

México y Europa. Sr. Doctor

Excmo. e Ilmo. Rector de la Universidad Central de México

Queda muy complacido

de haber sido invitado

para impartir la lección

inaugural del curso

académico 1992-93

de la licenciatura en

Biología y Bioquímica

de la Universidad Central

de México, en el mes de

septiembre de 1992.

Me complace mucho

haber sido invitado

para impartir la lección

inaugural del curso

académico 1992-93

de la licenciatura en

Biología y Bioquímica

de la Universidad Central

de México, en el mes de

septiembre de 1992.

Me complace mucho

haber sido invitado

para impartir la lección

inaugural del curso

académico 1992-93

de la licenciatura en

Biología y Bioquímica

de la Universidad Central

de México, en el mes de

septiembre de 1992.

Me complace mucho

haber sido invitado

para impartir la lección

inaugural del curso

académico 1992-93

de la licenciatura en

Biología y Bioquímica

de la Universidad Central

de México, en el mes de

septiembre de 1992.

Me complace mucho

haber sido invitado

para impartir la lección

inaugural del curso

académico 1992-93

de la licenciatura en

Biología y Bioquímica

de la Universidad Central

de México, en el mes de

BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

LA INICIACION

La Agricultura de hoy es diferente a la que existió hace unos años. Este hecho se debe a la aplicación de la tecnología agrícola, que ha permitido aumentar la producción de alimentos y fibras, mejorar la calidad de los productos y reducir los costos de producción. La agricultura moderna se caracteriza por el uso de maquinaria, fertilizantes, pesticidas y variedades mejoradas de plantas y animales. Este avance ha permitido satisfacer la creciente demanda de alimentos y fibras en un mundo cada vez más poblado. Sin embargo, la agricultura moderna también enfrenta desafíos, como la contaminación del suelo y del agua, el uso excesivo de pesticidas y fertilizantes, y la pérdida de biodiversidad. Por lo tanto, es importante desarrollar tecnologías agrícolas sostenibles que permitan aumentar la producción sin dañar el medio ambiente.

Texto de la Lección Inaugural del Curso Académico 1992-93
a cargo del Excmo. Sr. Prof. Dr. Manuel Tena Aldave
Catedrático de Bioquímica y Biología Molecular

Magfco. y Excmo. Sr. Rector.

Excmas. e Ilmas. Autoridades Universitarias, Civiles y Militares.

Queridos compañeros.

Señoras y Señores.

Siguiendo el mandato de Junta de Gobierno de la Universidad, me toca este año el honor de impartir la primera lección del nuevo curso 1992-93, cuyo acto protocolario de inauguración celebramos hoy. Otros compañeros que en el pasado me precedieron en similar empeño, se han referido ya a la indudable dificultad de una tarea que si bien debe tener, en su contenido, el nivel y rigor que le corresponden a la enseñanza universitaria, ha de dirigirse y, en lo posible, interesar a una amplia audiencia altamente heterogénea. Durante la preparación de la lección que hoy voy a impartirles me he esforzado por buscar el mejor compromiso posible entre las dos condiciones anteriores. Como docente, me siento obligado a pedirles a Vdes. un esfuerzo equivalente en aras a conseguir que su atención y, en consecuencia, aprovechamiento sean los máximos posibles. Dentro de mi especialidad, la Bioquímica y Biología Molecular con una fuerte polarización hacia los sistemas vegetales, la lección que he escogido para la presente ocasión trata sobre la Biotecnología Agrícola. Justifico la selección por las connotaciones de actualidad e interés general que posee dicho tema, que lo hacen ser de utilidad a diferentes grados o niveles de comprensión.

1. INTRODUCCION

La Agricultura deberá enfrentarse en los próximos años al doble reto de tener que incrementar su productividad pero disminuyendo el uso masivo de determinados instrumentos que, pese a haber resultado muy eficaces en el pasado para aumentar el rendimiento de las cosechas (caso, por ejemplo, de los productos agroquímicos), están comportando riesgos insostenibles para la salud y deterioros muy serios para el medio ambiente. Si la necesidad de este último requisito resulta evidente, sobre todo en el mundo occidental, donde los problemas sanitarios y medioambientales reciben cada vez mayor atención, no debe serlo menos la del incremento de productividad, máxime si tenemos en cuenta cual es la situación alimenticia actual en los países del tercer mundo y que, en tales países, está previsto que se concentre el 95% del incremento de 3.000 millones que, de acuerdo con estimaciones de la Naciones Unidas, experimentará la población mundial en los próximos 35 años (Keyfitz 1989). En correspondencia con los retos anteriores, los objetivos que debe plantearse la Agricultura en nuestros días son los de lograr el nivel suficiente de producción con un deterioro ambiental mínimo o, en cualquier caso, muy inferior al actual. La Agricultura encaminada a satisfacer este doble objetivo se denomina, a veces, como "Agricultura sostenible" o "viable". Este concepto emergente de agricultura se inscribe en la naciente doctrina de la "sostenibilidad" o "viabilidad" del desarrollo, que viene a establecer que el mismo, aplicado a cualquier área de actividad socioeconómica, debe atender a las necesidades del presente pero sin

comprometer la capacidad de las generaciones futuras para satisfacer sus propias necesidades (Clark 1989, Ruckelshaus 1989). La impresión general es que los objetivos anteriormente indicados, esto es los de la denominada Agricultura sostenible, no podrán alcanzarse utilizando exclusivamente la actual tecnología agrícola. Entre las innovaciones necesarias, todo el mundo parece apuntar a la Biotecnología como la nueva tecnología capaz de solucionar los problemas que se nos avecinan, una idea que está siendo ampliamente coreada desde los propios círculos biotecnológicos. En este sentido puede, al menos, interpretarse la popularización que, desde esos círculos, se ha hecho de la denominación "Revolución Génica" (*Gene Revolution*), utilizándose, con proyección de futuro, en contraposición a la de "Revolución Verde" (*Green Revolution*), que, como es bien sabido, corresponde al nombre que recibieron en los años 60 una serie de acciones concretas, encaminadas a incrementar la productividad agrícola de los países en vías de desarrollo, que se vieron inicialmente acompañadas de un éxito espectacular. Igualmente, resulta significativa la denominación dada a uno de los más prestigiosos congresos biotecnológicos celebrados recientemente, nos referimos al 1992 *Miami Bio/Technology Winter Symposium*, que llevaba el sugerente sobrenombre de *Advances in Gene Technology: Feeding the World in the 21st Century*. Ante la anterior situación, parece lógico preguntarse si estas expectativas, sobre las que se han llegado a acuñar nombres tan extraños como el de "Agricultura molecular", responden a la realidad, o son, más bien, nuevos intentos de los biólogos (biotecnólogos) vegetales y agrónomos en su quimérica aunque muy justa pretensión de no seguir siendo discriminados en el reparto de fondos de investigación. En la presente lección pretenderemos dar elementos de juicio que arrojen alguna luz sobre la cuestión anterior. En concreto, excusándonos en la relativa ambigüedad del término biotecnología (Kennedy 1991), partiremos de una definición subjetiva de Biotecnología Agrícola, como *compendio de técnicas basadas en la utilización no convencional de las propiedades de los seres vivos, y especialmente de los transformados por ingeniería genética, cuyo fin es la mejora de la producción vegetal*, pasándose a describir los fundamentos metodológicos y principales campos de actuación de esta nueva tecnología, al objeto de poder calibrar su posible papel futuro.

2. ASPECTOS METODOLOGICOS DE LA BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

La Biotecnología Agrícola se apoya en dos componentes técnicos fundamentales, el cultivo de células y tejidos vegetales y la ingeniería genética de plantas. El cultivo de células y tejidos vegetales, o conjunto de técnicas de cultivo en condiciones asépticas de todo tipo de células, tejidos y órganos de plantas, está introducido desde, al menos, la década de 1930, habiendo experimentado una continuada expansión y mejora que llega hasta nuestros días. La ingeniería genética, o compendio de técnicas de biología molecular encaminadas al aislamiento, modificación y transferencia de genes, es de desarrollo mucho más reciente. Surge hacia mitad de la década de 1970, coincidiendo con el descubrimiento y aplicación de unas enzimas capaces de cortar al DNA de forma específica, las denominadas restrictasas, habiendo conocido desde sus

inicios un dramático crecimiento exponencial, prácticamente sin parangón posible con ninguna otra disciplina biológica.

2.1. CULTIVO DE CELULAS Y TEJIDOS VEGETALES

Esta técnica desempeña un papel clave en biotecnología agrícola por un doble motivo (Schmauder & Doebel 190, Primrose 1991). En primer lugar, de forma directa, porque presenta dos áreas concretas de aplicación, la propagación y la mejora vegetal *in vitro*, cuyos productos son de gran interés agronómico, y, en segundo lugar, de forma complementaria, porque el cultivo de tejidos suele ser el nexo obligado entre la transformación generada, a nivel celular, por ingeniería genética y el aprovechamiento agrícola del carácter transferido mediante la regeneración de plantas adultas y fértiles. Las anteriores no agotan, sin embargo, las aplicaciones biotecnológicas del cultivo de tejidos vegetales. Conviene dejar constancia, al menos, de una aplicación adicional, menos relacionada con la actividad agrícola, cual es la producción *in vitro*, a escala industrial, de metabolitos vegetales de interés (Whitaker & Hashimoto 1986, Stafford 1991b). En este sentido el ejemplo más significativo lo tenemos en la producción de shikonina, una sustancia valiosa como colorante y por sus propiedades farmacológicas que se acumula en las raíces de *Lithospermum erythrorhizon*, según un proceso que utiliza cultivos de células radiculares de dicha planta y que ha sido desarrollado a escala industrial por la firma japonesa Mitsui Petrochemical Industries (Fowler 1984, Fujita 1988). También merece destacarse la producción comercial de vanillina (Langley-Danysz 1987), principal componente flavorígeno de la vainilla, llevada a cabo por la firma estadounidense Escargenetics mediante técnicas de cultivo de tejidos; y la utilización de estas mismas técnicas, también por dicha firma y otra de la misma nacionalidad, Phytion Catalytic, en el desarrollo de sendos procedimientos para la obtención de taxol, un producto presente en la corteza y raíces de la especie leñosa *Taxus brevifolia* y del que, dadas sus muy prometedoras propiedades antitumorales, existe una demanda muy superior a la cantidad disponible mediante extracción de sus fuentes naturales (Edginton 1991).

La relación más directa del cultivo de tejidos con la biotecnología agrícola está, según hemos indicado, en las técnicas de propagación y mejora vegetal *in vitro*, por lo que seguidamente haremos una breve descripción de las mismas. La propagación *in vitro* de plantas, también conocida como propagación clonal, es una biotecnología de creciente interés comercial. Se basa en la gran capacidad regenerativa de los vegetales, hecho que ha sido ampliamente explotado, en conocidos métodos de reproducción asexual, en la práctica hortícola tradicional. *In vitro*, la regeneración se lleva a cabo a partir del cultivo, en medios sintéticos y condiciones estériles, de diferentes porciones vegetales o explantes (Warren 1991b). La técnica más habitual, con fines de propagación, parte del pequeño meristemo apical de células en crecimiento activo (meristemas apicales), de las puntas tiernas de los tallos en crecimiento o de las yemas apicales o axilares, denominándose, por el pequeño tamaño de los explantes, como técnica de

micropropagación (Hu & Wang 1983, Vasil 1986, Zimmerman *et al.* 1986, Smith & Drew 1990). La micropropagación a partir de meristemas es un método esencial para la obtención de plantas libres de virus (Quak 1977), lo que ha supuesto un avance extraordinario en determinados cultivos (caso, por ejemplo, de ajo, fresa, patata o caña de azúcar), al haberse conseguido por esta vía eliminar la contaminación vírica que habitualmente infectaba al material reproductor. A su vez, la micropropagación a partir de puntas de tallos y yemas, que son explantes más fáciles de manejar por su mayor tamaño y superiores tasas de supervivencia y crecimiento, tiene gran importancia en la multiplicación clonal de plantas de élite (Giles & Morgan 1987), aunque se espera que la automatización de la técnica podrá abaratarla lo suficiente para que, en el futuro, llegue a convertirse en un método general de propagación de todo tipo de plantas.

Otra técnica importante de propagación es la embriogénesis somática, o desarrollo de estructuras similares a embriones pero derivadas de células somáticas en vez de sexuales. Estos embriones somáticos se producen a partir de callos, que son masas de células indiferenciadas que se obtienen por cultivo de diferentes explantes vegetales en medios con un apropiado balance de hormonas, o de suspensiones celulares producidas a partir de callos. Los embriones somáticos pueden fabricarse a escala industrial, a partir de células cultivadas en reactores apropiados, y recubrirse con polímeros biodegradables, según un proceso patentado por la firma norteamericana Plant Genetics, para la producción de semillas artificiales (Fujii *et al.* 1987). Al igual que las naturales, las semillas artificiales pueden ser sembradas directamente en suelo para la producción de plantas.

Los callos y cultivos relacionados, como los de células en suspensión y los de protoplastos (Warren 1991a), que no son más que células a las que se ha desprovisto de su pared por digestión enzimática, presentan un gran interés complementario al ser un material de trabajo muy idóneo en diferentes técnicas de manipulación de la información genética, incluida la ingeniería genética. En consecuencia, la regeneración de plantas a partir de tales materiales reviste, en estos casos, una importancia capital. Tal regenerabilidad, que puede producirse bien por neoformación de tallos o raíces, lo que se conoce como organogénesis, o por embriogénesis (Warren 1991b), es muy variable no sólo entre especies vegetales, sino también entre líneas o cultivares de una misma especie e, incluso, entre cultivos similares obtenidos de diferentes y hasta del mismo tejido de una planta dada. Ejemplos extremos al respecto lo constituyen, dentro de las dicotiledóneas, el tabaco, para el que resulta posible la regeneración a partir de cualquier tipo de explante, incluidos callos que hayan sido subcultivados durante varios años, y la soja o el algodón, dos especies de considerable interés agrícola, que se muestran altamente recalcitrantes respecto a la regeneración de plantas a partir de callos. Por lo que respecta a las monocotiledóneas, los cereales, como trigo, arroz y maíz, que, conjuntamente, suponen más de la mitad del consumo mundial de alimentos, se han caracterizado históricamente por presentar considerables dificultades para regenerar plantas a partir de cultivos *in vitro*. En la última década, sin embargo, se han

producido enormes avances en este campo, al haberse podido obtener cultivos embriogénicos, esto es capaces de generar embriones somáticos, a partir de explantes de órganos inmaduros, principalmente embriones inmaduros (Vasil 1988). Esta técnica no sólo ha conducido a la regeneración *in vitro* de los principales cereales, sino que ha podido ser también adaptada con éxito a dicotiledóneas que presentaban dificultades en este sentido, como, según hemos ya indicado, es el caso de soja (Ranch *et al.* 1985) y algodón (Umbreck *et al.* 1987).

Además de por la propagación, ciertas técnicas de cultivo de tejidos poseen gran interés como vías de obtención de nuevos genotipos o por constituir valiosos apoyos para los métodos clásicos de mejora basados en la hibridación sexual. La generación de nuevos genotipos puede hacerse a partir de la variabilidad natural que surge en el cultivo de células, lo que se conoce como variación somaclonal, o seleccionando los variantes de interés, producidos con o sin la ayuda de un tratamiento mutagénico, por aplicación de un agente selectivo apropiado, técnica conocida como de selección *in vitro*, o, finalmente, mediante la unión de células somáticas de especies diferentes por fusión de protoplastos. A su vez, las técnicas de cultivo de embriones y de cultivo de anteras resultan valiosas principalmente por su carácter complementario de las tradicionales de mejora vegetal.

Es conocido que durante el cultivo *in vitro* surge espontáneamente una alta variabilidad fenotípica, en especial cuando se trata de cultivos de células indiferenciadas, como callos o células en suspensión, mantenidos durante largos períodos de tiempo. Esta variabilidad inducida por el cultivo celular, la cual se conoce como variación somaclonal (Scowcroft & Larkin 1988, Lee & Phillips 1988, Stafford 1991a), puede recuperarse, aunque sólo sea parcialmente, en plantas regeneradas a partir de cultivos *in vitro*, siendo posible así la generación, a partir de una línea vegetal, de variantes con diferentes caracteres, algunos de los cuales pueden resultar de interés agronómico (Larkin & Scowcroft 1981, Vasil 1986, Scowcroft & Larkin 1988, Miller *et al.* 1991). El proceso de obtención de caracteres deseables, generados por variación somaclonal y/o tratamientos mutagénicos, se facilita grandemente mediante la aplicación a cultivos *in vitro* de una apropiada presión selectiva. Mediante esta técnica de selección de mutantes *in vitro* se han podido obtener plantas con propiedades interesantes bajo un punto de vista agrícola, tales como resistencia a herbicidas, toxinas o metales, o capacidad para sobreproducir determinados aminoácidos esenciales (Conner & Meredith 1989). La fusión de protoplastos (Warren 1991a), lo que puede conseguirse con varias metodologías, por ejemplo en presencia de iones calcio a valores de pH superiores a 9.5, de polietilén glicol o de dimetil sulfóxido, o por acción de breves pulsos eléctricos (Eckes *et al.* 1987, Conner & Meredith 1989), constituye un método interesante para la producción de plantas híbridas, y por lo tanto de nuevos genotipos, en aquellos casos en que no sea posible su obtención por vía sexual (Cocking 1988, Jones 1988, Rose *et al.* 1990, Glimelius *et al.* 1991). El método ha ganado en potencialidad recientemente con los grandes progresos, ya comentados, realizados, a nivel de la regeneración de

plantas a partir de protoplastos, en especies de gran interés agrícola. Si la regenerabilidad es una condición imprescindible para que los protoplastos híbridos puedan llegar a tener una utilidad agronómica, otra de parecida importancia es que la planta regenerada resulte fértil, esto es que sea capaz de producir semillas. El fallo en alguna de las dos condiciones anteriores constituye la gran limitación de la técnica como vía de hibridación relativamente general que permita el cruzamiento de especies ampliamente divergentes. Así, la regeneración de protoplastos híbridos intergenéricos sólo se ha descrito raramente, obteniéndose, por lo general, en estos casos plantas infértiles, como sucediera en el célebre ejemplo del pomate, un híbrido somático de patata y tomate (Melchers *et al.* 1978). Aplicaciones de la fusión de protoplastos son tanto la producción de híbridos simétricos, que presentan una combinación de los genomas completos de ambos parentales, como la de híbridos parciales o asimétricos, que contienen completo el genoma de un parental pero sólo parte del genoma del otro, y la de híbridos citoplásmicos o cíbridos, que contienen la mezcla de los citoplasmas de ambos parentales pero sólo el núcleo de uno de ellos (Jones 1988, Conner & Meredith 1989). Pese al alto número de híbridos simétricos descritos en la literatura, pocos parecen ser actualmente de interés. Entre éstos se podría citar a *Brassica napoinigra*, producida por fusión de protoplastos de *B. napus* (colza) y *B. nigra*, que resulta resistente al hongo fitopatógeno *Phoma lingam* (Sjödén & Glimelius 1989), o al híbrido somático entre patata (*Solanum tuberosum*) y *S. brevidens*, que presenta resistencia a heladas y ciertas enfermedades víricas (Gibson *et al.* 1988). Más prometedores parecen ser los híbridos asimétricos y los cíbridos. En especial la obtención de estos últimos representa una vía muy interesante para la transmisión de caracteres extracromosómicos, tales como la esterilidad masculina citoplásmica, que es un rasgo de gran importancia en mejora vegetal (Izhar & Zeleher 1986), o la resistencia a determinados herbicidas, caso por ejemplo de los fotosintéticos, o a ciertas toxinas fúngicas (Conner & Meredith 1989, Glimelius *et al.* 1991).

Finalmente comentaremos las técnicas de cultivo de embriones y cultivo de anteras cuyo principal interés, según se ha indicado precedentemente, reside en su carácter auxiliar en métodos clásicos de mejora vegetal basados en la hibridación sexual. El cultivo de embriones, que consiste en la separación del embrión del resto de la semilla y su crecimiento posterior *in vitro* hasta el estado de plántula, permite superar la incompatibilidad sexual en muchos cruzamientos interespecíficos e, incluso, intergenéricos, cuando la incompatibilidad, como frecuentemente ocurre, se debe, más que a la no formación del embrión, a su falta de nutrición por degradación del endospermo de la semilla (Smith & Drew 1990). El cultivo de anteras o sacos polínicos y, en general, el de células gaméticas, permite la obtención de plantas haploides y, tras duplicación cromosómica, de diploides homocigóticos, lo que, además de su eventual interés como nuevas variedades (Morrison & Evans 1988), supone un ahorro de tiempo muy considerable en los trabajos de mejora vegetal. Pese al indudable potencial de esta técnica, su éxito comercial ha sido, aún, sólo limitado (Smith & Drew 1990, Vasil 1990).

2.2. INGENIERIA GENETICA DE PLANTAS

Este segundo componente técnico presenta una enorme y creciente importancia, hasta el punto de que cada vez ingeniería genética y biotecnología tienden a hacerse términos más sinónimos. Esta situación no debe sorprendernos ya que si la ingeniería genética se ha impuesto, prácticamente desde su aparición hacia 1974, como una técnica indispensable en todos los sectores de la investigación biológica (Davies 1987), resulta lógico que también lo haya hecho en el área concreta de la aplicación práctica de la biología. En esta parcela, y específicamente en la de la biotecnología agrícola, el interés de la ingeniería genética reside en su gran capacidad para intervenir en el genoma celular, lo que abre unas perspectivas inusualmente amplias a la mejora vegetal. Mediante ingeniería genética resulta posible la transferencia de genes de unos individuos a otros con la consiguiente obtención de nuevos genotipos. En principio, se podría pensar que tal cosa no constituye nada extraordinario, al existir otros métodos para conseguir lo mismo, como son los de hibridación sexual y somática. Esta apreciación resulta, incluso, reforzada si tenemos en cuenta que los enormes frutos, obtenidos en los últimos 50 años por los mejoradores clásicos mediante aplicación de la hibridación sexual, serán muy difíciles de igualar por ninguna otra tecnología. Al respecto, debe considerarse que desde la segunda guerra mundial la producción de las principales cosechas agrícolas se ha, en promedio, más que duplicado en los países desarrollados, debiéndose asignar, al menos, un 50% de este espectacular incremento a la mejora de las especies cultivadas (Rives 1984, Vasil 1990). Sin embargo, la ingeniería genética presenta una ventaja única e incontestable respecto a cualquier otro método de transferencia génica, cual es posibilitar dicha transferencia no sólo traspasando las fronteras de la compatibilidad sexual sino, prácticamente, cualquier tipo de barrera biológica. Este hecho determina que el banco de genes disponible para la mejora de una especie no se circunscriba ya, solamente, a las diferentes líneas, variantes o razas de esa especie o, como ocurre frecuentemente con los vegetales, de especies e, incluso, géneros relacionados, sino que abarque a la totalidad de especies existentes. No obstante, la ingeniería genética presenta, al menos con el nivel de conocimientos actuales, una doble limitación que no afecta a las técnicas más restringidas de hibridación sexual y somática. Nos referimos a que sólo resulta aplicable a genes que hayan podido ser definidos a nivel bioquímico, esto es cuyos productos (mRNA o proteína) sean conocidos, y a que la tecnología disponible sólo permite, en cada acto, la transferencia de un número muy pequeño de genes. Ambas limitaciones resultan especialmente significativas en biotecnología agrícola, ya que muchos genes vegetales sólo están definidos a nivel fenotípico, desconociéndose totalmente qué productos codifican, y, además, porque buena parte de las características más deseables bajo un punto de vista agronómico son rasgos cuantitativos, tales como rendimiento de cosecha o asimilación de agua y tolerancia a la sequía, aparentemente de naturaleza poligénica. Pese a su indudable carácter restrictivo, se debe dejar constancia de los resultados esperanzadores que se están obteniendo con determinadas técnicas, tales como la de marcaje de transposones (*transposon tagging*) y la de

hibridación substractiva, en el aislamiento de genes cuyos productos son desconocidos (Van Brunt 1992a), y los avances en la identificación de rasgos cuantitativos que se derivarán del mapeo más detallado del genoma vegetal, como lo posibilita la técnica de polimorfismo de longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) (Ratner 1990). Frecuentemente también se invoca, como una limitación adicional de la ingeniería genética vegetal, que estas técnicas sólo resultan aplicables a aquellas especies o líneas para las que se cuentan con protocolos efectivos de cultivo celular y de regeneración de plantas a partir de células o protoplastos individuales. Aunque esta restricción es indudablemente cierta, no es exclusiva de la ingeniería genética de plantas, presentándola igualmente las restantes técnicas de manipulación genética a nivel celular, tales como la selección *in vitro* y la hibridación somática.

La ingeniería genética consigue manipular el genoma celular por dos vías fundamentales, mediante la introducción y expresión de genes heterólogos o exógenos y mediante la anulación de la expresión de genes endógenos, técnica ésta menos desarrollada que la anterior y que para algunos puede constituir una segunda ola de avance biotecnológico (Edgington 1992). Revisaremos de la forma más breve posible los principales métodos que posibilitan ambas vías de intervención genómica.

2.2.1. Principales métodos de transformación de plantas

La transferencia de genes, esto es de segmentos de DNA, al interior de células vegetales puede conseguirse, al igual que con otros tipos de células, bien aprovechando mecanismos naturales de transferencia o bien de forma directa. En bacterias, el problema de introducción de DNA exógeno se resolvió fácilmente en su momento, mediante la incorporación del mismo a plásmidos, que son elementos genéticos accesorios, replicables y fácilmente transmisibles, o a virus bacterianos. Con plantas, la utilización de virus como vectores se ha visto dificultada porque la práctica totalidad de los virus vegetales contienen RNA en vez de DNA, lo que presenta indudables problemas para ser manipulados *in vitro* por una tecnología que, no debe olvidarse, se denomina de DNA (y no de RNA) recombinante. Sólo recientemente se están solventando algunos de estos problemas y empezándose a considerar que los virus de RNA presentan un buen potencial para el desarrollo de vectores de expresión en plantas (Joshi & Joshi 1991). Existen, sin embargo, dos grupos de virus vegetales que contienen DNA, los caulimovirus y los geminivirus. Los primeros, y especialmente el virus del mosaico de la coliflor (CaMV), han sido estudiados a nivel de biología molecular con bastante profundidad, hecho que no se ha traducido en progresos equivalentes respecto a su utilización como vectores en la transformación de plantas. La poca capacidad de inserción de DNA exógeno en la partícula viral infectiva representa una seria dificultad, como también lo es que sólo un número relativamente corto de especies vegetales, las crucíferas, resultan susceptibles a caulimovirus. Los geminivirus tienen la ventaja de poseer un rango mucho más amplio de plantas huéspedes, entre las que, interesadamente, no sólo se encuentran dicotiledóneas sino también algunas monocotiledóneas. Sin

embargo estos virus, cuyo genoma consiste de una o dos moléculas de DNA circular monofilar, no están demasiado bien estudiados a nivel genético y su posible utilización como vectores se está abordando, seriamente, desde hace relativamente poco tiempo, con resultados que no son aún demasiado importantes (Coutts *et al.* 1990, Joshi & Joshi 1991).

Frente a los escasos avances conseguidos en la utilización de virus como vectores, un éxito espectacular en este sentido llegaría, sorprendentemente, del área de los plásmidos bacterianos. Todo se ha derivado del estudio de una enfermedad vegetal concreta, la denominada agalla del cuello o de la corona, consistente en la formación de tumores voluminosos o agallas que, por lo general, se sitúan en el cuello del tallo, o zona comprendida entre éste y las raíces. Dicha enfermedad se produce entre numerosas especies vegetales cuando heridas recientes resultan infectadas con una bacteria Gram negativa del suelo, *Agrobacterium tumefaciens*. Los estudios de bioquímica y biología molecular concluyeron que la agalla del cuello se debe a un mecanismo patogénico prácticamente único, consistente en la transferencia, integración en el genoma de la célula vegetal afectada y expresión en dicha célula de genes de la bacteria, la cual, de esta forma, se comporta como un eficaz ingeniero genético vegetal. El carácter infeccioso de *Agrobacterium* depende de la presencia de una molécula extracromosómica de DNA de gran tamaño, unas 200 kbases, a la que se conoce como plásmido Ti (de *tumor-inducing*). Durante la infección es sólo una pequeña porción del plásmido Ti, de aproximadamente 20 kbases, la que resulta transferida e integrada en el genoma vegetal. Dicha porción, a la que se denomina T-DNA (la T se refiere a transferencia), lleva genes responsables de la biosíntesis descontrolada de fitohormonas (auxina y citoquinina), lo que determinará el crecimiento oncogénico de las células infectadas, y genes que dictan la biosíntesis de unos derivados específicos de aminoácidos y azúcares, denominados opinas, que son compuestos que sólo aparecen en células tumorales desde las que son excretados al exterior donde son utilizados nutritivamente por las agrobacterias. Existen varias familias de opinas, cuya síntesis en las células vegetales infectadas y aprovechamiento catabólico por *Agrobacterium* viene especificado por un número equivalente de distintos tipos de plásmidos Ti. Tras el proceso de infección, la opina sintetizada en respuesta al T-DNA transferido y liberada al medio actúa, a su vez, como una especie de afrodisíaco molecular que desreprime los genes para la transferencia conjugativa del plásmido Ti a agrobacterias avirulentas desprovistas de él, las cuales podrán ya aprovecharse nutritivamente de dicha opina al adquirir la capacidad de metabolizarla.

La transferencia del T-DNA del plásmido Ti no sólo es la base del proceso de infección que conduce a la agalla de la corona, sino también de la enorme utilidad de dicho plásmido como vector para la transformación de plantas. Se ha podido establecer que esta transferencia, que, curiosamente, parece guardar una notable analogía con la de plásmidos durante la conjugación bacteriana (Stachel *et al.* 1986), sólo necesita de tres componentes genéticos, ninguno de los cuales está situado internamente dentro de

la región T-DNA. Concretamente, los requisitos son: 1) dos genes, localizados en el cromosoma de *Agrobacterium*, que controlan la unión inicial de la bacteria a la célula vegetal, 2) dos regiones pequeñas, de sólo 25 pares de bases y que presentan una secuencia directa prácticamente idéntica, que flanquean al T-DNA, constituyendo algo así como sus bordes izquierdo y derecho, y 3) una región bastante extensa del plásmido Ti, que se conoce como región vir o de virulencia. Existen evidencias de que la expresión de la región vir resulta inducida por determinados compuestos de tipo fenólico de origen vegetal, caso por ejemplo de acetosiringona y α -hidroxi acetosiringona (Lynn & Chang 1990, Peters & Verma 1990), cuya síntesis forma parte de la respuesta de las plantas a la producción de heridas (*wounding response* o WR). Lo anterior explicaría tanto que sólo las heridas recientes constituyan sitios de infección por *Agrobacterium*, como que determinadas especies vegetales, no productoras de WR, como es el caso de la mayoría de las monocotiledóneas, sean altamente recalcitrantes a la infección por *Agrobacterium*. Al carecer la región T-DNA de señales internas para su transferencia, cualquier secuencia de DNA situada entre los bordes de la T-DNA original podrá ser transferida e integrada como si de tal región se tratase, siempre que se cumplan los restantes requisitos anteriormente indicados. Al efecto, resulta posible tanto la extensión del T-DNA original con DNA exógeno, hasta unas 50 kbases en total, como la eliminación parcial o total del T-DNA y su reemplazamiento por DNA exógeno. En el primer caso el T-DNA sigue siendo infeccioso por lo que, si se usa como vector de genes heterólogos, sólo podrá originar células transformadas de carácter tumoral, de las que, debido a dicho carácter, resultará imposible la diferenciación y regeneración de plantas. Este fue el resultado alcanzado en el primer caso bien establecido de transformación de células vegetales, conseguido en 1983 por el grupo de Scheel y Van Montagu de la universidad belga de Gante, en el que se consiguió introducir en tabaco un gen bacteriano, de *Escherichia coli*, que dicta la síntesis de una enzima, la cloramfenicol transacetilasa, que confiere resistencia al antibiótico. El resultado fue la obtención de agallas cuyas células, en cultivo, resultaron resistentes al cloramfenicol pero incapaces de regenerar plantas (Herrera Estrella *et al.* 1983). La solución a este problema consiste en eliminar del plásmido Ti la región oncogénica. Este tipo de plásmido Ti "desarmado", convenientemente cargado con un gen bacteriano de resistencia al antibiótico kanamicina, fue utilizado un año después, por el mismo grupo de la universidad de Gante, para la obtención, a partir de células transformadas que ya no presentaron problemas de regeneración por sobreproducción de fitohormonas, de plantas transgénicas de tabaco que resultaron fértiles y capaces de transmitir el carácter de resistencia al antibiótico a la progenie (Zambryski *et al.* 1983, De Block *et al.* 1984).

El caso anterior constituye un ejemplo representativo de uno de los dos métodos de transformación de plantas con *Agrobacterium*, el que usa los denominados vectores integrativos (Eckes *et al.* 1987, Klee *et al.* 1987). Se trata de vectores Ti desarmados, por escisión de los genes que dictan la síntesis de fitohormonas, que incorporan entre los bordes de la región T-DNA el material genético foráneo que se quiere transferir. En

el procedimiento usado por el grupo de Gante, los genes tumorígenos del plásmido Ti se reemplazaron por secuencias de pBR 322, un vector habitual para la introducción y copia o clonación de DNA en *E. coli*, mientras que el material genético a introducir en plantas se clonó en *E. coli* con un vector pBR 322, insertándose por recombinación homóloga, vía las secuencias de pBR, en el plásmido Ti. El segundo método de transformación con *Agrobacterium* utiliza "vectores binarios". Se basa en el hecho de que, para la transferencia del T-DNA, esta región y la vir del plásmido Ti no necesitan formar parte de una misma estructura molecular. En el método de vectores binarios ambas regiones se sitúan en vectores diferentes. El vector vir es un plásmido Ti al que, generalmente, se le ha desprovisto de la región T-DNA, mientras que el segundo vector es un pequeño plásmido, de aproximadamente 10-20 kbases, que puede replicarse autónomamente tanto en *E. coli* como en *Agrobacterium* y que contiene los bordes de la región T-DNA y el material genético a transferir, que deberá situarse entre dichos bordes (Gasser & Fraley 1989). Respecto a este último punto, un único borde puede ser suficiente, aunque en este caso el plásmido completo se comporta como T-DNA siendo transferido en su totalidad (Klee *et al.* 1987). La ventaja de los vectores binarios es que no dependen de un plásmido Ti específico, pudiéndose introducir en cualquier cepa de *Agrobacterium*.

Si se dispone de la bacteria que porte el vector apropiado, la transformación de plantas con *Agrobacterium* es relativamente simple. Existen tres métodos principales, el de la inoculación del tallo, el de disco de hojas y el cocultivo. En el primero, se produce a la planta una herida y se aplica a ésta una suspensión de agrobacterias. Mejores eficiencias de transformación se obtienen cuando se incuban trozos de tejidos, típicamente discos de hojas, en una suspensión bacteriana, pasándose luego a ser cultivados *in vitro*. En el procedimiento de cocultivo, son protoplastos los que se incuban conjuntamente con agrobacterias.

Una segunda especie bacteriana, *Agrobacterium rhizogenes*, presenta un mecanismo infeccioso y, en consecuencia, un potencial para ser usada en ingeniería genética de plantas, muy similares a los de su congénere *A. tumefaciens* (Biot *et al.* 1987). En este caso la enfermedad, conocida como de raíz pilosa (*hairy root*), se caracteriza por una proliferación anormal de las raíces de la planta infectada y viene determinada por la presencia en la bacteria de un plásmido patógeno que se conoce como Ri (de *root inducing*). El interés de *A. rhizogenes* no radica solamente como método de transformación de plantas. También se ha planteado que el cultivo de raíces pilosas, obtenidas en la infección con *A. rhizogenes*, puede constituir un método rentable, al no ser necesaria la adición de fitohormonas, de cultivo *in vitro* para la preparación industrial de productos naturales de origen vegetal (Edgington 1991).

La utilización de *Agrobacterium* para la obtención de plantas transgénicas, según las metodologías descritas precedentemente, se ha convertido en una técnica muy eficaz y versátil. Respecto a este último punto se puede afirmar que más de 25

especies vegetales han sido transformadas por esta vía (Gasser & Fraley 1989). Pese a lo anterior, el sistema de *Agrobacterium* dista de ser universal, estando restringido al rango de huéspedes de la bacteria. Aunque el mismo es muy amplio, incluyendo a un gran número de dicotiledóneas, tanto herbáceas como leñosas, y a algunas monocotiledóneas, como el espárrago, presenta el gran inconveniente de que la mayoría de este último tipo de plantas, y especialmente las gramíneas, entre las que se encuentran las más importantes cosechas, no son susceptibles de ser infectadas o, al menos, transformadas por *Agrobacterium*. El problema con las gramíneas, y más concretamente con los cereales, puede derivarse de su especial respuesta a la producción de heridas, que tiende a necrosar el tejido adyacente, que es en el que normalmente se integra el T-DNA. El fallo, pues, de transformación mediada por *Agrobacterium* podría deberse tanto a la no transferencia génica por falta de síntesis de inductores de la región vir, como en ciertos casos, maíz por ejemplo, donde tal transferencia ha podido ser demostrada (Grimsley *et al.* 1987), por muerte vía necrosis de las células en cuyo genoma queda integrado el T-DNA bacteriano (Potrykus 1990, 1991).

Las limitaciones del sistema de *Agrobacterium*, sobretodo por sus fallos en la transformación de cereales, y la carencia, prácticamente, de otros vectores de clonación apropiados, han servido de acicate para el desarrollo de métodos directos de transferencia de genes, entre los que podemos destacar dos tipos principales. El primero, que no difiere demasiado de los métodos que se usan con células animales, se basa en la introducción del DNA exógeno en protoplastos, cuya membrana se permeabiliza mediante la apertura transitoria de poros por choques eléctricos (electroporación), por tratamiento con agentes químicos como el polietilén glicol, o por fusión con liposomas (Paszkowski *et al.* 1984, Larkin *et al.* 1990). El segundo método, que inicialmente fue desarrollado por Sanford y un grupo de colaboradores de la universidad norteamericana de Cornell (Sanford 1988), usa micropartículas recubiertas del DNA que se quiere transferir, las cuales son literalmente disparadas al interior de las células de la muestra a transformar. Este método, que suele denominarse bio-balístico o biolístico, conoce algunas variantes respecto al material de los microproyectiles, que por lo común son de tungsteno u oro, y a la naturaleza de la fuerza propulsora empleada para acelerar dichos microproyectiles. En relación con este último punto, los aparatos biolísticos, también denominados pistolas o cañones de genes, desarrollados por el grupo de Sanford utilizan bien cargas explosivas (balas) o helio comprimido (Sanford 1988), mientras que un aparato similar, desarrollado por investigadores de la firma norteamericana Agracetus, utiliza como fuerza propulsora la vaporización súbita de gotitas de agua desencadenada por descargas de alto voltaje (Christou *et al.* 1990).

Los métodos basados en protoplastos presentan, aparentemente, la ventaja de que los tratamientos enzimáticos de disolución de la pared celular inducen una especie de "respuesta a heridas" (*wound response*) que, en opinión de algunos (Potrykus 1990, 1991), es esencial para la adquisición de un estado de competencia celular respecto a la regeneración y, probablemente, también, a la transformación integrativa cuando

tienen el inconveniente de la dificultad que frecuentemente presenta la obtención de protoplastos regenerables. Fue precisamente el gran avance conseguido en la preparación de este tipo de protoplastos, mediante la utilización, ya comentada, de embriones inmaduros como explantes, lo que permitiría que la transformación de protoplastos se apuntase el éxito indudable de conseguir por primera vez la obtención de plantas transgénicas de cereales. Esto se producía en 1988, siendo arroz (Toriyama *et al.* 1988) y maíz (Rhodes *et al.* 1988) los cereales transformados. Aunque en los dos casos anteriores las plantas regeneradas no fueron fértiles, dicho inconveniente pudo subsanarse posteriormente en el caso del arroz, tanto con líneas de la variedad japónica (Shimamoto *et al.* 1989) como de la índica (Datta *et al.* 1990), que es comercialmente la más importante. Por lo que respecta al método biolístico, su gran atractivo reside en su sencillez y generalidad, que lo hacen aplicable a cualquier tipo de material biológico (Klein *et al.* 1992). En el caso concreto de plantas, se puede utilizar no sólo con protoplastos sino también con células o tejidos. Los proyectiles metálicos portadores de DNA resultan acelerados lo suficiente como para atravesar la pared celular, lo que hace innecesaria su eliminación, mientras que por su pequeño tamaño, alrededor de 2 µm, los orificios que abren en paredes y membranas celulares resultan autorrestañables. El método biolístico, además, se ha visto avalado por éxitos espectaculares, al conseguirse con su mediación la transformación de especies de gran interés agrónomico y considerable dificultad de manipulación. Al respecto basta señalar su aplicación a soja, uno de los cultivos más importantes dentro de plantas dicotiledóneas, y a los cereales. La obtención de plantas transgénicas de soja se consiguió por primera vez, y por partida doble (por investigadores de las firmas Monsanto y Agracetus), en 1988, hecho que mereció ocupar la portada del número de agosto de ese año de la prestigiosa revista *Bio/Technology*. Mientras que en el caso del grupo de Monsanto la transformación se efectuó mediante el sistema de *Agrobacterium*, lo que resultó posible gracias a una cuidadosa selección de cultivares de soja que además de ser susceptibles a la infección bacteriana presentaban buena capacidad de regeneración (Hinchee *et al.* 1988), el grupo de Agracetus utilizó el método biolístico, bombardeándose meristemos apicales y axilares de los que se obtuvieron plantas transgénicas por un simple proceso de propagación, prácticamente aplicable a cualquier cultivar de soja (McCabe *et al.* 1988). Respecto a los cereales, cabe destacar la obtención de plantas transformadas y fértiles de maíz (Fromin *et al.* 1990, Gordon-Kamm *et al.* 1990), cosa que no ha podido conseguirse por métodos de transferencia directa a protoplastos, de variedades índica y japónica de arroz (Christou *et al.* 1991) y, sobre todo, de trigo, hecho éste largamente esperado y que finalmente se ha comunicado en junio del presente año (Vasil *et al.* 1992), lo que, al igual de lo ocurrido en su momento con soja, fue noticia de portada del número de ese mes de la revista *Bio/Technology*.

Para terminar este apartado, donde se han revisado los principales métodos de transferencia de genes en plantas, resulta obligado referirse, aunque sea mínimamente, a la composición de los genes que se transfieren. Estos son construcciones o quimeras que integran diferentes componentes modulares que pueden ser de distinta proceden-

cia. El módulo más específico es el gen estructural, o fragmento de DNA que dicta la información para la fabricación de un producto determinado, generalmente una proteína, cuya expresión se pretende conseguir en la planta transgénica. Los restantes módulos son elementos reguladores que han de ser reconocidos por la maquinaria bioquímica de la célula vegetal. Estos elementos, al igual que en otras células eucarióticas, comprenden las regiones promotora y finalizadora, junto, esta última, con la denominada región poliadenilada. Mientras que el módulo estructural puede ser de cualquier origen, la necesidad de que los módulos reguladores funcionen como tales en la célula vegetal impone que su procedencia sea de genes vegetales o de genes capaces de ser transcritos en plantas, caso, por ejemplo, de los genes presentes en el T-DNA de los plásmidos Ti o Ri o en determinados virus vegetales de DNA. Al respecto, el promotor nos (de nopalina sintasa) del T-DNA de *A. tumefaciens* y el promotor de los transcritos de 35 S del virus del mosaico de la coliflor son tal vez los más usados en la construcción de genes quiméricos para su expresión en plantas. Ambos son extraordinariamente activos, el de 35 S CaMV es unas 30 veces más activo que el promotor nos, y de actuación constitutiva. Muchos genes vegetales se expresan de forma inducible por agentes físico-químicos o por determinados estados de desarrollo, siendo de gran interés la utilización de las regiones reguladoras de tales genes en la construcción de genes quiméricos, al objeto de conseguir que éstos se expresen en las plantas transgénicas con idéntica pauta de especificidad. Además del gen estructural cuya expresión se pretende y de los necesarios elementos reguladores, los genes quiméricos suelen contener al menos un gen estructural adicional conocido como marcador (Flavell *et al.* 1992). Existen dos clases principales de genes marcadores, los seleccionables y los reporteros. Los primeros suelen conferir resistencia a determinados agentes citotóxicos, lo que permite seleccionar las células transformadas de las que no lo hayan sido. Con diferencia el gen seleccionable más habitual es el NPT II de *E. coli*, que codifica a la neomicina fosfotransferasa II, lo que confiere resistencia a los antibióticos kanamicina y neomicina. Otro marcador de uso relativamente frecuente es el denominado gen *bar* de *Streptomyces hygrosopicus* (Thompson *et al.* 1987), que codifica una acetiltransferasa que modifica, y en consecuencia confiere resistencia, al herbicida fosfotricina. Los genes reporteros, por su parte, codifican productos fácilmente analizables, por lo que permiten establecer cualitativa y cuantitativamente, de una forma muy cómoda, qué células han sido transformadas. Los dos genes reporteros más utilizados son los que codifican a las enzimas β -glucuronidasa (GUS) y luciferasa (LUC). Las células transformadas que expresan el gen GUS adquieren una coloración azul cuando se incuban con el sustrato 5-bromo-4-cloro-3-indoilo- β -glucuronido, mientras que las que expresan el gen LUC emiten luz cuando se incuban con el sustrato luciferina.

2.2.2. Principales métodos para anular la expresión de genes endógenos

La segunda forma de intervención genómica que posibilitan las técnicas de ingeniería genética pretende, más que la expresión de genes heterólogos o foráneos, la

inactivación selectiva de genes endógenos. Esto puede conseguirse por tres procedimientos, mediante RNAs antisentido o antimensajeros, por cosupresión y por ribozimas. Un RNA antisentido es una estructura monofilar de RNA complementaria, esto es antiparalela y de secuencia de bases complementaria, al RNA mensajero de un gen determinado (Toulmé 1987, Therre & Sauclières 1988, Weintraub 1990). Su formación puede lograrse mediante inserción en inverso de un gen homólogo al que se quiere inactivar, radicando tal inactivación, aparentemente, en la formación de una estructura dúplex entre el RNA antisentido y el mRNA, lo que impide la transcripción de éste. Esta técnica de bloqueo de genes se ha experimentado con notable éxito en el campo vegetal. Así, en el primer caso de aplicación a plantas, se conseguiría manipular la pigmentación de petunias mediante la introducción de un gen antisentido de la chalcona sintasa, que es la enzima inicial de la ruta específica de biosíntesis de antocianidinas, los pigmentos de esta especie de flores (Krol *et al.* 1988, Mol *et al.* 1989). El bloqueo en distinto grado del gen endógeno por el gen antisentido transferido originó una espectacular colección de petunias que mostraba toda una gama de colores en sus flores, desde el blanco al rojo sólido. El trabajo anterior, realizado de forma independiente por dos grupos, uno norteamericano y otro holandés, demostró la capacidad de la técnica para generar propiedades útiles bajo un punto de vista agronómico. Al respecto conviene tener presente que Holanda copa, con más del 50%, las exportaciones mundiales de flores cortadas y plantas ornamentales, un mercado en franco progreso y que sólo por el primero de los conceptos anteriores ascendió en 1987 a 200 millones de dólares.

El bloqueo de genes endógenos no sólo se consigue mediante transferencia e inserción en inverso de genes homólogos, sino que también, a veces, basta con la simple transferencia de tales genes homólogos. Esta inhibición de genes homólogos por su inserción en *trans* se conoce como cosupresión. Su mecanismo es fundamentalmente desconocido (Jorgensen 1990), aunque se ha postulado que pudiera implicar a RNAs antisentido (Grierson *et al.* 1991).

El tercer procedimiento de bloqueo de genes es tal vez el de mayor potencial futuro, aunque se encuentra aún en una fase muy inicial de desarrollo. Deriva de uno de los descubrimientos recientes de mayor impacto en el campo de la bioquímica y biología molecular, cual es la actividad enzimática del RNA en reacciones de autoescisión (Altman 1990, Edginton 1992, Gerlach & Robaglia 1992), y su estrategia consiste en unir al centro activo de estas moléculas de RNA catalítico, conocidas como ribozimas, secuencias estructurales complementarias capaces de enlazar correctamente a moléculas diana de RNA, que podrían resultar así escindidas por la actividad lítica de la ribozima (Cotten 1990). El bloqueo de un gen dado sería posible mediante la degradación de su mRNA por una ribozima modificada capaz de utilizar a dicho mRNA como sustrato. Para la construcción de estas ribozimas modificadas se usan dominios catalíticos como el de "cabeza de martillo", identificado en un número de viroides vegetales. La forma más general de aplicación del método pasaría por la obtención del gen codificador de la ribozima de interés y su inserción en la célula diana.

Los procedimientos anteriores no sólo abren una nueva vía de modificación genética, mediante la supresión de características preexistentes, sino que brindan un muy esperanzador y novedoso mecanismo de lucha contra virus de RNA. Entre éstos no sólo se encuentran la práctica totalidad de virus vegetales, sino también muy importantes virus animales y humanos (Rossi & Sarver 1990).

3. PRINCIPALES DESARROLLOS EN BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

Las metodologías a que acabamos de hacer referencia, y otras complementarias que no describiremos, están posibilitando abordar una serie de objetivos de indudable interés agronómico, entre los que pudiéramos destacar los que pretenden:

1) Incrementar la productividad de los cultivos, reduciendo las pérdidas de rendimiento causadas por una serie de agentes bióticos (como malas hierbas, insectos o fitopatógenos) y abióticos (como sequía, salinidad o heladas)

2) Modificar los cultivos a fin de ampliar el espectro y composición de los productos vegetales, y

3) Mejorar los procesos de fotosíntesis y fijación de nitrógeno a fin de incrementar el rendimiento de las cosechas y reducir las necesidades de fertilizantes.

Evidentemente no podemos pretender dar una idea, ni siquiera aproximada, de las diferentes líneas de trabajo que se están desarrollando en los tres grandes apartados que pueden establecerse en base a los objetivos anteriores. Nos contentaremos, en su lugar, con presentar una visión de conjunto, muy general, en la que sólo resaltaremos aquellos logros que parecen estar en una fase muy próxima a la de explotación comercial.

3.1. TOLERANCIA A AGENTES BIOTICOS Y ABIOTICOS

Se trata del área que, sin duda, ha recibido una mayor atención en la investigación biotecnológica. Esto resulta lógico, entre otros motivos, si tenemos en cuenta la posición preeminente que han tenido las grandes empresas de productos agroquímicos y de semillas en el desarrollo y financiación de este tipo de investigación, y que estas empresas lo que venden, fundamentalmente, es productividad agrícola, la cual requiere inevitablemente controlar la incidencia negativa que sobre los cultivos puede tener la acción de los agentes antes referidos. Al respecto, conviene recordar que buena parte del espectacular incremento de los rendimientos agrícolas, conseguido en los últimos 40 años, se debe al efectivo control de algunos de tales agentes, especialmente insectos, malas hierbas y enfermedades fúngicas, mediante el uso de pesticidas. El reto de la biotecnología será garantizar un nivel de control al menos equivalente pero con un consumo menor y más racional de productos fitosanitarios, de forma que éstos dejen

de constituir una seria amenaza para la salud y el medio ambiente. La aproximación biotecnológica al problema es plural. Simplificando mucho, se podría afirmar que en el caso del control de agentes bióticos se usan dos grandes tipos de estrategias, la lucha biológica, que, en general, persigue la eliminación del agente perjudicial mediante un competidor suyo, y la resistencia. Esta, a su vez, es la vía que parece más factible en el caso de agentes abióticos.

3.1.1. Control de malas hierbas

Las malas hierbas, al competir con la cosecha por el agua, nutrientes y luz solar, constituyen una causa muy importante de disminución de la productividad agrícola (de hasta un 70%), lo que determina que el control efectivo de la maleza sea una práctica esencial en la agricultura moderna. La forma de abordar el problema ha sido mediante el uso de herbicidas, cuyo mercado radica en una amplia gama de formulaciones, basadas en algo más de 100 productos fitotóxicos, y alcanza a nivel mundial un volumen de ventas próximo a los 10.000 millones de dólares. El control ejercido por esta vía se puede considerar como sólo medianamente aceptable, ya que se estima que la infestación por malas hierbas aún produce pérdidas en torno al 10% de la cosecha mundial (Gressel 1985), mientras que en los últimos años se ha venido constatando una creciente preocupación por problemas de contaminación ambiental, toxicidad para animales y humanos, y persistencia de residuos en suelos y aguas, relacionados con el uso de estos productos.

Aunque se están desarrollando algunos micoherbicidas basados en hongos fitopatógenos de determinadas malas hierbas, dos de los cuales (Collego y DeVine) están comercializados en USA, la contribución biotecnológica al control de la maleza se está dirigiendo, más que hacia la lucha biológica (Strobel 1991), a la obtención de plantas cultivadas resistentes a herbicidas (Hatzios 1987, Mazur & Falco 1989, Oxtoby & Hughes 1990, Schulz *et al.* 1990). Se pretende, así, que las cosechas resulten insensibles a tales productos y, en consecuencia, se puedan usar éstos en cualquier momento en que la infestación por malas hierbas alcance un nivel indeseable. En esta línea se han obtenido algunos resultados interesantes mediante técnicas de selección *in vitro* (Crocorno & Ochoa-Alejo 1983, Hughes 1983, Chaleff & Ray 1984, Donn *et al.* 1984, Singer & McDaniel 1985, Smart *et al.* 1985, Chaleff 1986), de fusión de protoplastos (Barsby *et al.* 1987) e, incluso, de mejora genética clásica (Beverdorf *et al.* 1980), aunque es la ingeniería genética la que, con diferencia, está permitiendo la consecución de los logros principales. Al respecto, se han utilizado, según los casos, dos vías de adquisición de resistencia, la primera consistente en la sobreexpresión del blanco de acción del herbicida o en la expresión de un blanco mutado, insensible a su acción; mientras que la segunda se basa en la expresión de una enzima capaz de detoxificar al herbicida. Se han obtenido plantas transgénicas resistentes a los principales herbicidas de nueva generación, entre los que destacan una serie de inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos (Kishore & Shah 1988) tales como el

glifosato (inhibidor de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos), sulfonilureas e imidazolinonas (inhibidores de la biosíntesis de aminoácidos de cadena ramificada), y fosfinitricina o su precursor bialafos (inhibidores de la glutamina sintetasa). Estos productos se caracterizan por tener un amplio espectro de actividad, aplicarse a muy bajas dosis (de sólo gramos por hectárea en algunos casos), ser muy poco persistentes y carecer, aparentemente, de toxicidad para animales, propiedades que se comparan muy ventajosamente con las que presentan los herbicidas más antiguos. En los casos de glifosato y de sulfonilureas e imidazolinonas, la resistencia se ha logrado mediante la incorporación de tanto mecanismos de sobreproducción (Shah *et al.* 1986) como de insensibilidad (Comai *et al.* 1985, Fillatti *et al.* 1987, Della Cioppa *et al.* 1987, Creason & Chaleff 1988, Mazur & Falco 1989, Miki *et al.* 1990) del blanco de acción, el cual es, respectivamente, la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato, una enzima de la ruta del shikimato o ruta responsable de la biosíntesis de aminoácidos aromáticos, y la acetolactato o α -acetohidroxiácido sintasa, la enzima inicial de la ruta biosintética de aminoácidos de cadena ramificada. A su vez, en el caso de fosfinitricina, la vía ha sido la transferencia de un gen microbiano (el ya referido gen *bar* de *S. hygrosopicus*) que origina la inactivación del herbicida por acetilación (De Block *et al.* 1987, Thompson *et al.* 1987). Plantas transgénicas que expresaban el gen *bar* fueron las primeras con que se verificó, a nivel de ensayos de campo, la adquisición de resistencia a herbicidas por ingeniería genética (De Greef *et al.* 1989), mientras que actualmente, como ya se ha indicado con anterioridad, el gen *bar* se utiliza, con cierta frecuencia, como gen marcador seleccionable en plantas. También se han conseguido plantas transgénicas resistentes a herbicidas tradicionales, como atrazina, un herbicida de amplia utilización pero cuyo uso, debido a su alta persistencia, se está restringiendo fuertemente en muchos países occidentales, bromoxinil y 2, 4-D. En el primer caso, se ha incorporado un mecanismo de insensibilidad del blanco de acción, la proteína Q_b del centro de reacción del Fotosistema 2, utilizándose al efecto genes cloroplásticos *psbA* mutados, procedentes de malas hierbas que han desarrollado, de forma natural, resistencia a atrazina como consecuencia del tratamiento continuado con el herbicida. La transformación se vio, sin embargo, dificultada inicialmente por la dificultad de manipular el genoma cloroplástico. El problema se solventó finalmente utilizándose un gen quimérico que consistía en la región codificadora de un gen *psbA* de resistencia a atrazina (procedente de un biotipo resistente de la mala hierba *Amaranthus hybridus*) a la que se añadieron secuencias de control para su expresión en el núcleo y una secuencia codificadora de un péptido de tránsito de localización cloroplástica (Cheung *et al.* 1988). En los restantes dos casos, la resistencia se ha conseguido por transferencia de genes de destoxificación de origen bacteriano, concretamente el gen *bxn* procedente de *Klebsiella ozaenae*, que codifica a una nitrilasa de alta actividad hidrolítica frente al grupo nitrilo del bromoxinil (Stalker *et al.* 1988), y el gen *tdA* procedente de *Alcaligenes eutrophus*, que codifica a una monooxigenasa específica de 2,4-D (Lyon *et al.* 1989). Diferentes plantas transgénicas resistentes a herbicidas han superado ya las pruebas de campo y, con toda probabilidad, llegarán muy pronto al mercado.

El notable y rápido éxito alcanzado por esta línea de investigación biotecnológica, conviene resaltar que las primeras plantas transgénicas con rasgos de interés agrónómico que se obtuvieron fueron plantas resistentes a herbicidas (Comai *et al.* 1985, Shah *et al.* 1986), tiene, sin duda, una base científica, cual es la naturaleza monogénica y la fácil caracterización molecular del carácter de resistencia. Pero, indudablemente, tiene también un fundamento comercial. Al respecto, se ha dicho que la resistencia a herbicidas es un rasgo que se vende dos veces, en la semilla que se siembra y en el herbicida con que se ha de tratar el cultivo, no siendo de extrañar que las empresas de agroquímicos líderes en el mercado de herbicidas hayan participado muy activamente, aunque no siempre de forma directa, en el desarrollo de cultivos resistentes a sus principales productos (ejemplos significativos de participación muy activa y directa los tenemos en los casos de Monsanto con el glifosato y de Du Pont con las sulfonilureas). Diferentes pros y contras se han aducido en relación con las plantas transgénicas resistentes a herbicidas. Sin entrar en la polémica, sí parece seguro que esta vía biotecnológica no tiene entre sus objetivos últimos erradicar el uso de pesticidas.

3.1.2. Control de insectos

Los insectos constituyen una de las plagas agrícolas con mayor capacidad de incidencia negativa en la productividad de las cosechas. La forma actual de lucha contra ellos radica en la masiva utilización de insecticidas orgánicos, productos que si bien en principio tuvieron una acogida notablemente favorable, como lo prueba el premio Nobel de Química concedido en 1948 a Müller por sus investigaciones sobre el DDT, no tardarían mucho en suscitar reacciones negativas por sus posibles efectos perjudiciales para la vida salvaje, la calidad de las aguas y el medio ambiente en general. Esta actitud de rechazo, aunque ha conocido picos de virulencia, el primero de los cuales se puede fechar en 1961 coincidiendo con la publicación en USA del célebre libro *Silent Spring* de Rachel Carson, ha mostrado una clara tendencia creciente, que se ha visto agravada en los últimos diez años, cuando se han acumulado pruebas concluyentes de que ciertos insecticidas resultan tóxicos para animales (incluidos humanos) y plantas contra los que no van dirigidos, desencadenan resistencia que está obligando a una dramática escalada en las dosis de aplicación, y se encuentran en niveles residuales tóxicos en aguas, suelos e, incluso, algunos alimentos. La posible solución a estos problemas, por la vía del abandono del uso de insecticidas, resulta hoy día simplemente impensable, pudiéndose sólo plantear el reemplazamiento parcial de los productos actuales por otros, de tipo diferente, que resulten más seguros.

La única alternativa que se vislumbra como posible a la lucha química contra insectos es el control biológico, encuadrándose dentro de esta opción lo que hasta ahora está siendo la contribución biotecnológica a este campo. La aproximación de la lucha biológica contra insectos no es reciente, ya que se remonta a unos 35 años, aunque sí merece destacarse el considerable empuje que está recibiendo últimamente. Sin embargo conviene ser realista y reconocer que su peso actual en el control de insectos

agrícolas es poco más que testimonial. En efecto, el mercado de bioinsecticidas está claramente dominado por productos derivados de *Bacillus thuringiensis*, los cuales pese a representar un 90% de dicho mercado sólo alcanzan un 1% del de insecticidas químicos. Pese a lo exiguo de estas cifras, resulta positivo que las ventas de productos Bt (esto es, procedentes de *B. thuringiensis*) se hayan doblado en los últimos cuatro años, y que sus expectativas actuales de crecimiento anual se cifran en un 20%.

B. thuringiensis, el organismo entomopatógeno sobre el que descansa la mayor parte de la lucha biológica contra insectos y sobre el que se están concentrando los principales desarrollos biotecnológicos en esta área, es una bacteria Gram-positiva del suelo que se caracteriza por la formación de esporas con inclusiones cristalinas. Estas inclusiones se componen de proteínas que tienen propiedades tóxicas para insectos, principalmente lepidópteros (mariposas), en su estado de larva. Existen toda una gama de proteínas parasporales, que se clasifican como CryI, II, III etc de acuerdo con su espectro de actividad, ya que cada proteína cristalina sólo resulta tóxica para un limitado número de especies de insectos (Höfte & Whiteley 1989). Realmente las referidas proteínas son más bien protoxinas. Su activación requiere la disolución del cristal, cosa que ocurre al valor alcalino (pH 10.2-10.5) del intestino medio de los lepidópteros, y la ruptura en una posición central de la cadena polipeptídica por parte de proteasas intestinales, lo que separa las mitades N-terminales de las protoxinas que son las toxinas activas (Goldburg & Tjaden 1990, Feiteson *et al.* 1992). Desde 1957, año en que se registró el "Thuridice" (Brunke & Meeusen 1991), se han estado comercializando preparados insecticidas de *B. thuringiensis*, consistentes en distintas formulaciones de esporas e inclusiones cristalinas liberadas tras la lisis de la bacteria durante su fase estacionaria de crecimiento. Estos biopesticidas, que han alcanzado una utilización relativamente amplia para el control de larvas de lepidópteros que constituyen plagas agrícolas, presentan una serie de inconvenientes que han venido constituyendo serios frenos a la expansión de su empleo. Sobre los dos más importantes, su limitado rango de huéspedes y su escasa persistencia, se ha dirigido una investigación biotecnológica muy activa que está originando resultados muy interesantes.

En relación con el estrecho espectro de huéspedes de *B. thuringiensis*, se han realizado amplios programas de búsqueda a nivel mundial de nuevos aislados bacterianos que presenten distintas especificidades. Estos trabajos han permitido caracterizar toxinas Bt activas no sólo frente a otros órdenes de insectos, como dípteros y coleópteros, sino también contra gusanos, nemátodos y protozoos, lo que hace probable que en un futuro no sólo puedan aparecer bioinsecticidas Bt de amplio espectro para su uso agrícola, sino también productos Bt específicos contra plagas animales. Además, los estudios de transformación realizados con *B. thuringiensis* permiten la transferencia de genes codificadores de distintas toxinas, los denominados genes *cry*, de unas estirpes a otras, posibilitando así la obtención de bacterias transgénicas con un más amplio espectro de actividad insecticida (Lereclus *et al.* 1992). Por lo que respecta a la persistencia, se están desarrollando nuevos tipos de formulaciones tendentes a incrementar

la vida media del biopesticida tras su aplicación. El método más satisfactorio es, posiblemente, el introducido por la firma norteamericana Mycogen, que utiliza toxinas Bt bioencapsuladas en células muertas de la bacteria *Pseudomonas fluorescens* que, previamente, ha sido transformada para producir tales toxinas. Este proceso, conocido como *CellCap*, es el único hasta ahora que, basado en tecnología de recombinación de DNA, ha originado productos que hayan alcanzado su explotación comercial. Otro procedimiento de "formulación" de indudable interés es la obtención de plantas transgénicas capaces de expresar toxinas Bt, esto es, de plantas insecticidas (Brunke & Meeusen 1991). Tal logro se consiguió por primera vez, en 1987, con tabaco, por investigadores de la firma belga Plant Genetic Systems (Vaeck *et al.* 1987) y, posteriormente de la norteamericana Agracetus (Barton *et al.* 1987), y tomate, por investigadores de la multinacional norteamericana Monsanto (Fischhoff *et al.* 1987), a las que posteriormente, seguirían otras especies vegetales caso, por ejemplo, del algodón (Perlak *et al.* 1990). Los mejores resultados se obtienen cuando se transfiere el gen trucado que codifica sólo a la porción N-terminal de la protoxina que, según se ha indicado, constituye la toxina Bt activa, y se manipula dicho gen para, sin cambiar la secuencia de aminoácidos codificada, hacerlo más similar, en estructura y frecuencia de codones, a los genes vegetales, hecho éste que produce un incremento espectacular en la expresión del gen (Perlak *et al.* 1990). Las plantas transformadas de esta manera se han mostrado resistentes al ataque de determinadas larvas de insectos no sólo en pruebas de laboratorio sino también de campo (Delannay *et al.* 1989).

El grato porvenir que parece aguardarle a los productos Bt, incluidas las plantas insecticidas, queda también patente por el alto número de compañías, no menos de 18, implicadas actualmente, a nivel de producción, investigación y desarrollo, en tales productos. Este futuro debe, sin embargo, salvar algunos escollos, entre los que el desarrollo de resistencia sería, sin duda, el más importante. Dicha amenaza parece ser algo más que una posibilidad, si tenemos en cuenta que ha podido obtenerse resistencia no sólo en el laboratorio sino también en campo, aunque asociada a un empleo abusivo de productos Bt (Van Rie 1991). Las plantas transgénicas productoras constitutivas de toxinas Bt podrían indudablemente contribuir a acelerar la aparición de resistencia. Investigadores de la importante empresa Ciba-Geigy, con notables intereses en el sector de agroquímicos, han intentado paliar este posible problema de una manera que a los ecologistas debe de ponerles muy nerviosos. Han obtenido plantas transgénicas que expresan el gen de una toxina Bt bajo el control de un promotor vegetal inducible, el de la proteína PR-1A de tabaco. La inducción de este gen y la producción de la entomotoxina se consigue, a voluntad, tras el tratamiento de la planta con un determinado activador químico (Williams *et al.* 1992), el cual está protegido por patente. Esto es, se evitan insecticidas químicos introduciendo plantas transgénicas que deben ser tratadas con productos químicos.

Otros tipos de organismos entomopatógenos, entre los que caben destacar a ciertos nemátodos y virus, parecen también interesantes de cara a su aplicación en la

lucha biológica contra insectos. Respecto a los primeros, se conocen un número de especies de nemátodos capaces de invadir a insectos del suelo y causarles enfermedad, más que por sí mismos por bacterias que portan, en algunos casos con resultado de muerte en un tiempo relativamente corto. Es público que determinadas empresas biotecnológicas, como la norteamericana Ecogen, tienen en avanzado estado de desarrollo diferentes biopesticidas basados en nemátodos entomopatógenos. Tales biopesticidas, al igual que ocurre a los derivados Bt, pecan de excesiva especificidad y requieren mejoras en su formulación de cara a incrementar la estabilidad del producto. Otra línea bastante prometedora de actuación biológica contra insectos se basa en los baculovirus, varios de los cuales han sido ya registrados como pesticidas en USA por la Agencia de Protección Ambiental (EPA) de dicho país. Se trata de virus de acción específica contra lepidópteros, que penetran en las células intestinales de la larva, desde donde, tras replicarse, invaden a otros tejidos, provocando afecciones fatales (Bouguerra 1992). Pese a su alta letalidad, la utilización de baculovirus como biopesticidas presenta la dificultad de que la acción patógena que ejercen progresa lentamente, tardando más de una semana en culminarse, lo que da a las larvas tiempo suficiente para producir daños importantes en los cultivos. Para evitar este inconveniente, los baculovirus se están modificando, por técnicas de ingeniería genética, siguiéndose dos diferentes estrategias. La primera consiste en transformarlos con genes heterólogos que codifican a toxinas u hormonas de insectos capaces de perturbar las funciones normales de la larva durante la infección (Carbonell *et al.* 1988, Maeda 1990, McCutchen *et al.* 1991, Stewart *et al.* 1991, Tomalski & Miller 1991, 1992), mientras que la segunda, menos explorada, consiste en la delección de los genes virales responsables del mantenimiento de la alimentación de la larva durante la infección (O'Reilly & Miller 1991).

Una vía alternativa de control de insectos podría derivar del aprovechamiento de mecanismos vegetales de defensa contra su acción depredadora. Apparentemente ciertas proteínas de semillas desempeñan un cometido protector ante insectos, debido a sus propiedades inhibitorias de enzimas digestivas como α -amilasas (Huesing *et al.* 1991) y, principalmente, proteinasas (García-Olmedo *et al.* 1987, Ryan 1990). Ciertos inhibidores de proteasas, concretamente de serín-proteasas, no sólo están presentes constitutivamente en determinadas semillas, sino que su producción resulta inducida en las partes vegetativas de dos solanáceas (tomate y patata) en respuesta al ataque de insectos fitófagos o ante la producción de heridas, lo que parece indicar que tal proceso constituye un mecanismo natural de defensa. La transferencia de los genes que codifican a los anteriores inhibidores puede representar, en consecuencia, una vía interesante para la obtención de plantas resistentes. Esta vía, a diferencia de las que implican a bacterias, nemátodos o virus entomopatógenos, se caracteriza por ser *a priori* de más amplio espectro, habida cuenta que los inhibidores mencionados no suelen presentar una alta especificidad (Brunke & Meeusen 1991). Los primeros comunicados dentro de esta línea se produjeron en 1987, el mismo año en que se obtuvieron las

primeras plantas transgénicas productoras de toxinas Bt, refiriéndose a la expresión en tabaco de dos genes de inhibidores de proteasas, el de un inhibidor de tripsina procedente de la semilla de una leguminosa (cowpea, *Vigna unguiculata*) (Hilder *et al.* 1987) y del inhibidor inducible de serínproteasas de hojas de patata (Thornburg *et al.* 1987). En el primero de los trabajos anteriores se comprobaba la adquisición por parte de la planta transformada de resistencia a determinados insectos herbívoros. En España, el grupo de García Olmedo y Carbonero, en la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid, han obtenido plantas transgénicas de tabaco y patata que expresan varios miembros de una familia de inhibidores de α -amilasa/tripsina procedentes de granos de trigo y cebada, las cuales muestran, en ciertos casos, resistencia a insectos (Carbonero 1992).

3.1.3. Control de enfermedades

Las plantas resultan susceptibles a una serie de organismos fitopatógenos, tales como viroides, virus, bacterias, hongos y nemátodos, siendo las enfermedades que éstos originan, principalmente las fúngicas, una causa importante de reducción en la productividad agrícola. El control de las anteriores enfermedades con pesticidas no resulta una solución óptima por una serie diversa de razones que van desde la poca seguridad medioambiental de algunos de estos productos (fungicidas) (Bouguerra 1988), pasando por su alto costo y, a veces, no excesiva efectividad, hasta la carencia en muchos casos de productos adecuados, como ocurre con las enfermedades víricas y bacterianas. Por todo ello existe un gran interés en explotar vías alternativas de control, basadas bien en la propia capacidad de defensa de los vegetales o en métodos de lucha biológica. Al margen de lo anterior, conviene dejar constancia de la importancia que para el control de enfermedades tiene la obtención de líneas o cultivares resistentes, bien sean obtenidos por la vía tradicional de la mejora clásica, que tan excelentes resultados ha producido y, a buen seguro, seguirá produciendo, como por la más novedosa de selección *in vitro* mediante cultivo de células (Cresswell 1991), una técnica por la que se han obtenido algunos resultados prometedores.

Las plantas son altamente eficientes en la lucha contra sus patógenos potenciales, como lo demuestra el hecho de que cada especie particular sea sólo susceptible a un rango muy pequeño de fitopatógenos, aunque los mecanismos responsables de este comportamiento distan de estar perfectamente esclarecidos. Aparentemente la resistencia vegetal a las enfermedades radica principalmente en fenómenos de reconocimiento temprano del agente invasor e inducción de respuestas defensivas. Investigaciones realizadas en los últimos años han permitido caracterizar una serie de presuntas respuestas defensivas de las plantas, entre las que podemos destacar las siguientes (Bowles 1990): 1) síntesis de ligninas y otros materiales, como callosa y glicoproteínas ricas en hidroxiprolina, que, al depositarse en la pared celular vegetal, la refuerzan frente al ataque por enzimas microbianas, impidiendo el avance de los patógenos; 2)

producción de una serie de proteínas, denominadas PR o relacionadas con la patogénesis, y, entre ellas, enzimas, como β -1, 3-glucanasa y quitinasa, capaces de digerir la pared de ciertos patógenos, hongos principalmente; y 3) formación de fitoalexinas o productos del metabolismo secundario vegetal dotados de actividad antibiótica. Las anteriores respuestas, y como consecuencia la resistencia, resultarían desencadenadas cuando se produjese un reconocimiento planta-patógeno el cual, aunque su mecanismo es básicamente desconocido, parece implicar, al menos en algunos casos, la interacción del producto de un gen de resistencia de la planta con el de un gen de avirulencia del patógeno. El fallo en tal reconocimiento, o en la capacidad de respuesta, sería, por contra, el causante de la enfermedad. En base a lo anterior, parece claro que la suplementación a nivel genético de cualquiera de los elementos anteriores podría mejorar la capacidad de resistencia de las plantas, lo que abre una vía clara para la intervención mediante ingeniería genética en este campo. No obstante, tal vía se encuentra con la dificultad de la falta de conocimientos fundamentales sobre los genes implicados directamente en el proceso de reconocimiento, los denominados genes de resistencia de la planta y de avirulencia del patógeno, y sobre el mecanismo exacto de dicho proceso de reconocimiento. Aunque avances claves en algunos de estos aspectos parecen estar muy próximos (North 1990, Lamb *et al.* 1992), de momento sólo se han producido actuaciones a nivel de respuestas defensivas, especialmente de aquellas que son de carácter monogénico. En esta línea, se han obtenido plantas transgénicas de *Nicotiana sylvestris* que mostraban un alto nivel de expresión constitutiva de un gen de quitinasa de tabaco (Neuhaus *et al.* 1991), y de tabaco y canola (*Brassica napus*) que hacían lo propio con un gen similar, pero de judía (Broglie *et al.* 1991, 1992). Mientras en el primer caso las plantas transformadas mantuvieron la susceptibilidad al patógeno *Cercospora nicotianae*, en el segundo adquirieron mayor resistencia al hongo fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. También se ha obtenido incremento de resistencia a este mismo hongo en tabaco transgénico que expresaba una proteína inactivadora de ribosomas procedente de cebada (Longemann *et al.* 1992). Igualmente se ha conseguido la expresión constitutiva en tabaco de algunas de las proteínas PR que se sintetizan de forma inducible en respuesta a, entre otras situaciones, la reacción de resistencia frente al virus del mosaico del tabaco (TMV). Así, la expresión constitutiva, por separado, de las proteínas denominadas PR-1 y PR-5 no tuvo ningún efecto sobre la respuesta al TMV (Cutt *et al.* 1989, Linthorst *et al.* 1989), aunque la primera de ellas retrasó la aparición de síntomas de la enfermedad causada por *Peronospora tabacina* (Lamb *et al.* 1992). Finalmente podemos hacer referencia a que se ha conseguido dotar a tabaco de la capacidad de síntesis de la fitoalexina resveratrol, mediante transferencia del gen de la estilbeno sintasa procedente de cacahuete (Hain *et al.* 1990), aunque no se ha comunicado si este hecho supone algún tipo de protección para la planta transgénica. En otro sentido, los conocimientos bioquímicos adquiridos sobre reacciones de defensa pueden brindar métodos alternativos de protección. Así, el descubrimiento del carácter inductor que sobre la expresión de tales reacciones tienen ciertos compuestos químicos simples podría ser la base de una nueva generación de productos agroquímicos, capaces de proteger a las plantas contra las enfermedades mediante la estimulación de los mecanismos defensivos propios.

El incremento de tolerancia a enfermedades no sólo puede conseguirse mejorando el potencial de defensa de la planta, sino que en algunos casos concretos resulta también posible actuar interfiriendo con el mecanismo de patogénesis. En este sentido, la expresión heteróloga de dianas insensibles a toxinas de patógenos (de la Fuente-Martínez *et al.* 1992), o de enzimas capaces de inactivar a estas toxinas (Meeley *et al.* 1992), o la sobreexpresión de inhibidores vegetales de poligalacturonasas fúngicas (Toubart *et al.* 1992), parecen ejemplos bastante prometedores.

Además de las vías anteriores, otra alternativa interesante al control de enfermedades, aunque también se encuentra en una fase bastante incipiente de su desarrollo, es la lucha biológica. Los estudios en este campo se centran principalmente en el control de ciertas enfermedades fúngicas especialmente difíciles de combatir, como algunas de postrecolección que afectan a numerosos frutos durante su almacenamiento, las causadas por oidios y por ciertos hongos del suelo. La estrategia de control se basa en la utilización de microorganismos hiperparásitos, esto es capaces de parasitar a otros parásitos, o antagonistas de los fitopatógenos, aunque también, a veces, pueden resultar de interés simples no patógenos o patógenos poco virulentos que, al desencadenar respuestas defensivas generalizadas en las plantas, las protegen frente al ataque de patógenos virulentos (resistencia o inmunidad adquirida). Entre microorganismos que están recibiendo especial atención como agentes de lucha biológica podemos citar a hongos del género *Trichoderma* (Baker 1989) y a bacterias fluorescentes del género *Pseudomonas* (Alabouvetu 1991). Los biofungicidas, aunque aún no han tenido un desarrollo equivalente al de los bioinsecticidas, están ya llegando al mercado, encontrándose un número significativo de ellos en fase más o menos avanzada de desarrollo. En un futuro, cuando se establezcan mejor los mecanismos subyacentes al control biológico, con toda seguridad se manipularán genéticamente a los microorganismos de interés en orden a obtener biopesticidas más eficaces.

Frente a la modesta contribución que, por el momento, ha realizado la biotecnología al área de la resistencia a patógenos microbianos, en el terreno específico de las enfermedades víricas la situación es notablemente mejor. En este caso, el fenómeno, descrito hace ya unos 60 años, de protección cruzada, o protección frente a virus por inoculación previa con un aislado poco virulento de dicho virus o de otro relacionado, ha permitido desarrollar métodos eficaces de lucha biológica contra importantes enfermedades víricas vegetales (Valle *et al.* 1988). Además, la protección cruzada ha conocido recientemente una variante espectacular, tras el descubrimiento de que la transferencia a plantas de los genes que codifican la proteína de la cubierta viral (Beachy *et al.* 1990, Lawson *et al.* 1990, Nedijat & Beachy 1990, Hill *et al.* 1991, Ling *et al.* 1991, MacKenzie *et al.* 1991) o del gen (cDNA) correspondiente al RNA satélite (Gerlach *et al.* 1987, Harrison *et al.* 1987, Tien & Wu 1991) pueden constituir vías para la consecución de una reacción similar de inmunización (Van den Elzen *et al.* 1989). Concretamente, el primero de los anteriores procedimientos se está utilizando ampliamente en la obtención de plantas transgénicas resistentes a determinados virus,

bastantes de las cuales se encuentran en fase de pruebas de campo (Nelson *et al.* 1988, Kaniewski *et al.* 1990, Jongedijk *et al.* 1992).

3.1.4. Tolerancia a condiciones ambientales adversas

Los estreses medioambientales son, obviamente, los factores con un mayor potencial limitante de la productividad agrícola. Entre ellos, la sequía es, tal vez, el que tiene una mayor incidencia general, pero otros como la salinidad o la exposición a temperaturas extremas son también muy importantes. Al igual que ocurre con otros agentes nocivos, existe una variabilidad individual y específica en la susceptibilidad de las plantas a condiciones ambientales adversas, la cual se ha venido explotando con buenos resultados en programas de mejora clásica. Por lo que respecta a las aproximaciones biotecnológicas, los logros conseguidos en este campo han sido más bien escasos. La selección *in vitro* para tolerancia a diferentes estreses ha conducido muy raramente a la regeneración de plantas que expresaran tales caracteres, habiéndose apuntado que la falta de conocimientos básicos sobre los mecanismos de resistencia constituyen, en estos casos, una dificultad considerable para el planteamiento de mejores estrategias de selección que la simple exposición al agente estresante (Tal 1983, Dracup 1991). Por lo que respecta a la mejora mediante técnicas de ingeniería genética, las perspectivas a corto plazo no son buenas, dada la doble dificultad impuesta por la falta de caracterización, tanto a nivel bioquímico como de biología molecular, de los genes implicados en las respuestas a agentes de estrés ambiental y por el más que probable carácter multigénico de tales respuestas. El estudio de proteínas inducidas por ácido abscísico, que es la hormona más relacionable con el estrés vegetal, o en situaciones de desecación, salinidad, etc, está permitiendo la identificación de genes que posiblemente desempeñan un papel defensivo ante este tipo de situaciones (Pagés & Gómez 1989) y cuya sobreexpresión o transferencia pudieran originar, en un futuro, plantas más tolerantes a determinados agentes de estrés. Mientras tanto, se están ensayando otras aproximaciones más parciales, como la sobreproducción de betaínas, prolina u otros osmoprotectores, dado que tales compuestos tienden a acumularse, como medida protectora, en situaciones de estrés hídrico y salino (McCue & Hanson 1990).

En el caso concreto de la tolerancia a bajas temperaturas, se han apuntado dos vías diferentes de actuación, tales como la manipulación, mediante ingeniería genética, del grado de insaturación de los ácidos grasos, en busca de una disminución de la temperatura de transición de fase de los lípidos membranales, y el control biológico de las bacterias inductoras de la nucleación del hielo. La primera vía, sólo planteada a nivel de posibilidad a experimentar, se apoya en la obtención de resistencia a bajas temperaturas en la cianobacteria *Anacystis nidulans* mediante la transferencia de un gen de desaturación de ácidos grasos procedentes de otra especie resistente (Wada *et al.* 1990). La segunda vía, que se encuentra, al menos, en una fase muy avanzada del proceso de precomercialización, se basa en el desplazamiento de la microflora epifítica

que normalmente coloniza la superficie aérea de las plantas por otra que, a diferencia de aquella, se componga de bacterias que carezcan de las proteínas que actúan como núcleos de cristalización en la formación del hielo (Suslow 1989, Wolber & Warren 1989, Wolber & Green 1990). Estas bacterias "hielo-menos", predominantemente de los géneros *Pseudomonas* y *Bacillus*, pueden ser tanto aislados naturales como mutantes obtenidos por técnicas clásicas o eliminando el gen de nucleación por técnicas de ingeniería genética. Ensayos de campo han indicado que con este procedimiento es posible rebajar de 3 a 5° C la temperatura de congelación.

3.2. AMPLIACIÓN DEL ESPECTRO Y COMPOSICIÓN DE LOS PRODUCTOS VEGETALES

Mientras que la primera ola de avance de la Biotecnología Agrícola se ha centrado prioritariamente en el desarrollo de aspectos concretos relativos al apartado que acabamos de revisar, lo que, como ya se ha apuntado, está de acuerdo con el papel de locomotora que, en buena parte, ha ejercido la industria agroquímica, la segunda ola de avance estará probablemente liderada por otras industrias, como la de alimentos y la farmacéutica, marco en el que, sin duda, resultará prioritario, más que el incremento de productividad de los cultivos, aunque éste siempre será, lógicamente, un objetivo deseable, el del espectro y composición de los productos vegetales (Knight 1989, Fraley 1992). Una serie de líneas de trabajo en curso pueden encuadrarse en este apartado, encontrándose, entre ellas, una que parece destinada a ser la primera en colocar un producto vegetal transgénico en el mercado. Nos estamos refiriendo a la línea de manipulación del proceso de maduración de frutos que, desarrollada por diferentes grupos y firmas comerciales, ha producido ya dos tipos de, lo que pudiéramos denominar, supertomates (Van Brunt 1992b). El primero puede madurar en la mata, pero permaneciendo firme durante un periodo de tiempo suficiente para permitir su comercialización, mientras que el segundo se puede mantener en la mata, sin madurar, durante más tiempo, con lo que, al parecer, se consigue incrementar su contenido en sólidos solubles y, en consecuencia, mejorar su sabor. La estrategia seguida en el primer caso ha sido la inhibición, vía RNA antisentido, de una enzima del fruto, la poligalacturonasa, que es la responsable de la degradación del cemento intercelular péctico que se produce durante la maduración. Aunque este proceso no afecta grandemente al ablandamiento del fruto, o al menos no es la única degradación hidrolítica de componentes de la pared vegetal con incidencia en el referido ablandamiento (Fischer & Bennett 1991, Picton *et al.* 1992), sí parece cierto que la inhibición de la poligalacturonasa incrementa la resistencia mecánica y a enfermedades postcosecha del tomate, características que resultan de gran valor comercial. En el segundo caso de tomates transgénicos, se ha suprimido la biosíntesis endógena de etileno, la fitohormona que desencadena los sucesos bioquímicos que originan la maduración (Picton *et al.* 1992). Esto se ha conseguido por varias vías, bien reprimiendo, también mediante RNA antisentido, las enzimas claves de la ruta biosintética de etileno (ACC sintasa y enzima formadora de etileno), o degradando, mediante la

expresión de genes microbianos, los precursores biosintéticos del etileno (SAM ó ACC) (Knight 1989, Klee *et al.* 1991, Bouzayen *et al.* 1992, Pictou *et al.* 1992, Van Brunt 1992b).

Dentro de la industria alimentaria y de piensos resulta de gran interés la manipulación del contenido y características de carbohidratos, lípidos y proteínas de determinados productos. Así, la producción de superiores cantidades de azúcares y almidón, o la de almidones con diferentes grados de ramificación y longitud de cadena, puede tener influencia en las propiedades texturales, de almacenamiento y cocción de diferentes alimentos. Dos enzimas del metabolismo glucídico vegetal que concentran gran interés son la ADP-glucosa pirofosforilasa (AGP) (Kleczkowski *et al.* 1991) y la sacarosa fosfato sintasa (SPS), debido a que su actividad es un factor determinante de los niveles de síntesis de, respectivamente, almidón y sacarosa. Recientemente se han descrito el incremento del contenido de almidón, en patatas transgénicas que habían recibido un gen bacteriano de AGP, y el desplazamiento del reparto del fotosintetizado hacia mayores niveles de sacarosa, en tomate que había sido transformado con un gen de SPS procedente de tabaco (Worrell *et al.* 1991, Fraley 1992). Por lo que respecta al campo de los lípidos, existe un alto interés en la modificación de la composición de ácidos grasos de aceites vegetales, tanto desde el punto de vista de su utilización en nutrición como para posibles usos industriales. También, como se ha indicado precedentemente, la manipulación del grado de insaturación de los lípidos de membrana puede ser conveniente, debido a su posible influencia en la respuesta de las plantas a temperaturas extremas. Aunque las anteriores características son susceptibles de manipulación por técnicas de mejora clásica, no cabe duda que la ingeniería genética habrá de producir espectaculares avances en este campo, aunque, tal vez, será necesario aguardar a adquirir una mejor comprensión de los mecanismos bioquímicos implicados en el reparto específico de ácidos grasos entre triglicéridos y otros tipos de lípidos (Browse & Somerville 1991, Somerville & Browse 1991). Finalmente, y en relación con la composición proteica, podemos destacar que la sobreexpresión de determinadas proteínas endógenas de alto contenido en aminoácidos esenciales o la expresión de proteínas foráneas de estas características, son procedimientos que se están ensayando para incrementar el valor nutritivo de semillas. En esta línea, caben destacar los trabajos encaminados a aumentar el contenido de proteínas ricas en metionina de semillas de amplio uso en la preparación de piensos, tales como maíz, que ya contiene un elevado nivel de este aminoácido, o soja, que es claramente deficitaria en el mismo (Altenbach & Simpson 1990). En otro orden de cosas, la expresión heteróloga de las proteínas vegetales de sabor dulce, monellina y thaumatina II, se está experimentando como vía de mejora de la sazón de ciertas frutas y otros productos agrícolas (Witty 1990, Peñarrubia *et al.* 1992).

Para terminar este apartado, dejaremos constancia del interés de la transformación de plantas de cara a su utilización como reactores en la fabricación de proteínas y enzimas de interés en la industria alimentaria, como es el caso de la producción de α -

amilasa bacteriana en tabaco (Pen *et al.* 1992), o farmacéutica (Krebbers & Vandekerckhove 1990), como es el caso de la producción en plantas de anticuerpos (Hiatt *et al.* 1989, Swain 1991), encefalinas (Vandekerckhove *et al.* 1989), interferón (De Zoelen *et al.* 1989) y seroalbúmina humana (Sijmons *et al.* 1990).

3.3. MEJORA DE PROCESOS BASICOS EN NUTRICION VEGETAL

Dentro de este objetivo, de indudable repercusión en la productividad agrícola y en los insumos que ésta necesita, nos referiremos a las posibilidades de intervención biotecnológica en dos procesos de especial significación respecto al metabolismo autotrófico vegetal, cuales son la fijación fotosintética del CO_2 y la fijación de nitrógeno. La enzima clave del primero de los anteriores procesos, la ribulosa bisfosfato carboxilasa oxigenasa (rubisco), no sólo es capaz de fijar CO_2 (reacción carboxilasa) sino también O_2 (reacción oxigenasa), hecho éste que constituye la base de la fotorrespiración, proceso opuesto al de fotosíntesis del CO_2 y que, en consecuencia, disminuye su rendimiento. Por tanto, la manipulación de la rubisco al objeto de rebajar su afinidad por el O_2 es un objetivo de potencial interés agronómico que, pese a estar planteado desde hace algún tiempo, no parece que acabe de dar resultados utilizables a nivel práctico. No obstante, los avances conseguidos en los estudios sobre biología molecular de la rubisco y la posibilidad de modificación, a voluntad, de la estructura de la enzima, mediante mutagénesis dirigida, abren buenas perspectivas a corto plazo (Eekes *et al.* 1987).

La importancia de la nutrición nitrogenada en el metabolismo vegetal está fuera de toda duda, siendo el aporte de este elemento uno de los principales determinantes de la productividad agrícola. A su vez, el fuerte uso de los abonos nitrogenados no sólo supone un capítulo importante en el costo de las cosechas sino, habida cuenta la alta solubilidad del nitrógeno nítrico, una preocupante fuente de contaminación para las aguas superficiales y subterráneas. Este doble problema tiene una teórica solución biotecnológica, puesto que existen microorganismos capaces de convertir en amoníaco el nitrógeno atmosférico, todo consistiría en transmitir por ingeniería genética a los cultivos los genes microbianos que codifican a las enzimas y cofactores necesarios para llevar a cabo este proceso de fijación de nitrógeno. De hecho, la transferencia a plantas, y concretamente a cereales, de esta capacidad fijadora de nitrógeno, es un objetivo que frecuentemente se esgrime como paradigma de los logros posibles en biotecnología agrícola. Sin embargo, tal objetivo no sólo no se ha alcanzado aún, sino que cada vez se duda más de su conveniencia, habida cuenta la complejidad, a nivel genético, del proceso de fijación de nitrógeno, la gran labilidad del sistema enzimático implicado, la nitrogenasa, que sólo trabaja en microambientes anaerobios, y el elevado coste de energía metabólica del proceso, lo que, caso de ser transferido a cosechas, indudablemente redundaría en pérdidas sensibles de productividad. Así las cosas, la investigación biotecnológica en esta área se centra en metas más modestas. Puesto que los organismos fijadores de nitrógeno son microorganismos simbióticos o de vida libre, y, prácticamente,

el único beneficio agronómico, de ahorro de fertilizantes nitrogenados, que se obtiene de esta actividad microbiana se deriva de la asociación simbiótica entre bacterias del género *Rhizobium* y plantas de la familia de las leguminosas, resultan destacables una serie de actuaciones biotecnológicas, algunas de las cuales ya han rendido frutos de interés aplicado, encaminadas a mejorar las asociaciones simbióticas tradicionales, a propiciar otras nuevas ampliando el espectro de huéspedes vegetales de *Rhizobium* y, finalmente, a conseguir un provecho agrícola de la fijación de nitrógeno que llevan a cabo determinadas bacterias de vida libre (Brill 1981, Eckes *et al.* 1987, McCormick 1988, Bryant 1991). Actuaciones en progreso que parecen muy importantes para la consecución de los objetivos anteriores son: 1) el mejor conocimiento de los genes bacterianos que controlan la interacción con la planta huésped, genes *nod* de nodulación, y del mecanismo de activación por señales específicas de ésta; 2) la utilización comercial, como inoculantes, de cepas de *Rhizobium* mejoradas, por mutagénesis o ingeniería genética, que son capaces de producir mayor cantidad de nitrogenasa o desarrollar el proceso con un menor coste energético, al contar con un sistema de hidrogenasa; y 3) la consecución de infección por *Rhizobium* de algunas especies vegetales que no son huéspedes de la bacteria y la adherencia a raíces de bacterias de vida libre, como *Azotobacter vinelandii*, capaces de fijar nitrógeno. De cara a un mejor aprovechamiento agronómico de la fijación de nitrógeno por organismos de vida libre y simbióticos resultaría muy deseable manipular la nitrogenasa de forma que la enzima no fuera reprimida por el nitrógeno amoniacal y, de ser posible, no resultase inhibida por el oxígeno molecular, logros ambos que no parecen de consecución inmediata.

4. VISION GLOBAL DE CONJUNTO Y ALGUNAS CONSIDERACIONES FINALES SOBRE LA BIOTECNOLOGIA AGRICOLA

Haciendo un gran esfuerzo de síntesis, podríamos resumir la situación actual de la Biotecnología Agrícola con la escueta afirmación de que su potencialidad supera a las realidades conseguidas. Los mayores avances se han producido en el área de las aplicaciones del cultivo de células y tejidos vegetales, mientras que en la más novedosa de la ingeniería genética de plantas las cosas van más lentas. Así, aunque se han logrado espectaculares éxitos en la transformación y regeneración de plantas fértiles en prácticamente todas las especies de alto interés agronómico, aún no se ha conseguido el aprovechamiento comercial de ninguna planta transgénica y las realizaciones que parecen de más inmediata aparición en el mercado son más bien escasas, tanto por lo que hace referencia a las características como a las especies vegetales manipuladas. Podemos calibrar mejor este aspecto si consideramos que de los 88 permisos concedidos el pasado año de 1991 en USA, por el Servicio de Sanidad Animal y Vegetal del Departamento de Agricultura, para hacer pruebas de campo con plantas transgénicas (Anónimo 1992), el 60% de los casos correspondieron, casi en proporciones idénticas, a ensayos de resistencia a herbicidas, a insectos (mediante expresión de la toxina Bt) y a virus (mediante expresión de la proteína de la cubierta), mientras que la mitad de las pruebas restantes abarcaron a cinco características diferentes (desde el control de

la maduración en tomate a la modificación de la composición grasa de la colza) y la otra mitad se refirieron a la expresión de caracteres de interés no directamente agronómico. El 80% de las pruebas anteriores se realizaron con sólo seis especies, concretamente patata, maíz, tomate, algodón, tabaco y soja.

Los avances de la ingeniería genética de plantas, que presumiblemente acabarán constituyendo la aportación más importante de la Biotecnología Agrícola, se ven retardados por una serie de dificultades científicas y técnicas, pudiéndose destacar, entre las primeras, los aún escasos conocimientos básicos que se poseen sobre el crecimiento y desarrollo vegetal y sobre la estructura, función y expresión de los genes que controlan características de gran importancia agronómica (Vasil 1990), mientras que, respecto a las segundas, resulta limitante que los métodos de transformación sólo permitan la transferencia de un número muy pequeño de genes. Pero, además, existen también dificultades de otro tipo, entre las que, sin pormenorizar, podríamos destacar el rechazo que en determinados sectores sociales recibe la ingeniería genética, la duda, manifestada por empresas del sector, de que los hallazgos puedan ser eficazmente protegidos por unas legislaciones sobre patentes que son altamente heterogéneas en los diferentes países del mundo, y los altos requisitos que pueden ser necesarios para la aprobación final de productos obtenidos por ingeniería genética.

Queda, finalmente, por plantear una cuestión esencial, cual es la posible repercusión que para la agricultura de los países del tercer mundo puede tener el desarrollo de la Biotecnología Agrícola. Para algunos, como Robert Fraley, vicepresidente de la compañía norteamericana Monsanto, una firma líder en el mercado mundial de agroquímicos y semillas, que se ha caracterizado, además, por haber apostado muy fuerte por la ingeniería genética de plantas, los avances en este terreno beneficiarán a todos, incluidos los países pobres, ya que todos tendrán fácil acceso a los mismos por la vía, tradicional y poco onerosa, de la semilla (Gasser & Fraley 1992). Sin embargo, otros no han opinado de la misma forma, habiendo mostrado su especial preocupación porque la posible revolución génica aplicada a la agricultura, al igual que en su día ocurriera con la revolución verde, sólo pueda ayudar a los países menos desfavorecidos del tercer mundo, y aún así, dentro de éstos, a los grandes agricultores más que a la mayoría de la población agrícola que, en estos países, la forman pequeños granjeros que llevan a cabo una agricultura de subsistencia. Problemas, con especial repercusión negativa para el tercer mundo, como la sustitución, para la obtención de determinadas materias primas, de cosechas tradicionales por otras, la excesiva industrialización de la agricultura, o el aumento de la dependencia tecnológica en la práctica agrícola, podran incrementarse, con bastante probabilidad, como consecuencia de los avances biotecnológicos (Bukman 1989). Aunque quepa alguna duda sobre la posición del punto de equilibrio entre ambas posturas, sí parece que deba uno congratularse por el amplio eco que las anteriores objeciones están teniendo en el mundo occidental, promovido especialmente desde determinados países como Holanda (Bunders 1988, Cohen 1989, Sarink 1989, de Graaf 1991, King 1991, Hodgson 1992), por lo que pueda

servir para propiciar proyectos biotecnológicos encaminados al tercer mundo. Para disipar dudas sobre la necesidad de este tipo de proyectos, baste recordar que de las grandes cosechas mundiales, tal vez la única que aún no ha sido transformada sea la mandioca, la base de la alimentación de buena parte de Africa.

Como conclusión, se podría convenir que la Biotecnología Agrícola es actualmente más una posibilidad bien fundamentada que una realidad concreta, que necesita una especial atención que evite algunos efectos potencialmente negativos para el medio ambiente y la introducción de desequilibrios perjudiciales para el tercer mundo, y, sobre todo, que merece un apoyo decidido al constituir una de las pocas vías capaces de dar enfoques novedosos a la solución de los problemas con que se enfrenta hoy la agricultura. Terminaré, entrando en el terreno de los deseos utópicos, haciendo una viva recomendación. Consiste ésta en que el parque tecnológico, que aparece incluido en la propuesta de diseño del nuevo Campus de esta Universidad en Rabanales, se rebauteice como parque biotecnológico agroalimentario, y que su promoción y desarrollo sean considerados como una tarea prioritaria no sólo por nuestra Universidad sino también por nuestras autoridades locales y autonómicas. Muchas gracias por su atención.

5. BIBLIOGRAFIA

- ALABOUVETTE C. 1991. La lucha biológica contra los hongos del suelo. Mundo Científico 11: 558-559.
- ALTENBACHS.B. & SIMPSON R.B. 1990. Manipulation of methionine-rich protein genes in plant seeds. Trends Biotechnol. 8: 156-160.
- ALTMASN S. 1990. Enzymatic cleavage of RNA by RNA. Angew. Chem. Int. Ed. Engl. 29: 749-758.
- ANONIMO 1992. US biotech field tests - 1991 round-up. Agrow (150): 9.
- BAKER R. 1989. Improved *Trichoderma* spp. for promoting crop productivity. Trends Biotechnol. 7: 34-38.
- BARSBY T.L., CHUONG P.V., YARROW S.A., et al. 1987. The combination of polima cms and cytoplasmic triazine resistance in *Brassica napus*. Theor. Appl. Genet. 73: 809-814.
- BARTON K., WHITELEY H. & YANG N.S. 1987. *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin in transgenic *Nicotiana tabacum* provides resistance to lepidopteran insects. Plant Physiol. 85: 1103-1109.
- BEACHY R.N., LOESCH-FRIES S. & TUMER N.E. 1990. Coat protein-mediated resistance against virus infection. Annu. Rev. Phytopathol. 28: 451-474.
- BEVERSDORF W.D., WEISS-LERMAN J., ERICKSON L.R. & SOUZA MACHADO V. 1980. Transfer of cytoplasmically-inherited triazine resistance from bird's rape to cultivated oilseed rape (*Brassica campestris* and *B. napus*). Can. J. Genet. Cytol. 22: 167-172.
- BIROT A.M., BOUCHEZ D., CASSE-DELBART F., et al. 1987. Studies and uses of the Ri plasmids of *Agrobacterium rhizogenes*. Plant Physiol. Biochem. 25: 323-335.

- BOUGUERRA M.L. 1988. Plaguicidas en los alimentos: un informe que hará época. *Mundo Científico* 8: 98-79.
- BOUGUERRA M.L. 1992. Los virus modificados: ¿Una nueva arma biológica contra orugas? *Mundo Científico* 12: 468-469.
- BOUZAYEN M., HAMILTON A., PICTON S., BARTON S. & GRIERSON D. 1992. Identification of genes for the ethylene-forming enzyme and inhibition of ethylene synthesis in transgenic plants using antisense genes. *Biochem. Soc. Trans.* 20: 76-79.
- BOWLES D.J. 1990. Defense-related proteins in higher plants. *Annu. Rev. Biochem.* 59: 873-907.
- BRILL W.J. 1981. *Microbiología agrícola. Investigación y Ciencia* (noviembre): 119-128.
- BROGLIE K., CHET I., HOLLIDAY M., *et al.* 1991. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science* 254: 1194-1197.
- BROGLIE R., BROGLIE K., CHET I. & BENHAMOU N. 1992. Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. 2nd EFPP Conference: Mechanisms of Plant Defence Responses, L 19. Strasbourg (France).
- BROWSE J. & SOMERVILLE C. 1991. Glycerolipid synthesis: biochemistry and regulation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 467-506.
- BRUNKE K.J. & MEEUSEN R.L. 1991. Insect control with genetically engineered crops. *Trends Biotechnol.* 9: 197-200.
- BRYANT J.A. 1991. Nitrogen fixation in plants: can *Rhizobium* live with nonlegume crops? *Trends Biotechnol.* 9: 79-80.
- BUKMAN P. 1989. The government role in biotechnology and development cooperation. *Trends Biotechnol.* 7: S27-S31.
- BUNDERS J. 1988. Appropriate biotechnology for sustainable agriculture in developing countries. *Trends Biotechnol.* 6: 173-180.
- CARBONELL L.F., HODGE H.R., TOMALSKI M.D. & MILLER L.K. 1988. Synthesis of a gene encoding an insect-specific scorpion neurotoxin and attempts to express it using baculovirus vectors. *Gene* 73: 409-418.
- CARBONERO P. 1992. La biotecnología y su aplicación a la agricultura. Jornadas Cotec sobre Biotecnología: Perspectivas de Aplicación de la Biotecnología en la Industria y el Medio Ambiente. Madrid, 2 y 3 de junio.
- CHALEFF R.S. 1986. Selection for herbicide-resistant mutants. En: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 4: Techniques and Applications* (D.A. Evans, W.R. Sharp & P.V. Ammirato, eds.), pp. 133-148. Macmillan, New York.
- CHALEFF R.S. & RAY T.B. 1984. Herbicide-resistant mutants from tobacco cell cultures. *Science* 223: 1148-1151.
- CHEUNG A.Y., BOGORAD L., VANMONTAGUM & SCHELL J. 1988. Relocating a gene for herbicide tolerance: a chloroplast gene is converted into a nuclear gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 391-395.
- CHRISTOU P., FORD T.L. & KOFRON M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important Indica and Japonica varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. *Bio/Technology* 9: 957-962.

- CRISTOU P., MACCABE D.E., MARTINELL B.J. & SWAIN W.F. 1990. Soybean genetic engineering: commercial production of transgenic plants. *Trends Biotechnol.* 8: 145-151.
- CLARK W.C. 1989. Gestión del planeta Tierra. Investigación y Ciencia (noviembre): 12-21.
- COCKING E.C. 1988. Producing fertile somatic hybrids. En: *Applications of Plant Cell and Tissue Culture* (Ciba Foundation Symposium 137), pp. 75-89. John Wiley & Sons, Chichester.
- COHEN J.I. 1989. Biotechnology research for the developing world. *Trends Biotechnol.* 7: 295-303.
- COMAIL., FACCIOTTID., HIATT W.R., THOMPSON G., ROSE R.E. & STALKER D.M. 1985. Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella thyphimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* 317: 741-744.
- CONNER A.J. & MEREDITH C.P. 1989. Genetic manipulation of plant cells. En: *The Biochemistry of Plants* vol. 15, pp. 653-688. Academic Press, San Diego.
- COTTEN M. 1990. The *in vivo* application of ribozymes. *Trends Biotechnol.* 8: 174-178.
- COUTTS R.H.A., BUCK K.W. & HAYES R.J. 1990. Development of geminivirus-based gene vectors for dicotyledonous plants. *Aust. J. Plant Physiol.* 17: 365-375.
- CREASON G.L. & CHALEFF R.S. 1988. A second mutation enhances resistance of a tobacco mutant to sulfonylurea herbicides. *Theor. Appl. Genet.* 76: 177-182.
- CRESWELL R. 1991. Improvement of plants via plant cell culture. En: *Plant Cell and Tissue Culture* (A. Stafford & G. Warren, eds.), pp. 101-123. Open University Press, Buckingham.
- CROCOMO O.J. & OCHOA-ALEJO N. 1983. Herbicide tolerance in regenerated plants. En: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol 1: Techniques for Propagation and Breeding* (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Yamada, eds.), pp. 770-781. Macmillan, New York.
- CUTT J.R., HARPSTER M.H., DIXON D.C., CARR J.P., DUNSMUIR P. & KLESSIG D.F. 1989. Disease response to tobacco mosaic virus in transgenic tobacco plants that constitutively express the pathogenesis-related PR 1b gene. *Virology* 173: 89-97.
- DRACUP M. 1991. Increasing salt tolerance of plants through cell culture requires greater understanding of tolerance mechanism. *Aust. J. Plant Physiol.* 18: 1-5.
- DAVIES J. 1987. La ingeniería genética. *Mundo Científico* 7: 704-713.
- DATTA S.K., PETERHAUS A., DATTA K. & POTRYKUS I. 1990. Genetically engineered fertile Indica-rice recovered from protoplast. *Bio/Technology* 8: 736-740.
- DE BLOCK M., HERRERA-ESTRELLA L., VAN MONTAGU M., SCHELL H. & ZAMBRYSKI P. 1984. Expression of foreign genes in regenerate plants and in their progeny. *EMBO J.* 3: 1681-1689.
- DE BLOCK M., BOTTERMAN J., VANDERWIELE M., *et al.* 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expressions of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6: 2513-2518.
- DE GRAAFF K. 1991. Biotechnology and sustainable development in the third world. *Trends Biotechnol.* 9: 297-299.

- DE GREEF W., DELON R., DE BLOCK M., LEEMANS J. & BOTTERMAN J. 1989. Evaluation of herbicide resistance in transgenic crops under field conditions. *Bio/Technology* 7: 61-64.
- DE LA FUENTE-MARTINEZ J.M., MOSQUEDA-CANO G., ALVAREZ-MORALES A. & HERRERA-ESTRELLA L. 1992. Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/Technology* 10: 905-909.
- DE ZOETEN G.A., PENSWICK J.R., HORISBERGER M.A., AHL P., SCHULTZE M. & HOHN T. 1989. The expression, localization and effect of a human interferon in plants. *Virology* 172: 213-222.
- DELANNAY X., LA VALLEE B.J., PROKSCH R.K., *et al.* 1989. Field performance of transgenic tomato plants expressing the *Bacillus thuringiensis* var. *kurstaki* insect control protein. *Bio/Technology* 7: 1265-1269.
- DELLA CIOPPA G., BAUER S.C., TAYLOR M.L., *et al.* 1987. Targeting a herbicide-resistant enzyme from *Escherichia coli* to chloroplasts of higher plants. *Bio/Technology* 5: 579-584.
- DONN G., TISCHER E., SMITH J.A. & GOODMAN H.M. 1984. Herbicide-resistant alfalfa cells: an example of gene amplification in plants. *J. Mol. Appl. Genet.* 2: 621-635.
- ECKESP., DONN G. & WENGENMAYER F. 1987. Genetic engineering with plants. *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 26: 382-402.
- EDGINGTON S.M. 1991. Taxol out of the woods. *Bio/Technology* 9: 933-938.
- EDGINGTON S.M. 1992. Ribozymes: stop making sense. *Bio/Technology* 10: 256-262.
- FEITELSON J.S., PAYNE J. & KIM L. 1992. *Bacillus thuringiensis*: insects and beyond. *Bio/Technology* 10: 271-275.
- FILLATTI J.J., KISER J., ROSE R. & COMAI L. 1987. Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology* 5: 726-730.
- FISCHER R.L. & BENNET A.B. 1991. Role of cell wall hydrolases in fruit ripening. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 675-703.
- FISCHHOFF D.A., BOWDISH K.S., PERLAK F.J., *et al.* 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* 5: 807-813.
- FLAVELL R.B., DART E., FUCHS R.L. & FRALEY R. T. 1992. Selectable marker genes: safe for plants? *Bio/Technology* 10: 141-144.
- FOWLER M.W. 1984. Time for plant cell culture? *Nature* 307:504.
- FRALEY R. 1992. Sustaining the food supply. *Bio/Technology* 10: 40-43.
- FROMM M.E., MORRIS F., ARMSTRONG C., WILLIAMS R., THOMAS J. & KLEIN T.M. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize. *Bio/Technology* 8: 833-839.
- FUJII J.A.A., SLADE D.T., REDENBAUGH K. & WALKER K.A. 1987. Artificial seeds for plant propagation. *Trends Biotechnol.* 5: 335-339.
- FUJITA Y. 1988. Industrial production of shikonin and berberine. *En: Applications of Plant Cell and Tissue Culture (Ciba Foundation Symposium 137)*, pp. 228-238. John Wiley & Sons, Chichester.

- GARCIA-OLMEDO F., SALCEDO G., SANCHEZ-MONGER., GOMEZ L., ROYO J. & CARBONERO P. 1987. Plant proteinaceous inhibitors of proteinases and α -amylases. Oxford. Surv. Plant Mol. Cell Biol. 4:275-334.
- GASSER C.S. & FRALEY R.T. 1989. Genetically engineering plants for crop improvement. Science 244: 1293-1299.
- GASSER C.S. & FRALEY R.T. 1992. Cultivos transgénicos. Investigación y Ciencia (agosto): 64-70.
- GERLACH W.L. & ROBAGLIA C. 1992. Los ribozimas. Mundo Científico 12: 1034-1041.
- GERLACH W.L., LLEWELLYN D. & HASELOFF J. 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. Nature 328: 802-805.
- GIBSON R.W., JONES M.G.K. & FISH N. 1988. Resistance to potato leaf roll virus and potato virus Y in somatic hybrids between dihaploid *Solanum tuberosum* and *S. brevidens*. Theor. Appl. Genet. 76:113-117.
- GILES K.L. & MORGAN W.M. 1987. Industrial-scale plant micropropagation. Trends Biotechnol. 5: 35-39.
- GLIMELIUS K., FAHLESON J., LANDGREN M., SJÖDIN C. & SUNDBERG E. 1991. Gene transfer via somatic hybridization in plants. Trends Biotechnol. 9: 24-30.
- GOLDBURG R.J. & TJADEN G. 1990. Are B.t.k. plants really safe to eat? Bio/Technology 8: 1011-1015.
- GORDON-KAMM W.J., SPENCER T.M., MANGANO M.L., et al. 1990. Transformation of maize cells and regeneration of fertile transgenic plants. Plant Cell 2: 603-618.
- GRESSEL J. 1985. Biotechnologically conferring herbicide resistance in crops: the present realities. En: Molecular Form and Function of the Plant Genome (L. van Vloten-Doting ed.), pp. 489-504. Plenum, New York.
- GRIERSON D., FRAY R.G., HAMILTON A.J., SMITH C.J.S. & WATSON C.F. 1991. Does co-suppression of sense genes in transgenic plants involve antisense RNA? Trends Biotechnol. 9: 122-123.
- GRIMSLEY N.H., HOHN T., DAVIES J.W. & HOHN B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. nature 325: 177-179.
- HAIN R., BIESELER B., KINDL H., SCHRÖDER H. & SCHRÖDER R. 1990. Expression of a stilbene synthase gene in *Nicotiana tabacum* results in synthesis of the phytoalexin resveratrol. Plant Mol. Biol. 15: 325-335.
- HARRISON B.D., MAYO M.A. & BAULCOMBE D.C. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. Nature 328: 799-802.
- HATZIOS K.K. 1987. Biotechnology applications in weed management: now and in the future. Adv. Agron. 41: 325-375.
- HERRERA-ESTRELLA L., DEPICKER A., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. 1983. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using Ti plasmid-derived vectors. Nature 303: 209-212.

- HIATT A., CAFFERKEY R. & BOWDISH K. 1989. Production of antibodies in transgenic plants. *Nature* 342: 76-78.
- HILDER V.A., GATEHOUSE A.M.R., SHEERMAN S.E., BARKER R.F. & BOULTER D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 330: 160-163.
- HILL K.K., JARVIS-EAGANN., HALK E.L., *et al.* 1991. The development of virus-resistant alfalfa, *Medicago sativa* L. *Bio/Technology* 9: 373-377.
- HINCHEE M.A.W., CONNOR-WARD D.V., NEWELL C.A., *et al.* 1988. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *Bio/Technology* 6: 915-922.
- HODGSON J. 1992. Biotechnology: feeding the world? *Bio/Technology* 10: 47-50.
- HÖFTE, H. & WHITELEY H.R. 1989. Insecticidal crystal proteins of *Bacillus thuringiensis*. *Microbiol. Rev.* 53: 242-255.
- HU C.Y. & WANG P.J. 1983. Meristem, shoot tip, and bud cultures. En: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding* (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.), pp. 177-227. Macmillan, New York.
- HUESING J.E., SHADE R.E., CHRISPEELS M.J. & MURDOCK L.L. 1991. α -Amylase inhibitor, not phytohemagglutinin, explains resistance of common bean seeds to cowpea weevil. *Plant Physiol.* 96: 993-996.
- HUGHES K. 1983. Selection for herbicide resistance. En: *Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding* (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.), pp. 442-460. Macmillan, New York.
- IZHAR S. & ZELCHER A. 1986. Protoplast fusion and generation of cybrids for transfer of cytoplasmic male sterility. En: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol. 3: Plant Regeneration and Genetic Variability* (I.K. Vasil ed.), pp. 589-599. Academic Press, New York.
- JONES M. 1988. Fusing plant protoplasts. *Trends Biotechnol.* 6: 153-158.
- JONGEDIJK E., SCHUTTER A.A.J.M., STOLTE T., VAN DEN ELZEN P.J.M. & CORNELISSEN B.J.C. 1992. Increased resistance to potato virus X and preservation of cultivar properties in transgenic potato under field conditions. *Bio/Technology* 10: 422-429.
- JORGENSEN R. 1990. Altered gene expression in plants due to *trans* interactions between homologous genes. *Trends Biotechnol.* 8: 340-344.
- JOSHI R.L. & JOSHI V. 1991. Strategies for expression of foreign genes in plants. Potential use of engineered viruses. *FEBS Lett.* 281: 1-8.
- KANIEWSKI W., LAWSON C., SAMMONS B., *et al.* 1990. Field resistance of transgenic Russet Burbank potato to effects of infection by potato virus X and potato virus Y. *Bio/Technology* 8: 750-754.
- KENNEDY M.J. 1991. The evolution of the word biotechnology. *Trends Biotechnol.* 9: 218-220.
- KEYFITZ N. 1989. El crecimiento demográfico. *Investigación y Ciencia* (noviembre): 72-83.
- KING D. 1991. New third world agriculture effort. *Bio/Technology* 9: 511.

- KISHORE G.M. & SHAH D.M. 1988. Amino acid biosynthesis inhibitors as herbicides. *Annu. Rev. Biochem.* 57: 627-663.
- KLECZKOWSKI L.A., VILLAND P., LÖNNEBORG A., OLSEN O.A. & LÜTHJE. 1991. Plant ADP-glucose pyrophosphorylase - Recent advances and biotechnological perspectives (a review). *Z. Naturforsch.* 46c: 605-612.
- KLEE H., HORSCH R. & ROGERS S. 1987. *Agrobacterium*-mediated plant transformation and its further applications to plant biology. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.
- KLEE H.J., HAYFORD M.B., KRETZNER K.A., BARRY G.F. & KISHORE G.M. 1991. Control of ethylene synthesis by expressions of a bacterial enzyme in transgenic plants. *Plant Cell* 3: 1187-1193.
- KLEIN T.M., ARENTZEN R., LEWIS P.A. & FITZPATRICK-MCELLIGOT S. 1992. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10: 286-291.
- KNIGHT P. 1989. Engineered fruit and vegetable crops. *Bio/Technology* 7: 1233-1237.
- KREBBERS E. & VANDEKERCKHOVE J. 1990. Production of peptides in plant seeds. *Trends Biotechnol.* 8:1-3.
- KROL. A.R. VAN DER, LENTING P.R., VEENSTRA J., *et al.* 1988. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flowers pigmentation. *Nature* 333: 866-86.
- LAMB C.J., RYALS J.A., WARD E.R. & DIXON R.A. 1992. Emerging strategies for enhancing crop resistance to microbial pathogens. *Bio/Technology* 10: 1436-1445.
- LANGLEY-DANISZ P. 1987. La biotecnología de los aditivos alimentarios. *Mundo Científico* 7: 764-770.
- LARKIN P.J. & SCOWCROFT W.R. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cell cultures for plants improvement. *Theor. Appl. Genet.* 60: 575-581.
- LARKIN P.J., TAYLOR B.H., GERSMANN M. & BRETTELL R.I.S. 1990. Direct gene transfer to protoplasts. *Aust. J. Plant Physiol.* 17: 291-302.
- LAWSON C., KANIEWSKI W., HALEY L., *et al.* 1990. Engineering resistance to mixed virus infection in a commercial potato cultivar: resistance to potato virus X and potato virus Y in transgenic Russet Burbank. *Bio/Technology* 8: 127-134.
- LEE M. & PHILLIPS R.L. 1988. The chromosomal basis of somaclonal variation. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 39: 413-437.
- LERECLUS D., VALLADE M., CHAUFaux J., ARANTES O. & RAMBAUD S. 1992. Expansion of insecticidal host range of *Bacillus thuringiensis* by *in vivo* genetic recombination. *Bio/Technology* 10: 418-421.
- LING K., NAMBA S., GONSALVES C., SLIGHTOM J.L. & GONSALVEZ D. 1991. Protection against detrimental effects of potyvirus infection in transgenic tobacco plants expressing the papaya ringspot virus coat protein gene. *Bio/Technology* 9: 752-758.
- LINTHORST H.J.M., MEUWISSEN R.L.J., KAUFFMANN S. & BOL J.F. 1989. Constitutive expression of pathogenesis-related proteins PR-1, GRP, and PR-S in tobacco has no effect on virus infection. *Plant Cell* 1: 285-291.

- LOGEMANN J., JACH G., TOMMERUP H., MUNDY J. & SCHELL J. 1992. Expression of a barley ribosome-inactivating protein leads to increased fungal protection in transgenic tobacco plants. *Bio/Technology* 10: 305-308.
- LYNN D.G. & CHANG M. 1990. Phenolic signals in cohabitation: implications for plant development. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 41: 497-526.
- LYON B.R., LLEWELLYN D.J., HUPPATZ J.L., DENNIS E.S. & PEACOCK W.J. 1989. Expression of a bacterial gene in transgenic tobacco plants confers resistance to the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid. *Plant Mol. Biol.* 13: 533-540.
- MAEDA S. 1990. Increased insecticidal effects by a recombinant baculovirus carrying a synthetic diuretic hormone gene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 165: 1177-1183.
- MACKENZIE D.J., TREMAINE J.H. & MACPHERSON J. 1991. Genetically engineered resistance to potato virus S in potato cultivar Russet Burbank. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 95-102.
- MAZUR M.J. & FALCO S.C. 1989. The development of herbicide resistant crops. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 441-470.
- MACCABE D.E., SWAIN W.F., MARTINELL B.J. & CHRISTOU P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Bio/Technology* 6: 923-926.
- MCCORMIK D. 1988. How biotech is dealing with its nitrogen fixation. *Bio/Technology* 6: 383-385.
- MCCUE K.F. & HANSON A.D. 1990. Drought and salt tolerance: towards understanding and application. *Trends Biotechnol.* 8: 358-362.
- MCCUTCHEN B.F., CHOUDARY P.V., CRENSHAW R., *et al.* 1991. Development of a baculovirus expressing an insect-selective neurotoxin: potential for pest control. *Bio/Technology* 9: 848-852.
- MEELEY R.B., JOHAL G.S., BRIGGS S.P. & WALTON J.D. 1992. A biochemical phenotype for a disease resistance gene of maize. *Plant Cell* 4: 71-77.
- MELCHERS G., SACRISTAN M.D. & HOLDER A.A. 1978. Somatic hybrid plants of potato and tomato regenerated from fused protoplasts. *Carlsberg Res. Commun.* 43: 203-218.
- MIKI B.L., LABBÉ H., HATTORI J., *et al.* 1990. Transformation of *Brassica napus* canola cultivars with *Arabidopsis thaliana* acetoxyacid synthase genes and analysis of herbicide resistance. *Theor. Appl. Genet.* 80: 449-458.
- MILLER D.R., WASKOM R.M., BRICK M.A. & CHAPMAN P.L. 1991. Transferring *in vitro* technology to the field. *Bio/Technology* 9: 143-146.
- MOL J.N.M., STUITJE A.R. & KROL A. VAR DER 1989. Genetic manipulation of floral pigmentation genes. *Plant Mol. Biol.* 13: 287-294.
- MORRISON R.A. & EVANS D.A. 1988. Haploid plants from tissue culture: new plant varieties in a shortened time frame. *Bio/Technology* 6: 684-690.
- NEJIDAT A. & BEACHY R.N. 1990. Transgenic tobacco plants expressing a coat protein gene of tobacco mosaic virus are resistant to some other tobamoviruses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 247-251.

- NELSON R.S., MCCORMICK S.M., DELANAY X., *et al.* 1988. Virus tolerance, plant growth, and field performance on transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/Technology* 6: 403-409.
- NEUHAUS J.M., AHL-GOY P., HINZ U., FLORES S. & MEINS F. 1991. High-level expression of a tobacco chitinase gene in *Nicotiana glauca*. Susceptibility of transgenic plants to *Cercospora nicotianae* infection. *Plant Mol. Biol.* 16: 141-151.
- NORTH G. 1990. The race for resistance genes. *Nature* 347: 517.
- O'REILLY D.R. & MILLER L.K. 1991. Improvement of a baculovirus pesticide by deletion of the *egt* gene. *Bio/Technology* 9: 1086-1089.
- OXTOBY E. & HUGHES M.A. 1990. Engineering herbicide tolerance into crops. *Trends Biotechnol.* 8: 61-65.
- PAGES M. & GOMEZ J. 1989. ¿Maíz en el desierto? *Mundo Científico* 9: 162-163.
- PASZKOWSKI J., SHILLITO R.D., SAUL M., MANDAK V., HOHN T., HOHN B. & POTHYKUS I. 1984. Direct gene transfer to protoplast. *EMBO J.* 3: 2717-2722.
- PEN J., MOLENDIJK L., QUAX W.J., *et al.* 1992. Production of active *Bacillus licheniformis* alpha-amylase in tobacco and its application in starch liquefaction. *Bio/Technology* 10: 292-296.
- PENARRUBIA L., KIM R., GIOVANNONI J., KIM S.H. & FISCHER R.L. 1992. Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 561-564.
- PERLAK F.J., DEATON R.W., ARMSTRONG T.A., *et al.* 1990. Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* 8: 939-943.
- PETERS N.K. & VERMA D.P.S. 1990. Phenolic compounds as regulators of gene expression in plant-microbe interactions. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 3: 4-8.
- PICTON S., HAMILTON A., FRAY R., *et al.* 1992. Modifying gene expression and ripening in transgenic tomatoes. En: *Profiles on Biotechnology* (T.G. Villa & J. Abalde, eds.), pp. 645-656. Servicio Publicaciones, Univ. Santiago.
- POTRYKUS I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8: 535-543.
- POTRYKUS I. 1991. Gene transfer to plants: assessment of published approaches and results. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225.
- PRIMROSES B. 1991. Plant cell, tissue and organ culture. En: *Molecular Biotechnology* 2nd ed., 153-164. Blackwell, Oxford.
- QUAK F. 1977. Meristem culture and virus-free plants. En: *Applied and Fundamental Aspects of Plants Cell, Tissue and Organ Culture* (J. Reinert & Y.P.S. Bajaj, eds.), pp. 598-615. Springer-Verlag, Berlin.
- RANCH J.P., OGLESBY L. & ZIELINSKI A.C. 1985. Plant regeneration from embryo-derived tissue cultures of soybean. *In Vitro* 21: 653-658.
- RATNER M. 1990. Identifying quantitative traits in plants. *Bio/Technology* 8: 401-403.
- RHODES C.A., PIERCE D.A., METTLER I.J., MASCARENHAS D. & DETMAR J.J. 1988. Genetically transformed maize plants from protoplasts. *Science* 240: 204-207.
- RIVES M. 1984. La mejora de las plantas. *Mundo Científico* 4: 760-773.
- ROSE R.J., THOMAS M.R. & FITTER J.T. 1990. The transfer of cytoplasmic and nuclear genomes by somatic hybridisation. *Aust. J. Plant Physiol.* 17: 303-321.

- ROSSI J.J. & SARVER N. 1990. RNA enzymes (ribozymes) as antiviral therapeutic agents. *Trends Biotechnol.* 8: 179-183.
- RUCKELSHAUS W.D. 1989. Hacia un mundo viable. *Investigación y Ciencia* (noviembre): 126-134.
- RYAN C.A. 1990. Proteinase inhibitors in plants: genes for improving defenses against insects and pathogens. *Annu. Rev. Phytopathol.* 28: 425-449.
- SANFORD J.C. 1988. The biolistic process. *Trends Biotechnol.* 6: 299-302.
- SARINK H. 1989. Biotechnology and agriculture: shared views and collective action? *Trends Biotechnol.* 7: S8-S13.
- SCHMAUDER H.P. & DOEBEL P. 1990. Plant cell cultivation as a biotechnological method. *Acta Biotechnol.* 10: 501-516.
- SCHULZ A., WENGENMAYER F. & GOODMAN H.M. 1990. Genetic engineering of herbicide resistance in higher plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9: 1-15.
- SCOWCROFT W.R. & LARKIN P.J. 1988. Somaclonal variation. En: *Applications of Plant Cell and Tissue Culture* (Ciba Foundation Symposium 137), pp. 21-35. John Wiley & Sons, Chichester.
- SHAH D.M., HORSCHR B., KLEE H.J., *et al.* 1986. Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* 233: 478-481.
- SHIMAMOTO K., TERADAR., IZAWA T. & FUJIMOTO H. 1989. Fertile transgenic rice plants regenerated from transformed protoplasts. *Nature* 338: 274-276.
- SIJMONS P.C., DEKKER B.M.M., SCHRAMMEIJER B., VERWOERD T.C., VAN DEN ELZEN P.J.M. & HOEKEMA A. 1990. Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Bio/Technology* 8: 217-221.
- SINGERS S.S. & MCDANIEL C.N. 1985. Selection of glyphosate-tolerant tobacco calli and the expression of this tolerance in regenerated plants. *Plant Physiol.* 78: 411-418.
- SJÖDIN C. & GLIMELIUS K. 1989. *Brassica naponigra*, a somatic hybrid resistant to *Phoma lingam*. *Theor. Appl. Genet.* 77: 651-656.
- SMART C.C., JOHÄNNING D., MÜLLER G. & AMRHEIM N. 1985. Selective overproduction of 5-enol-pyruvylshikimic acid 3-phosphate synthase in plant cell culture which tolerates high doses of the herbicide glyphosate. *J. Biol. Chem.* 260: 16338-16346.
- SMITH M.K. & DREW R.A. 1990. Current applications of tissue culture in plant propagation and improvement. *Aust. J. Plant Physiol.* 17: 267-289.
- SOMERVILLE C. & BROWSE J. 1991. Plant lipids: metabolism, mutants, and membranes. *Science* 252: 80-87.
- STACHEL S.E., TIMMERMAN B. & ZAMBRYSKI P. 1986. Generation of single-stranded T-DNA molecules during the initial stages of T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to plant cells. *Nature* 322: 706-712.
- STAFFORD A. 1991a. Genetics of cultured plant cells. En: *Plant Cell and Tissue Culture* (A. Stafford & G. Warren, eds.), pp. 25-47. Open University Press, Buckingham.
- STAFFORD A. 1991b. Natural products and metabolites from plants and plant tissue cultures. En: *Plant Cell and Tissue Culture* (A. Stafford & G. Warren, eds.), pp. 124-162. Open University Press, Buckingham.

- STALKER D.M., MCBRIDE K.E. & MALYJ L.D. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. *Science* 242: 419-423.
- STEWART L.M.D., HIRST M., FERBER L.M., MERRYWEATHER A.T., CAYLEY P.J. & POSSEE R. D. 1991. Construction of an improved baculovirus insecticide containing an insect-specific toxin gene. *Nature* 352: 85-88.
- STROBEL G.A. 1991. Control biológico de malas hierbas. *Investigación y Ciencia* (septiembre): 52-58.
- SUSLOW T. 1989. Ice nucleation and the deliberate release of genetically engineered microorganisms. *Trends Biochem. Sci.* 14: 180.
- SWAIN W.F. 1991. Antibodies in plants. *Trends Biotechnol.* 9: 107-109.
- TAL M. 1983. Selection for stress tolerance. En: *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 1: Techniques for Propagation and Breeding (D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato & Y. Yamada, eds.), pp. 461-488. Macmillan, New York.
- THERRE H. & SAUCLIERES G. 1988. Manipulación genética: las flores cambian de color. *Mundo Científico* 8: 1168-1169.
- THOMPSON C.J., MOVVA N.R., TIZARD R., *et al.* 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. *EMBO J.* 6: 2519-2523.
- THORNBURG R., AN G., CLEVELAND T., JOHNSON R. & RYAN C. 1987. Wound-inducible expression of a potato inhibitor II-chloramphenicol acetyl transferase gene fusion in transgenic tobacco plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84: 744-748.
- TIEN P. & WU G. 1991. Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv. Virus Res.* 39: 321-339.
- TOMALSKI M.D. & MILLER L.K. 1992. Expression of a paralytic neurotoxin gene to improve insect baculoviruses as biopesticides. *Bio/Technology* 10: 545-549.
- TORIYAMA K., ARIMOTO Y., UCHIMIYA H. & HINATA K. 1988. Transgenic rice plants after direct transfer into protoplasts. *Bio/Technology* 6: 52-57.
- TOUBART P., DESIDERIO A., SALVIG., *et al.* 1992. Cloning and characterization of the gene encoding the endopolygalacturonase-inhibitiin protein (PGIP) of *Phaseolus vulgaris* L. *Plant J.* 2: 367-373.
- TOULME J.J. 1987. Una nueva clase de agentes biológicos: los ARN antimensajeros. *Mundo Científico* 7: 318-320.
- UMBRECK P., JOHNSON G., BARTON K. & SWAIN W. 1987. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants. *Bio/Technology* 5: 263-266.
- VAECK M., REYNAERTS A., HOFTE H., *et al.* 1987. Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* 328: 33-37.
- VALLE R.P.C., SKRZECZKOWSKI J., MORCH M.D., *et al.* 1988. Plant viruses and new perspectives in cross-protection. *Biochimie* 70: 695-703.
- VAN BRUNT J. 1992a. Fishing for genes. *Bio/Technology* 10: 853.
- VAN BRUNT J. 1992b. The battle of engineered tomatoes. *Bio/Technology* 10: 748.
- VAN DEN ELZEN P.J.M., HUISMAN M.J., WILLINK D.P.L., JONGEDIJK E., HOEKEMA A. & CORNELISSEN B.J.C. 1989. Engineering virus resistance in agricultural crops. *Plant. Mol. Biol.* 13: 337-346.
- VAN RIE J. 1991. Insect control with transgenic plants: resistance proof? *Trends Biotechnol.* 9: 177-179.

- VANDEKERCKHOVE J., VAN DAMME J., VAN LIJSEBETTENS M., *et al.* 1989. Enkephalins produced in transgenic plants using modified 2S seed storage proteins. *Bio/Technology* 7: 929-932.
- VASIL I.K. (ed.) 1986. *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Vol. III: Plant Regeneration and Genetic Variability. Academic Press, New York.
- VASIL I.K. 1988. Progress in the regeneration and genetic manipulation of cereal crops. *Bio/Technology* 6: 397-402.
- VASIL V., CASTILLO A.M., FROMM M.E. & VASIL I.K. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10: 667-674.
- WADA H., GOMBOS Z. & MURATA N. 1990. Enhancement of chilling tolerance of a cyanobacterium by genetic manipulation of fatty acid desaturase. *Nature* 347: 202-203.
- WARREN G. 1991a. Protoplast isolation and fusion. En: *Plant Cell and Tissue Culture* (A. Stafford & G. Warren, eds.), pp. 48-81. Open University Press, Buckingham.
- WARREN G. 1991b. The regeneration of plants from cultured cells and tissues. En: *Plant Cell and Tissue Culture* (A. Stafford & G. Warren, eds.), pp. 82-100. Open University Press, Buckingham.
- WEINTRAUB H.M. 1990. ARN y ADN antisentido. *Investigación y Ciencia* (marzo): 26-33.
- WHITAKER R.J. & HASHIMOTO T. 1986. Production of secondary metabolites. En: *Handbook of Plant Cell Culture*. Vol. 4: Techniques and Applications (D.A. Evans, W.R. Sharp & P.V. Ammirato, eds.), pp. 264-286. Macmillan, New York.
- WILLIAMS S., FRIEDRICH L., DINCHER S., *et al.* 1992. Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 540-543.
- WITTY M. 1990. Thaumatin II - a palatability protein. *Trends Biotechnol.* 8: 113-116.
- WOLBER P.K. & GREEN R.L. 1990. Detection of bacteria by transduction of ice nucleation genes. *Trends Biotechnol.* 8: 276-279.
- WOLBER P. & WARREN G. 1989. Bacterial ice-nucleation proteins. *Trends Biochem. Sci.* 14: 179-181.
- WORREL A.C., BRUNEAU J.M., SUMMERFELT K., BOERSIG M. & VOELKER T.A. 1991. Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* 3: 1121-1130.
- ZAMBRYSKI P., JOOS H., GENETELLO C., LEEMANS J., VAN MONTAGU M. & SCHELL J. 1983. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. *EMBO J.* 2: 2143-2150.
- ZIMMERMAN R.H., GRISEBACH R.J., HAMMERSCHLAG F.A. & LAWSON R.H. (eds.) 1986. *Tissue Culture as a Plant Production System for Horticultural Crops*. Martinus Nijhoff, Dordrecht.

NOTA: Muchos trabajos biotecnológicos se caracterizan por estar firmados por numerosos autores. En los casos en que éstos superaban a seis, hemos optado por sólo indicar los tres primeros firmantes seguidos por *et al.*