de fisiología vegetal. También estamos comenzando a cono-

cer los mecanismos que controlan el crecimiento y desarrollo de las plantas, por ejemplo, por qué se forman las flores y cómo se controla su formación. Gracias a las plantas transgénicas sabemos ahora muchísimas cosas sobre los genes de plantas y cómo se regulan.

Cómo se transforma una planta

De lo dicho anteriormente ya se puede deducir lo que es necesario para conseguir una planta transgénica. Por una parte hay que decidir el método de transformación que se empleará. Ello puede depender de diversos factores que pueden ir desde consideraciones de patentes hasta el número de copias que se quiere insertar del gen que se desea introducir o de la experiencia del laboratorio. La especie con la que se quiere trabajar es en cualquier caso determinante. Por ejemplo, muchos cereales no podían transformarse con *Agrobacterium* hasta fechas recientes, lo que imponía el uso del bombardeo o la transformación de protoplastos como técnicas disponibles.

Si la transformación se realiza usando *Agrobacterium*, la construcción genética con que se desea transformar tiene que ser transferida a la bacteria. Actualmente, este proceso se realiza fácilmente gracias al uso de los que se conocen como vectores binarios que permiten realizar el trabajo de construcción en *Escherichia coli*, una bacteria en la que las técnicas de ADN recombinante se llevan a cabo normalmente. Luego se pasa la construcción genética

obtenida al *Agrobacterium*. Una vez hecho esto, se infectan con la bacteria células de planta en cultivo, por ejemplo, un disco de hoja. Tras un tiempo apropiado se elimina la bacteria que habrá hecho su trabajo de transformación. Tras este proceso hay que regenerar la planta, pero sólo interesa regenerar aquellas plantas que lleven el nuevo gen incorporado.

Gen auxiliar o de selección

Para ello, en la construcción genética se suele incluir también un gen auxiliar que confiere a las células transformadoras una ventaja selectiva, cuando se colocan en un medio apropiado. Como genes de selección, suelen utilizarse genes de resistencia a antibióticos o a herbicidas con promotores adecuados. Este proceso da lugar a plantas que pueden ya pasarse a tierra en el invernadero.

Si la técnica que se desea utilizar es el microbombardeo, el proceso es más sencillo en su inicio, ya que el ADN que contiene la construcción genética se amplifica directamente en *Escherichia coli*. Para ello el ADN de la construcción está incluido en un plásmido, que no es otra cosa que un ADN circular que puede existir de forma independiente y en muchas copias en la bacteria. Estos plásmidos suelen incluir en ellos un gen de resistencia de bacteria a un antibiótico: en general, la ampicilina. Este gen es necesario para que sólo sobrevivan las bacterias que lo contienen y conseguir así una cantidad suficiente del ADN que se quiere introducir en la planta. En la construcción hay que incluir también un gen que produzca una ventaja a las células vegetales transformadas sobre las no transformadas. Esta ventaja suele ser una resistencia a un antibiótico o un herbicida. Una vez bombardeado el cultivo vegetal determinado, se deja el cultivo recuperarse del choque producido, luego se aplica una selección para que sólo sobrevivan las células transformadas y finalmente se regeneran las plantas como en el caso de la técnica que emplea *Agrobacterium*.

Sea cual sea la técnica empleada, con las plantas producto de transformación debe, en primer lugar, demostrarse que están efectivamente transformadas, es decir, que contienen el fragmento de ADN que se quería introducir y sólo éste, y en segundo lugar, que expresen el gen con el que han sido transformadas. Finalmente, habrá que observar si su comportamiento en el campo es el esperado. En cualquier caso, la etapa final es la de introducir la nueva variedad en el programa de mejora de la especie. El agricultor desea tener una planta con las propiedades agronómicas que ya poseía y,

además, el nuevo carácter que se ha introducido mediante las técnicas de la biología molecular. Por esta razón la etapa final es la decisiva, la que va a demostrar la utilidad de todo el proceso.

Qué queda por hacer

Doce años después de que se publicara en una revista científica la obtención de la primera planta transgénica, llegaron al mercado las primeras variedades transformadas. Ello quizá pareció a algunos un tiempo largo pero, teniendo en cuenta los tiempos en los que se desarrollan normalmente los programas de mejora, es un período muy corto.

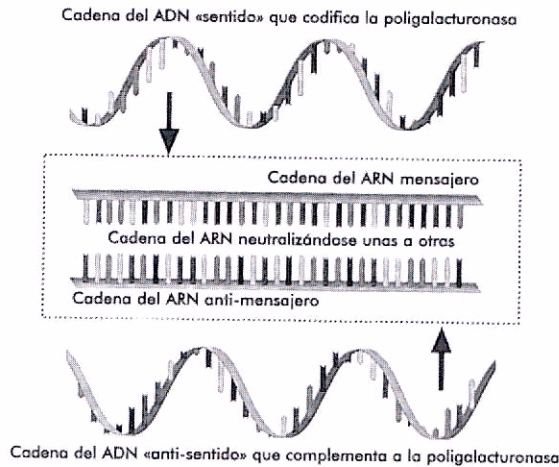
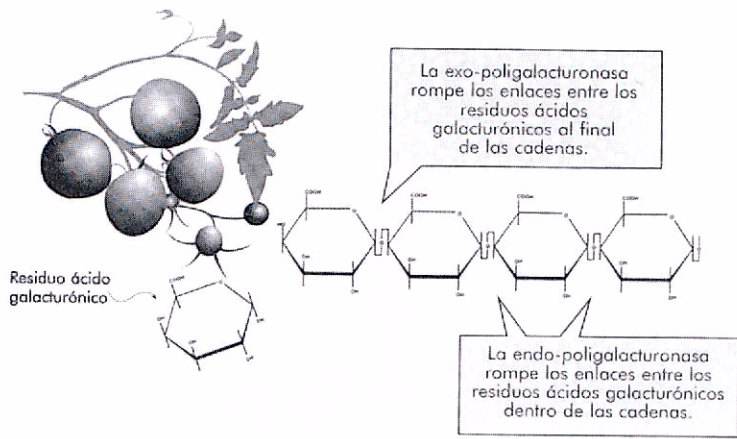
Ello quiere decir que estas variedades son una primera generación de plantas transgénicas y que, por tanto, queda probablemente un largo recorrido por realizar.

Podemos considerar unas cuantas cuestiones que determinarán los logros futuros.

Si bien es cierto que hoy se puede transformar prácticamente cualquier especie vegetal, hay que precisar que se necesita aumentar la eficiencia de transformación en algunas especies importantes (incluyendo los cereales), o conseguir rendimientos significativos en otras (por ejemplo muchas leguminosas, girasol o pimiento) que todavía son recalcitrantes a la transformación o a la regeneración. Se ha conseguido recientemente, por ejemplo, que *Agrobacterium* transforme los cereales. Es ésta una alternativa al bombardeo que puede ser interesante en muchos casos.

Las construcciones génicas que se realizan por el momento son relativamente simples. Por una parte, utilizan promotores fuertes y en general constitutivos, es decir, que se expresan en todas las partes de la planta. Los datos de campo no parecen indicar que ello sea un grave inconveniente para el rendimiento de las variedades, pero sería mejor utilizar otro tipo de promotores, ya que la mayor parte de los genes de cualquier organismo tienen una regulación más precisa de la que permiten los promotores constitutivos. Además, los elementos génicos que se están obteniendo gracias a la intensa investigación que se lleva a cabo, pueden permitir que el gen se exprese sólo en los órganos y en las condiciones en los que son útiles, sin aparecer en otras zonas de la planta que pueden ser las dirigidas al consumo. Para todo ello, hace falta mucho trabajo en profundidad en nuestro conocimiento de la regulación de genes de plantas.

Por otra parte, la llegada al mercado de las primeras plantas transgénicas ha levantado cuestiones que no parecían



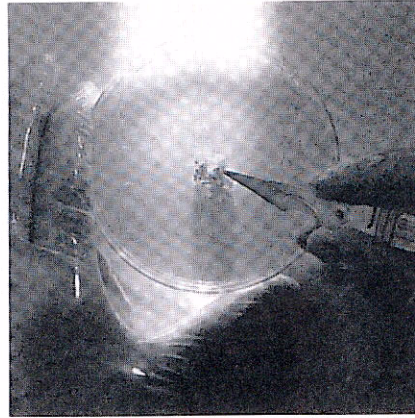
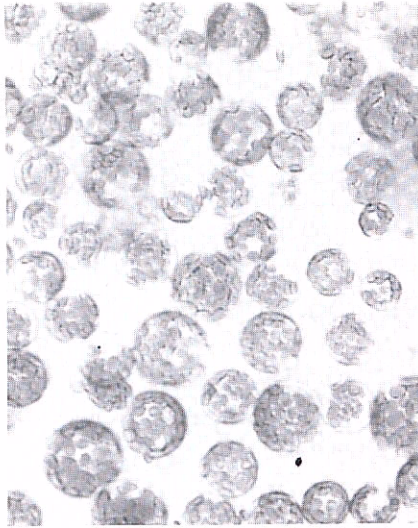
La "pectina" es un componente esencial de muchas frutas. Es naturalmente descompuesta por las enzimas poligalacturonasas. La tecnología antisentido puede usarse para "neutralizar" la producción de poligalacturonasas, retrasando el reblandecimiento de la fruta una vez que ha sido recogida.

importantes pero que se han vuelto irrelevantes. Ya se ha dicho que para la amplificación del ADN que se utiliza normalmente en las técnicas de bombardeo, se utilizan genes de resistencia o antibióticos. También se ha dicho que, para las técnicas de regeneración se utilizan a menudo genes de resistencia a antibióticos o a herbicidas. La presencia de estos genes ha sido considerada negativa por algunas comisiones reguladoras del uso de los transgénicos. De cara a tener plantas transgénicas sin estos elementos, pueden diseñarse sistemas en los que la limpieza final del gen introducido sea absoluta. Por ahí hay también un trabajo metodológico que puede ser de interés y que ya está dando resultados en microorganismos.

Una de las limitaciones que tienen las actuales técnicas de transformación de plantas, es la de no disponer de un sistema de eliminación completa de la actividad de los genes. Ya se ha explicado que existe la posibilidad de utilizar la aproximación de los genes antisentido; sin embargo, no se consigue de esta forma anular al 100% la actividad de los genes. En levaduras hay métodos que permiten reemplazar un gen por otro del que comparte una buena parte de su secuencia.

En animales hay técnicas de "knock-out" que destruyen un gen preciso en ratón. Nada de esto es factible en la actualidad en plantas. Es posible que los mecanismos de recombinación homóloga, que son los que gobiernan estos procesos, sean distintos de los que existen en levaduras o animales o que sean mucho menos eficientes. Es ésta la deficiencia, en las actuales posibilidades ofrecidas por las técnicas moleculares en sistemas vegetales, que sería interesante resolver en un futuro. Hay que tener en cuenta en cualquier caso que, a falta de un sistema de recombinación homóloga apropiado, se han desarrollado en plantas sistemas eficientes de etiquetado de genes utilizando alguno de los elementos móviles disponibles, como los llamados transposones, retrotransposones o el mismo ADN I que *Agrobacterium* transmite a las plantas.

Este etiquetado significa que los elementos móviles pueden saltar sobre un gen de interés paralizándolo de esta manera su actividad, lo que permite observar qué ocurre en la planta cuando este gen no funciona. Estos métodos deberán tener una gran importancia en un futuro próximo, especialmente cuando se conozcan de manera completa los genomas de plantas.



A partir de protoplastos (foto a la izquierda), células del tejido foliar, se ha conseguido en algunos casos regenerar plantas completas (foto a la derecha) después de una modificación genética.



(Izquierda). Degustando tomates transgénicos, de la empresa Calgene, California. En la Unión Europea tenemos Normas para el etiquetado de alimentos transgénicos: El 26 de mayo 1998 los ministros de agricultura de la Unión Europea acordaron que los productos que contengan maíz o soja genéticamente modificados deberán llevar el etiquetado "Producto genéticamente modificado".

Esto permitirá ir disponiendo de genes cada vez más interesantes. Grandes áreas del metabolismo de las plantas, de sus mecanismos de defensa y de desarrollo, no se conocen todavía. Poco a poco se va disponiendo de herramientas como las que se han mencionado y sobre todo colecciones completas de genes.

Estas son, por una parte, las colecciones de fragmentos de genes procedentes de la secuencia sistemática de cADNs, es decir, de ADN sintetizados a partir de ARNs mensajeros. En especies como *Arabidopsis*, maíz o arroz, poco a poco estas colecciones sobrepasan las decenas de miles de secuencias disponibles ya sea en bancos de datos públicos o privados.

La primera secuencia del genoma completo de una planta, uno de los más pequeños conocidos, el de la planta *Arabidopsis thaliana*, se terminará hacia el año 2004. A partir de ese momento, en las bases de datos habrá una enorme información sobre los aproximadamente 20 ó 30 mil genes que definen una especie vegetal. Esta información de *Arabidopsis* se irá extendiendo al conjunto de plantas conocidas. Hasta qué punto esto es posible es también el objeto de investigaciones actuales. A ello debemos añadir la información que está obteniéndose de otras especies, en particular, de bacterias y otros microorganismos y las posibilidades de producir genes sintéticos. Todo ello nos conducirá a una situación de enormes consecuencias para la mejora genética de plantas en el próximo siglo.

Investigar la función de los genes, su manejo y sus consecuencias y saber aprovecharlo para el beneficio de nuestra sociedad será la tarea de todos en el próximo futuro. ●



Después de la modificación genética se consiguen plantas completas con nuevas propiedades, por ej.: resistencia a los herbicidas, maduración más lenta.