

TERCERA ÉPOCA - ANY XXII
NÚM. 323 - JUNY 1990

NPQ

NOTÍCIES PER A QUÍMICS



INGENIERÍA GENÉTICA DE PLANTAS: DISEÑO DE LOS CULTIVOS DEL FUTURO

PEDRO PUIGDOMÉNECH

Prof. de Investigación del CID (C.S.I.C.)

Departamento de Genética Molecular, Centro de Investigación y Desarrollo de Barcelona. C.S.I.C. Barcelona.

INTRODUCCIÓN

Las proyecciones americanas acerca del mercado mundial de productos de la biotecnología hacen prever que entre un 25 y un 40% de este mercado hacia el año 2000 corresponderá a aplicaciones en la agricultura. Únicamente el mercado de aplicaciones farmacéuticas tendría un volumen superior a éste. En estas previsiones agrícolas se incluyen aplicaciones veterinarias que con la congelación de embriones, microinyección de óvulos fecundados y producción de vacunas representará sin duda una buena parte de este mercado. Sin embargo, las aplicaciones a sistemas vegetales pueden afectar directamente en diferente medida a las industrias de las semillas, de abonos o pesticidas e indirectamente a las industrias farmacéuticas, químicas y de la alimentación. Por ello no es de extrañar que las multinacionales de estas áreas hayan invertido sumas considerables en poner a punto estas nuevas tecnologías.

Las actuales técnicas, desarrolladas a una creciente velocidad en los últimos cinco años, pueden permitir el desarrollo de variedades con propiedades que afecten el consumo de productos para la agricultura. Es posible que se consigan variedades que necesiten un menor consumo de abonos (un mercado de 10.000 millones de dólares en 1983 sólo en USA), una mayor resistencia al stress y al ataque de patógenos, insectos o hierbas (que representan una pérdida media de más de un 40% de la producción agrícola más unos costes de 4.500 millones de dólares en pesticidas en 1983 sólo en USA) o la obtención de variedades de plantas que presenten un valor nutricional incrementado o que produzcan sustancias de interés económico en cantidades interesantes. Por otra parte estas técnicas pueden tener a corto plazo un impacto importante en la industria de semillas con unas ventas de aproximadamente 20.000 millones de dólares en el mundo en 1982 y con un crecimiento anual de entre un 3 a un 5%. Por todo ello se comprende la respuesta de un vicepresidente de Hoffman-La Roche preguntado acerca de las razones de su empresa por entrar en las técnicas más avanzadas de la biotecnología: "Es arriesgado no estar en este negocio".

Hace decenas de miles de años que el hombre hace biotecnología con las plantas. Tanto es así que algunas de

las especies que hoy día utilizamos han sido tan manipuladas que ignoramos incluso con certeza como era la planta salvaje. Es el caso del maíz, por ejemplo. Las técnicas utilizadas de forma empírica durante siglos han adquirido una gran eficacia con el advenimiento de la genética como ciencia. Gracias a las técnicas de la mejora genética la producción por hectárea de cultivos como el maíz se ha multiplicado por cuatro en sólo cuarente años y gracias a la introducción de variedades mejoradas de trigo un país como la India con déficits de cereales tradicionales se ha convertido en exportador neto. Esta tecnología que podríamos denominar "clásica" no está agotada ni mucho menos, en particular en lo que respecta a su aplicación a nuevas especies. En realidad las especies vegetales que tienen una importancia económica en la actualidad no son más de treinta y sobre todo cuentan en el mercado mundial los cereales y las leguminosas, es decir, una docena de especies. Se comprende el interés actual por explorar especies distintas, en particular las procedentes de climas tropicales, tanto por su interés en la alimentación de los pobladores de esas zonas como por la posibilidad de utilizar sustancias que son sintetizadas por ellas.

Entre lo que podemos denominar técnicas clásicas, en el sentido de que no utilizan la tecnología del DNA recombinante, debemos mencionar los cultivos celulares, la utilización de protoplastos, los cultivos de células en suspensión y los cultivos en ambiente controlado como otras tantas tecnologías cuya utilización sistemática va a tener una influencia decisiva en los cultivos del futuro. Sin embargo ninguna de ellas introduce variaciones dirigidas en la dotación génica de las especies tratadas. En estos casos se realiza una utilización a fondo la variabilidad espontánea o provocada de las especies. Ello permite comprender la gran importancia que todas las naciones están dando a la conservación de variedades, los denominados bancos de germoplasma, y a que estos bancos estén accesibles a todos. Con el desarrollo de la tecnología del DNA recombinante en la actualidad podemos introducir en las plantas genes de procedencia externa ya sea de otras plantas, de animales o bacterias o incluso sintéticos, con ello la variabilidad que podemos introducir en ellas, no tienen más límite que el de la imaginación humana. De ahí la atención de quienes trabajan con plantas hacia las técnicas de la ingeniería genética.

La fermentación alcohólica es de las que más productos diferentes pueden llegar a producir. En nuestra latitud la producción de vino, cava y cerveza son las de más tonelaje. En otros países menos cálidos tiene mayor importancia la producción de otras bebidas obtenidas directamente por fermentación (shake) o por destilación de las anteriores, como es el caso del whisky, ginebra, vodka, brandy, cognac, etc.

Los derivados lácticos (quesos, yogurt, etc.) tienen una gran aceptación en nuestra sociedad, en parte debido al exceso de leche en Europa.

Otro producto de gran producción, aunque en menor volumen que los anteriores, son las levaduras panificadoras. Otra actividad que ha llegado a ser industrial es el cultivo de hongos, tales como champiñones, pleurotus, leutinus, etc. Los aditivos condimentarios, tales como estabilizantes (ac. láctico, ac. cítrico), saborizantes (glutamato, aspartato, ...), esencias, espesantes (almidón, polisacáridos) son productos cada vez más utilizados en preparados comerciales denominados bajo el adjetivo de "cocina rápida".

En el apartado de alimentación animal, los piensos obtenidos a partir de hidrolizados de proteínas de microorganismos son procesos actualmente totalmente desarrollados y competitivos frente a los piensos clásicos a partir de forrajes.

SECTOR AGRÍCOLA

A título de recuerdo sólo se nombrará la producción de antibióticos, vacunas y proteína microbiana, por ser los productos de mayor tonelaje. Los nuevos productos en este sector son los bioinsecticidas de origen biológico; siembra de semillas infectadas con *Rhizobium sp.* (bacterias capaces de fijar el nitrógeno atmosférico) creando nuevas simbiosis con plantas no leguminosas; producción de abono mediante lombrices rojas de California (las lombrices son capaces de producir un abono peletizado de alta calidad a partir de la fracción orgánica de los residuos sólidos urbanos), además de ser ellas la materia prima de la proteína empleada en piensos animales; mejora de la genética tanto animal como vegetal; mejor conservación de las cosechas (conservación en silos con atmósfera inerte); y mejoras en la zootecnia (ganadería, piscicultura) entre otros temas de menor importancia.

SECTOR DE SERVICIOS

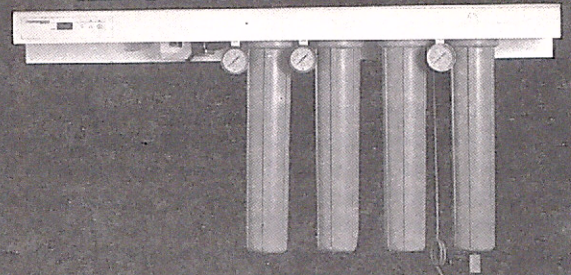
El proceso biotecnológico que mueve mayores volúmenes de materia son los de depuración biológica de residuos. De los diferentes residuos, el de mayor volumen es el de aguas residuales urbanas e industriales. Se han desarrollado procesos de alto rendimiento, tanto aerobios como anaerobios, para su depuración. Los procesos más extendidos son: aireadores, estanques de oxidación, cultivos bacterianos, método de contacto, etc. En sí, la eliminación de residuos, es un proceso en que se consume energía en la mayoría de los casos, únicamente en los procesos muy integrados en los que se produce biogás y el residuo es procesado para abono puede compensar económicamente. Le sigue en tonelaje el tratamiento de los

residuos sólidos, tanto urbanos como industriales. Aunque el proceso más utilizado en la actualidad en nuestro país sigue siendo el vertido controlado, existen métodos alternativos, como es el de reciclaje de materias primas, el compostaje o el vertido con recuperación de energía (digestión anaerobia).

Los beneficios de la eliminación de residuos no son tangibles directamente, sino a través de la mejora de la calidad de vida y de la conservación del medio ambiente, sin perder por ello potencial económico ni industrial.

Debido a la gran importancia que tienen los procesos de gestión de residuos, se pasará, en posteriores artículos de esta misma serie de grandes aplicaciones, una cumplida revisión a los procesos existentes más utilizados, tanto para residuos líquidos como sólidos.

APARATOS PRODUCCION AGUA ULTRAPURA TIPO I GRADO REACTIVO



SATION 9000

Agua ultrapura exenta de sales materia orgánica, bacterias y pirógenos (agua tipo I según ASTM, CAP y NCCLS).



SATION, S.A. Luchana, 77
08005 Barcelona - ESPAÑA
Tel. (93) 300 75 13
Telex 97200 STHC-E
Fax (93) 309 33 64

LA TRANSFORMACIÓN DE VEGETALES

Si las predicciones sobre las aplicaciones de las técnicas más avanzadas de la biotecnología son tan optimistas ello es debido al avance espectacular de estas tecnologías en los últimos años. En particular hay que destacar los avances en las técnicas de transformación de vegetales. Se trata de la introducción en las plantas de genes previamente clonados. Esto quiere decir que es posible introducir en plantas fragmentos de DNA de procedencia cualquiera para tratar de hacerlos funcionar en sus células. El éxito de tales técnicas se debe a dos factores. Por una parte a que introducir DNA en células vegetales ha demostrado ser más fácil de lo que podía preverse a priori y por otra parte a que si bien no es posible obtener un animal adulto a partir de una célula en cultivo sí es posible hacer esto en los vegetales: es posible regenerar plantas normales a partir de células en cultivo. Las técnicas de regeneración de plantas a partir de cultivos es uno de los temas de la comunicación siguiente.

Introducir DNA en células vegetales puede hacerse por varias técnicas distintas. En algunos casos estas técnicas son comunes a las utilizadas en sistemas animales. Se trata de la microinyección y de la transformación directa. La microinyección consiste en la introducción en una célula, generalmente en su núcleo, de una pequeña cantidad de una disolución que contiene el DNA con el que se quiere transformar la célula. La transformación directa de las células se consigue precipitando DNA sobre un cultivo celular gracias a un agente como el polietilenglicol o el fosfato cálcico. Una forma de aumentar la eficiencia de la transformación directa consiste en someter la células a una descarga eléctrica que produce poros en su membrana celular, es la llamada técnica de la electroporación. La transformación directa de protoplastos se ha demostrado viable para un gran número de especies incluyendo los cereales, habiéndose publicado recientemente la transformación de protoplastos de maíz, la regeneración de plantas a partir de estos protoplastos no se ha conseguido todavía. Hay que tener en cuenta que la transformación directa así como en muchos casos la microinyección debe realizarse no sobre células vegetales sino sobre protoplastos, células a las que se les ha digerido la pared celular. Las técnicas de preparación de protoplastos viables y de regeneración de plantas a partir de ellos están por el momento disponibles para un pequeño número de especies vegetales. La microinyección tiene una alta eficiencia de transformación pero es una técnica laboriosa, la electroporación, pasa necesariamente por la preparación de protoplastos; es de baja eficiencia pero puede hacerse muy fácilmente y sobre cantidades relativamente grandes de células. La viabilidad de la técnica de transformación directa ha sido demostrada en los últimos meses y la microinyección está siendo probada en varios laboratorios sin que por el momento haya sido completamente demostrada su viabilidad.

Una alternativa al uso de las técnicas anteriormente descritas es el uso de los vectores naturales de transformación, una de las alternativas es el uso de virus. Unos pocos virus vegetales tienen su genoma en forma de DNA de doble cadena. De ellos los caulimovirus y en particular el virus del mosaico de la coliflor han sido estudiados ex-

tensamente. Su manipulación "in vitro" es muy simple y la transformación de plantas muy eficaz y sencilla. Sin embargo los estudios realizados con este virus demuestran que su utilización como vector puede presentar problemas de difícil solución. En particular estos vienen por una parte de su limitado espectro de infección, las crucíferas, en el caso del virus del mosaico de la coliflor, y sobre todo por otra parte del hecho de que por las condiciones de su encapsidación sólo es posible introducir fragmentos muy pequeños de DNA en la planta, del tamaño de genes pequeños. Se ha conseguido transferir a una planta el gen de resistencia a un antibiótico. Una última desventaja es que estos virus no parecen integrarse en el genoma y en una parte de su ciclo de replicación utilizan al parecer una transcriptasa inversa la cual produce un número elevado de errores en las secuencias no esenciales para su replicación. A pesar de estos inconvenientes los virus de DNA, caulimovirus y también geminivirus, virus de DNA de una sola cadena, continúan siendo explorados como posibles vectores de transformación.

La transformación de vegetales tiene una alternativa muy favorable. Se trata de la utilización de las propiedades de oncogénicas de los plásmidos de las especies de *Agrobacterium*. Se trata de bacterias del suelo, *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes* las cuales producen tumores al infectar plantas heridas. Se ha demostrado que estos tumores aparecen debido a la producción de hormonas vegetales que está dirigida por genes que se hallan en plásmidos de la bacteria. Estos plásmidos, denominados Ti o Ri, poseen una parte de su DNA, el DNA T, que es transferido a la planta integrándose en su genoma nuclear. Los plásmidos Ti han sido ampliamente manipulados para conseguirse una transformación eficaz de las plantas y que pueden regenerar plantas normales tras su transformación. Es posible manipular fragmentos de los plásmidos Ti en *Escherichia coli* para insertar en el DNA T el gen que se desee introducir en la planta, traspasar el plásmido Ti modificado a *Agrobacterium* y dejar que los mecanismos de infección de esta bacteria actúan para transferir el DNA a la planta. Se ha demostrado que con esta metodología pueden regenerarse plantas con apariencia normal que contienen de forma estable y funcional genes de cualquier origen, bacteriano, vegetal o animal. De esta forma se han conseguido plantas que contienen genes de resistencia a antibióticos o a herbicidas, genes del interferón humano o de heat-shock de *Drosophila* y que expresan y responden adecuadamente a su inducción natural, genes de otras plantas que conservan su capacidad de ser inducidos por la luz o que se expresan únicamente en la hoja o en el grano, etcétera. *Agrobacterium* se ha convertido de esta forma en el mejor "ingeniero genético" de plantas de que se dispone. Una ventaja de *Agrobacterium* es que puede infectar protoplastos pero también plantas adultas o células en cultivo. Posee también desventajas que son en particular el espectro relativamente limitado de su acción. *Agrobacterium* infecta fundamentalmente a la dicotiledóneas con lo que plantas de gran interés económico como los cereales quedan fuera de su campo de acción aunque ya se ha demostrado la transformación de alguna monocotiledónea y la manipulación de los plásmidos Ti para ampliar su espectro de infección continúa. El uso de *Agrobacterium* ha hecho que

sean las células vegetales de las especies adecuadas uno de los sistemas más fáciles de transformar que se posee.

Un último elemento cuya utilidad en la transformación de vegetales se está explorando son los transposones. Desde el descubrimiento en los años 40 de estos genes capaces de saltar entre distintas posiciones en el genoma su aislamiento físico es hoy una realidad. Los transposones han sido una herramienta de gran utilidad en la transformación de embriones de animales, en particular en *Drosophila*. Su aislamiento en el maíz desde hace dos años posibilita su utilización en las plantas en combinación con alguna de las técnicas de transformación anteriormente descritas. Su utilidad real en estos sistemas debe todavía demostrarse.

Gracias al uso de la transformación con el sistema *Agrobacterium* se ha conseguido introducir genes exógenos en el genoma nuclear de plantas. Un caso aparte lo ocupa el genoma cloroplástico o mitocondrial. Las técnicas de cultivos celulares y fusión de protoplastos permiten la obtención de híbridos celulares entre especies o variedades en las que el núcleo procede de una de ellas y el cloroplasto o la mitocondria de otro. Una cuestión distinta es la transformación de estos orgánulos con DNA previamente aislado. Un trabajo sobre la transformación de cloroplasto ha sido publicado aunque esta transformación es inestable y es necesaria la presencia continua de antibiótico para mantenerla. Lo que sí se ha conseguido es hacer funcionar el sistema de transporte de proteínas integradas en el genoma nuclear hasta el cloroplasto construyendo un polipéptido híbrido que contiene la señal que dirige la proteína hasta el cloroplasto y la proteína que se quiere introducir en él. La modificación del contenido proteico del cloroplasto es de una gran importancia teniendo en cuenta su papel decisivo en la transformación de la energía en las plantas y que en él residen algunas de las resistencias a herbicidas.

Si bien la técnica de transformación de vegetales, en particular gracias al uso de los plásmidos de *Agrobacterium*, ha sido desarrollada con gran éxito y ha aportado ya informaciones importantes sobre el funcionamiento de los genes en vegetales no es menos cierto que no hay producto alguno en el mercado que provenga de su uso. Los primeros permisos para el ensayo en el campo de plantas con tolerancia a herbicidas obtenida con estas tecnologías están sobre la mesa de las agencias americanas y se supone que no encontrarán los problemas del uso de bacterias manipuladas. La modificación del genoma de plantas para incrementar la resistencia a herbicidas, a infecciones, para aumentar el contenido en algún factor de importancia para el valor económico de las plantas, para modificar el metabolismo secundario de plantas de forma a incrementar la producción de alguna sustancia concreta, o para que cultivos celulares en suspensión o plantas enteras produzcan alguna sustancia de interés industrial o farmacéutico son algunas de las tendencias actuales en los laboratorios de biotecnología avanzada.

LA MANIPULACIÓN DE BACTERIAS

Si la transformación de vegetales superiores es ya un hecho, no lo es menos que la mayoría de los estudios de

ingeniería genética se llevan a cabo a través de la manipulación de bacterias. En sistemas vegetales esto tiene una gran importancia desde distintos puntos de vista. Es importante tener en cuenta que las técnicas de transformación no son de ninguna utilidad si no hay genes con los que transformar la planta o si una vez el gen introducido en el vegetal se expresa sin un tipo de regulación apropiado o perturba de forma importante el metabolismo de la planta. Son por tanto tareas esenciales en el momento presente profundizar en el conocimiento de como funcionan los genes en los sistemas vegetales y acumular genes aislados de interés ya sea para transferirlos a otras especies, para ser modificados o para entender como funciona el metabolismo de los sistemas que se pretenden modificar. Para ello la biología molecular actual posee las herramientas esenciales del clonaje molecular en bacterias. Estas técnicas no difieren en lo esencial cuando son aplicadas en vegetales respecto a cuando son aplicadas en animales. Es cierto sin embargo que la investigación en los sistemas vegetales lleva varios años de retraso con respecto a los sistemas animales aunque el éxito de las técnicas de transformación han atraído hacia las plantas a un número creciente de grupos y de inversiones.

Aparte del interés básico del uso de las técnicas de clonación en bacterias y de su carácter de etapa esencial en la manipulación de las células superiores existen algunas aplicaciones importantes de estas técnicas. Alguna de las más evidentes proceden de la posibilidad de detectar con enorme sensibilidad secuencias de DNA o RNA cuando éstas han sido previamente clonadas. Las sondas de DNA para la detección de virus comienzan a ser utilizadas en sistemas animales, esto puede ser también una realidad en virus de vegetales. Con igual facilidad puede detectarse la presencia de genomas de diversas especies en una variedad determinada de carácter híbrido. Asimismo si se dispone de sondas de DNA adecuadas pueden determinarse polimorfismos en genes concretos que ayuden tanto en la definición de variedades como para el mejorador genético en el seguimiento de caracteres génicos bien definidos.

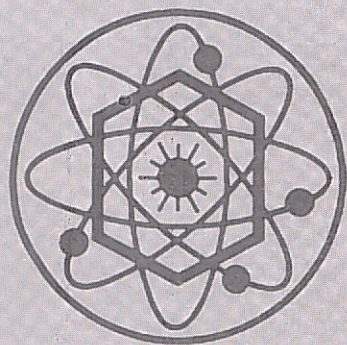
Es también de gran interés la manipulación de bacterias que viven en simbiosis con especies vegetales. El caso de las bacterias que han sido modificadas para evitar los efectos de las heladas es bien conocido. Un ejemplo de una importancia muy superior son las bacterias que intervienen en la fijación del nitrógeno atmosférico. De entre ellas, las del género *Rhizobium* viven en simbiosis con las leguminosas. Varios laboratorios están trabajando en la posibilidad de que mediante su manipulación sea posible adaptarlas a una simbiosis con otro tipo de especies. Igualmente otras especies bacterianas que pueden vivir en contacto con especies vegetales de interés económico están siendo modificadas para introducir en ellas genes de fijación del nitrógeno o para optimizar los que ya poseen. No hace falta destacar el efecto sobre el mercado de abonos nitrogenados que experimentos de este tipo realizados con éxito pueden tener.

Para terminar hay que hacer notar que las técnicas de ingeniería genética en plantas requieren unos apoyos externos decisivos. Por una parte su éxito depende de la disponibilidad de unas adecuadas metodologías que permi-

tan la obtención de plantas útiles en el campo. Entre éstas hay que destacar los cultivos "in vitro" y la mejora genética clásica sin las cuales la planta obtenida en el laboratorio difícilmente pueda llegar al campo. Por otra parte es posible que sea preciso en los casos de plantas altamente manipuladas su crecimiento en ambientes controlados con lo que las técnicas de los cultivos de células en suspensión o de cultivos bajo cubierta pueden ser esenciales. Todo ello nos indica que en el estado actual de las técnicas las aplicaciones de la ingeniería genética a sistemas vegetales es posible tengan interés por una parte como técnicas de apoyo a la mejora genética y por otra sean aplicables cuando el valor añadido que se obtenga sea suficientemente importante. En cualquier caso los posibles resultados pueden incidir de forma importante en multitud de campos relacionados con la agricultura.

SELECCIÓN DE BIBLIOGRAFÍA

- Genetic Engineering of Plants. An Agricultural Perspective. T. Kosuge, C.P. Meredith y A. Hollaender, editores. 1983. Plenum Press, New York.
- Genetic Engineering in Eukaryotes, P.F. Lurquin y A. Klenhofs, editores. 1983. Plenum Press, New York.
- Genetic Engineering of Plants and Microorganisms Important for Agriculture. E. Magnien y D. de Nettancourt, editores. 1985. Martinus Nijhoff. Dordrecht. Países Bajos.
- Nuevos avances en Ingeniería Genética. M. Vicente y J. Renart, editores, CSIC, en preparación.
- Protoplast microinjection. R.J. Griesbach (1983) *Plant Mol. Biol. Rep.* 1, 32-37.
- Molecular basis of herbicide resistance in *Amaranthus hybridus*. J. Hirschberg y L. McIntosh. (1983) *Science*, 222, 1346-1349.
- The nucleotide sequence of the maize controlling element Activator. R.F. Pohlman, N.V. Fedoroff y J. Messing. (1984) *Cell*, 37, 635-643.
- Light-regulated and organ-specific expression of a wheat Cab gene in transgenic tobacco. G. Lamppa, F. Nagy y N.H. Chua. (1985) *Nature*, 316, 750-752.
- Targeting of a foreign protein to chloroplasts by fusion to the transit peptide from the small subunit of ribulose 1,5-biphosphate carboxylase. G. Van der Broeck, M.P. Timko, A.P. Kausch, A.R. Cashmore, M. Van Montagu y L. Herrera-Estrella. (1985) *Nature*, 313, 358-363.
- Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. L. Comai, D. Facciotti, W.R. Hiatt, G. Thompson, R.E. Rose y D.M. Stalker. (1985) *Nature*, 317, 741-743.
- Gene transfer to cereal cells mediated by protoplast transformation. H. Lörz, B. Baker y J. Schell (1985) *Mol. Gen. Genet.*, 199, 178-182.
- Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer. I. Potrykus, J. Paszkowski, M.W. Saul, J. Petruska y R.D. Shillito. (1985) *Mol. Gen. Genet.*, 199, 169-177.



**Viu la teva professionalitat
col·laborant amb les
Seccions Tècniques de
l'Agrupació Territorial de
Catalunya i Balears
de l'ANQUE**