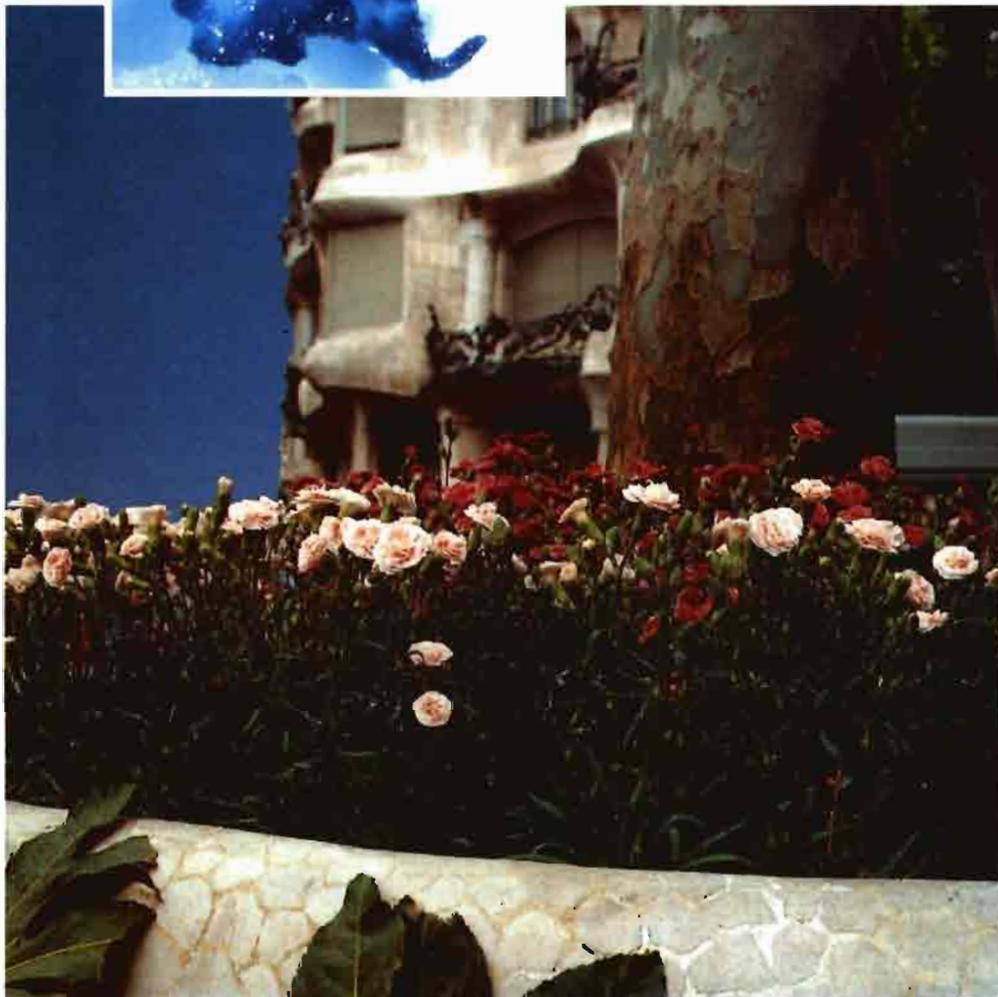




Tinción histoquímica para detectar la expresión del gen GUS en la hoja de una planta transgénica de melón. Debajo, variedades de clavel obtenidas en el IRTA de Cabrils, a través del Programa de Mejora Genética de esta especie, que ha dado lugar al nuevo proyecto de Transformación Genética.



Biotechnología

Plantas transgénicas

En el laboratorio de cultivo in vitro del IRTA de Cabrils se está trabajando desde hace tiempo en la obtención de plantas transgénicas de varias especies. Entre ellas destacan los avances realizados en clavel y melón.

**Joaquima Messeguer
Enric Mele**

Dpto. Genética Vegetal del IRTA, Cabrils

La aparición en el mercado de alimentos genéticamente modificados ha sido ampliamente comentado por los medios de co-

municación y ha suscitado un interés social, no exento de polémica, sobre el alcance y las consecuencias derivadas de la transformación genética y de las aplicaciones de la biotecnología en general.

En los vegetales, un organismo genéticamente modificado

es una planta, normalmente una variedad ya de por sí valiosa, cuya dotación genética se ha incrementado con uno o varios genes que le confieren una nueva propiedad o característica útil que antes no tenía.

La transferencia de genes de una especie a otra es un fenómeno habitual en la evolución y mejora de las plantas y de los animales. Muchas de las variedades de frutas, cereales, etc. que normalmente consumimos han sido obtenidas mediante cruza- mientos interespecíficos. Esta transferencia, que hasta hace poco estaba limitada a la que se

La transferencia de genes, que hasta hace poco estaba limitada a la que se podía hacer por la vía de la reproducción sexual, puede ahora extenderse a cualquier gen conocido gracias a los avances científicos realizados en los últimos años en el campo de la biología molecular y del cultivo de tejidos

podía hacer por la vía de la reproducción sexual, puede ahora extenderse a cualquier gen conocido gracias a los avances científicos que en estos últimos años se han realizado en el campo de la biología molecular y del cultivo de tejidos.

El descubrimiento del ADN, como soporte molecular de la herencia ha hecho posible identificar la secuencia molecular constitutiva de un gen y su posterior clonación.

Actualmente se está avanzando muy rápidamente en la elaboración de los mapas genéticos de muchas especies localizando los genes en los cromosomas, identificando su función y llegando en algunos casos

a determinar la secuencia de bases de su larga molécula. Así se han podido identificar toda una serie de genes cuya incorporación a plantas de interés económico puede representar un gran avance en la mejora de su productividad.

Entre ellos se encuentran genes que codifican para sustancias que pueden proporcionar resistencias a enfermedades producidas por virus, bacterias, hongos e insectos, genes que proporcionan resistencia a herbicidas, tolerancia a la salinidad, etc.

Existen diversas técnicas para introducir estos genes de interés en las plantas. Entre ellas destacaremos la que utiliza la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como vector. De hecho *A. tumefaciens* es una bacteria que parasita muchas especies vegetales provocando la formación de agallas. Esta bacteria tiene la capacidad de transmitir a la célula vegetal una sección del DNA de su plásmido, el llamado T-DNA, el cual se integra en el genoma de la planta. En el T-DNA están situados varios genes que codifican para la síntesis de sustancias beneficiosas para el crecimiento bacteriano (opinas), así como genes similares a los que codifican para la síntesis de hormonas de crecimiento. Así, las células en las que se ha integrado el T-DNA presentan un crecimiento tumoral, síntoma característico de la

infección por *Agrobacterium* y simultáneamente producen las opinas necesarias para su crecimiento.

A través de técnicas de biología molecular se ha logrado eliminar todos estos genes y substituirlos por genes de interés. Así, se aprovecha el mecanismo natural de incorporación del T-DNA en la célula vegetal permitiendo la introducción de los genes escogidos, sin que ello altere ninguna otra característica de la célula.

Otra de las técnicas más utilizadas para la incorporación de genes es mediante la llamada bio-balística, micro-bombardeo, o cañón de genes. Para ello se utilizan como proyectiles micro-partículas de oro o de tungsteno previamente recubiertas con el DNA de interés. Dichas partículas se depositan en una membrana y, mediante una sobrepresión de un gas inerte, se aceleran para lograr que penetren en la célula vegetal. Así, las partículas perforan la pared celular, penetran en el citoplasma y algunas alcanzan el núcleo, de tal manera que el DNA se integra dentro del genoma de la célula. Aunque esta técnica es menos específica que la de *Agrobacterium* -puesto que la incorporación del DNA es una cuestión de azar- ha permitido introducir genes y obtener plantas transgénicas en toda una serie de especies que no eran

susceptibles de ser infectadas vía *Agrobacterium*, principalmente las monocotiledóneas.

Sea cual sea la técnica elegida para una especie determinada, la transferencia genética se realiza siempre a nivel de una sola célula y es necesario disponer de una técnica de morfogénesis adecuada para que dicha célula sea capaz de regenerar la planta, lo cual es posible gracias a la totipotencia celular de los vegetales. Ahora bien, durante el proceso de transformación, no todas las células que son capaces de regenerar una planta han sido transformadas. Por tanto, para poder seleccionar las células transformadas se utilizan los llamados genes de selección.

Entre los genes que se han podido identificar, se encuentran genes que codifican para sustancias que proporcionan resistencias a enfermedades producidas por virus, bacterias, hongos e insectos, genes que proporcionan resistencia a herbicidas, tolerancia a la salinidad, etc.



Formación de brotes adventicios en el extremo basal de una hoja inmadura de clavel.

Estos genes que habitualmente codifican para resistencias a determinados antibióticos o a herbicidas se incorporan junto al gen de interés, de tal manera que en los medios de cultivo se añade el producto escogido de modo que sólo crecerán en dicho medio las células o tejidos que hayan incorporado el gen de resistencia.

A menudo, también se incorporan genes marcadores para poder seguir el proceso de transformación siendo el gen GUS el más utilizado. En este caso una simple tinción histoquímica per-

mite identificar las células transformadas, las cuales presentan una coloración azul. Finalmente, cada uno de estos genes debe poder expresarse en los tejidos vegetales por lo que a cada uno de ellos se le añade un promotor. Así pues, usualmente, en el proceso de transformación no sólo se introduce el gen de interés sino que éste va acompañado de toda una serie de genes para poder seleccionar e identificar las células y/o los tejidos transformados. Dado que los genes introducidos se incorporan al genoma vegetal en puntos al azar, puede darse el caso de que si bien la planta está transformada, los genes introducidos no sean funcionales y no se obtenga el efecto esperado. Por ello, una vez se han obtenido las plantas transgénicas, deben realizarse toda una serie de ensayos de laboratorio y de campo para comprobar el resultado obtenido.

En el laboratorio de cultivo in vitro del Departamento de Genética Vegetal del IRTA de Cabrils se está trabajando ya desde hace tiempo en la obtención de plantas transgénicas de varias especies. Entre ellas cabe destacar los avances realizados en clavel y melón.

En nuestro Instituto se lleva a cabo un programa de obtención de variedades de clavel mediante mejora genética clásica. Como apoyo a este programa se ha desarrollado un proyecto de transformación genética con el fin de obtener líneas resistentes a *Fusarium oxysporum* Dhianthi raza 2 y también líneas resistentes al ataque de lepidópteros. Para ello, se ha establecido un sistema apto para la transformación, basado en la morfogénesis de plantas a partir de las células de la base de hojas inmaduras. En colaboración con el Departamento de Genética Molecular del CSIC de Barcelona, y utilizando la técnica de transformación basada en los vectores de *Agrobacterium tumefaciens*, se están incorporando genes de glucanasas y quitinasas en algunas líneas con el fin de introducir la resistencia a *Fusarium*. Simultáneamente también se está traba-



Las virosis son uno de los problemas más graves del cultivo del melón, por ello la mejora genética de las variedades se ha orientado hacia este aspecto.

Las plantas transgénicas tendrán una gran aplicación en el desarrollo futuro de la agricultura y la alimentación. Sin embargo, esta técnica está asociada a posibles riesgos y corresponde a la comunidad científica tomar precauciones para minimizarlos

jando con genes de la toxina de *Bacillus thuringiensis* (en colaboración con el CIRAD de Montpellier) para introducir resistencia a lepidópteros. Los ensayos realizados están muy avanzados y esperamos disponer de líneas de clavel resistentes el próximo año para poder realizar los ensayos de campo correspondientes.

En el caso del melón, uno de los problemas más graves de este cultivo son las virosis. Por ello, utilizando como sistema morfogénico los cotiledones de semillas maduras, se han obtenido una serie de plantas transgénicas a las cuales se les ha introducido el gen de la proteína de la cápside del virus CMV. Varias de dichas plantas han presentado una gran resistencia en

los ensayos de inoculación con las cepas de virus más frecuentes en nuestro país. La obtención de semillas de estas plantas resistentes durante el año pasado nos permitirá realizar un ensayo de campo durante este año con el fin de evaluar la eficacia de la introducción de la resistencia.

Así pues, disponemos en nuestro Instituto de plantas transgénicas de clavel y de melón las cuales podrán ser utilizadas en los programas de mejora de las empresas colaboradoras, una vez superen todas las pruebas establecidas por la normativa vigente para este material.

Haciendo una valoración global de las ventajas e inconvenientes de las plantas transgénicas podemos decir que tendrán una gran aplicación en el desarrollo futuro de la agricultura y la alimentación. Sin embargo, como todo progreso de la ciencia, esta técnica está asociada a posibles riesgos y corresponde a la comunidad científica tomar todas las precauciones para minimizarlos. Es necesario también aumentar el nivel de información sobre este tema tanto para superar prejuicios y alarmismos infundados, como para exigir las medidas de protección que sean convenientes.