

Parte C

**Aplicaciones de Técnicas Bioquímicas y
Moleculares al Cultivo de Tejidos Vegetales**

Capítulo 33

Ingeniería genética y cultivo de tejidos

A. Calderón*

W. M. Roca*

J. Jaynes**

* Unidad de Investigación en Biotecnología (UIB), Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia.

** Department of Biochemistry, Louisiana State University, Baton Rouge, Louisiana, E. U.

Introducción

En los últimos 50 años, el mejoramiento tradicional de plantas, combinado con prácticas agrícolas perfeccionadas y enriquecido con tecnología moderna, ha incrementado la producción agrícola destinada a la alimentación humana y animal. La ingeniería genética ofrece, por medio de la biotecnología agrícola, nuevos elementos de análisis a nivel de las moléculas, las células y los tejidos para comprender mejor las características agronómicas de las plantas y, por consiguiente, para manipularlas.

Tanto la ingeniería genética —también llamada tecnología del ADN recombinante— como la biología molecular en general se están aplicando actualmente para modificar caracteres unigénicos como la resistencia vegetal a virus e insectos, o el incremento de la calidad nutricional de las plantas mediante una proteína rica en aminoácidos esenciales y codificada por un solo gen. En los últimos 15 años se ha levantado, en el campo agrícola, una gran pirámide de conocimientos básicos y aplicados que crece con rapidez.

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se ha convertido en el eje sobre el cual giran las nuevas tecnologías del mejoramiento genético de las plantas y un mejor conocimiento de los procesos genéticos y fisiológicos de éstas. Las condiciones medioambientales del cultivo *in vitro* (luz, temperatura, hormonas, nutrimentos) favorecen, en gran medida, esa tendencia, porque son controlables y facilitan por ello el aprendizaje de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas.

El fitomejoramiento, es decir, la introducción de características útiles en las plantas por medio de las técnicas tradicionales de Mendel, ha transformado el mundo haciendo la llamada 'revolución verde'. Sin embargo, las técnicas tradicionales son dispendiosas y consumen gran cantidad de tiempo para seleccionar y establecer una característica particular y deseable en un cultivar; a menudo, es imposible incorporar algunas características empleando estos medios convencionales. La tecnología del ADN recombinante, en cambio, posee un gran potencial para la introducción de características deseables en las plantas. No obstante, esta tecnología no debe considerarse como un fin sino como un instrumento adicional para alcanzar el objetivo final de modificar y mejorar las plantas.

En este capítulo se describirá el estado actual de la manipulación genética dentro del campo del mejoramiento genético y de la nueva biotecnología.

Conceptos Fundamentales

La ingeniería genética, o técnica del ADN recombinante o manipulación genética, podría definirse, muy ampliamente, del modo siguiente: es la técnica con que se forman artificialmente combinaciones nuevas de material hereditario (ADN, ARN) mediante la inserción de moléculas de ácidos nucleicos —producidas fuera de la célula— dentro de virus, plásmidos bacterianos u otro vector de ácidos nucleicos; estos vectores incorporan las nuevas moléculas de ácido nucleico dentro de un organismo hospedante, en el cual éstas no se hallan presentes en condiciones naturales pero pueden ser replicadas. La publicación, en 1972, del trabajo realizado en el laboratorio del Dr. Paul Berg (Jackson et al., 1972) comenzó el desarrollo de la que posteriormente se llamaría técnica del ADN recombinante.

Un adelanto significativo en el desarrollo de la manipulación genética lo constituyeron, indudablemente, el estudio de los procesos de restricción (Arber y Linn, 1969) del ADN del bacteriófago lambda y el estudio de la modificación del ADN (Meselson y Yuan, 1968) de la bacteria *Escherichia coli* en su proceso de infección. El fenómeno de restricción se debe al fraccionamiento enzimático del ADN infectante por medio de enzimas de restricción, mientras que el de modificación es el resultado de la metilación del ADN del organismo hospedante mediante enzimas metilasas, reacción que evita el fraccionamiento del ADN del mismo hospedante por las enzimas de restricción. Estas enzimas son las que más se utilizan en la manipulación genética. Se conocen tres clases de enzimas de restricción, los tipos I, II y III (Yuan, 1981). Hasta 1985 se habían clasificado y catalogado 355 de tales enzimas (Kessler et al., 1985) y en los últimos años esta lista ha crecido casi a diario. Las enzimas de restricción de tipo II, que son las más usadas en la manipulación genética, reconocen y cortan el ADN en una secuencia particular de tetra, penta, hexa o heptanucleótidos que tienen un eje de simetría rotacional. Estas secuencias se llaman también palíndromos por analogía con las palabras que se pueden leer de igual manera de adelante hacia atrás y viceversa.

El Cuadro 33.1 presenta una lista de las enzimas de restricción más comunes. La investigación con enzimas ha evolucionado hasta tal punto que ya existen enzimas sintéticas que cortan el ADN en los sitios específicos en que lo hacen sus homólogos purificados de los microorganismos (Sluka et al., 1987). Estas enzimas sintéticas combinan secuencias de polipéptidos que identifican secuencias específicas de ADN, con secuencias de polipéptidos capaces de cortar la molécula de ADN por donde están aquéllas secuencias identificadas.

Cuadro 33.1. Lista de algunas enzimas de restricción y de sus secuencias de segmentación.

Microorganismo de origen	Enzima (abreviatura)	Secuencias específicas de segmentación ^a
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i> H	BamHI	↓ GGATCC CCTAGG ↑
<i>Escherichia coli</i>	EcoRI	↓ GAATTC CTTAAG ↑
<i>Haemophilus aegyptius</i>	HaeIII	↓ GGCC CCGG ↑
<i>Haemophilus influenzae</i>	HindIII	↓ AAGCTT TTCGAA ↑
<i>Providentia stuartii</i> 164	PstI	↓ CTGCAG GACGTC ↑
<i>Streptomyces albus</i> G	SalI	↓ GTCGAC CAGCTG ↑

a. Las flechas (↑ ↓) indican el sitio de corte.

Otro descubrimiento importante que ha impulsado la manipulación genética es el aislamiento de los plásmidos bacterianos y su caracterización. Los plásmidos son ADN extracromosómico circular que se encuentra en la mayoría de los microorganismos gram-positivos y gram-negativos y en algunas levaduras, pero no en eucariotes superiores (Helinski, 1979). Para que puedan utilizarse como vehículos de clonamiento de moléculas de ADN, los plásmidos deben tener las tres propiedades siguientes:

- bajo peso molecular;
- genes que faciliten la selección cuando estén en células hospedantes, es decir genes marcadores;
- sitios únicos para el corte con enzimas de restricción, preferiblemente en genes que codifiquen para un fenotipo fácilmente detectable.

La manipulación de estos plásmidos para lograr la integración de moléculas 'pasajeras' se hace fuera de las células. Una vez construido, el vector se

trasporta dentro de una célula hospedante, la cual se encargará de multiplicarlo. En la Figura 33.1 se describe la genealogía de uno de los más populares vectores de clonamiento: el pBR322 (Sutcliffe, 1979); en la Figura 33.2 se describe una estrategia general de clonamiento con el pBR322. El lector interesado en clonamiento de genes puede consultar el excelente libro de Winnacker (1987).

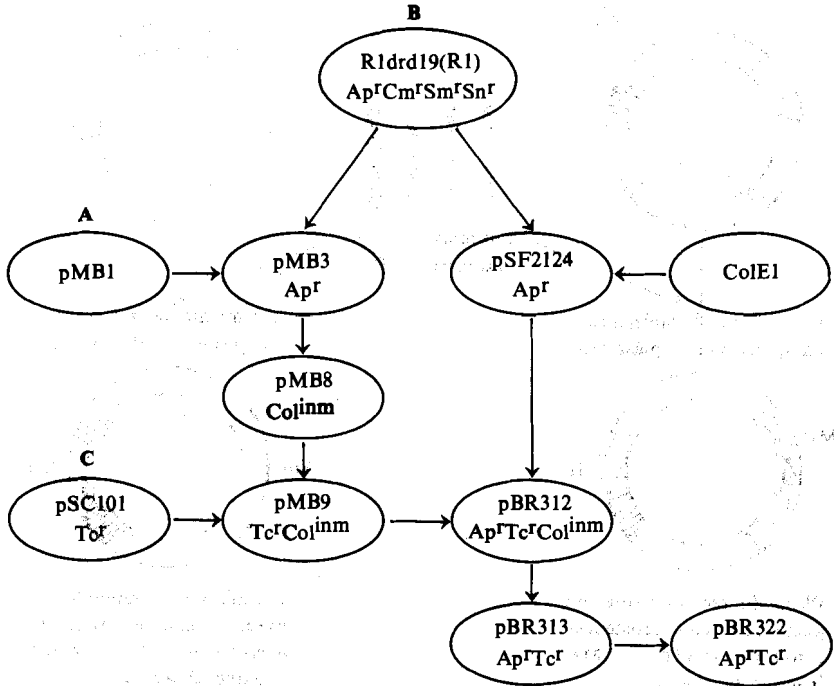


Figura 33.1. Genealogía del plásmido pBR322 en la cual aparecen: A) replicación de pMB1; B) el transposón Tn3 de resistencia a la ampicilina obtenido del plásmido R1d19; y C) el gen de resistencia a tetraciclina proveniente del pSC101.

Trasformación Genética en los Vegetales

Básicamente, hay dos sistemas para introducir genes en el genoma de las plantas: la transferencia directa y la transferencia mediada por bacterias del género *Agrobacterium*. El primero consiste en la introducción directa de genes empleando técnicas como la microinyección o el bombardeo de

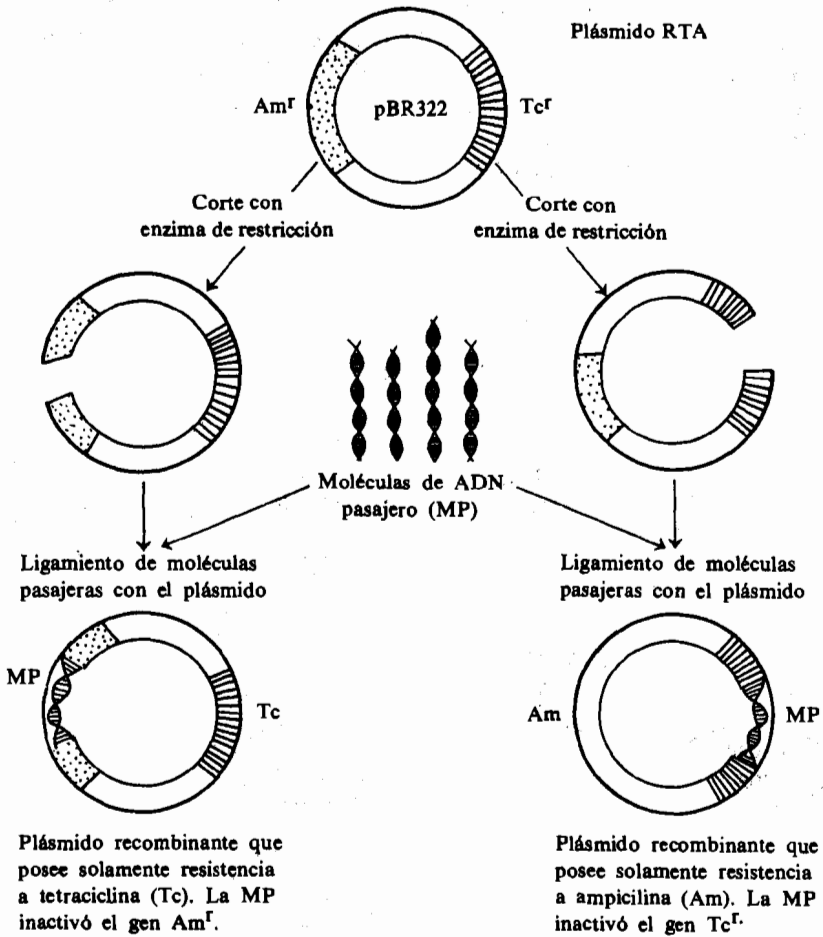


Figura 33.2. Estrategia de clonamiento en el plásmido pBR322. RTA = plásmido resistente a la tetraciclina y a la ampicilina; MP = molécula pasajera.

partículas de oro con un acelerador de partículas. El segundo utiliza las propiedades biológicas de la bacteria del suelo *Agrobacterium* sp. para introducir el ADN foráneo.

Introducción directa de genes

Se considera que la introducción directa de genes es una transformación de las moléculas de ADN dentro de la célula vegetal sin la mediación de los

microorganismos. La transformación puede ser mediada por sistemas que transporten las moléculas de ADN hasta la célula. Ejemplos de estos sistemas son los liposomas, la microinyección, y el bombardeo con partículas de oro (Figura 33.3)

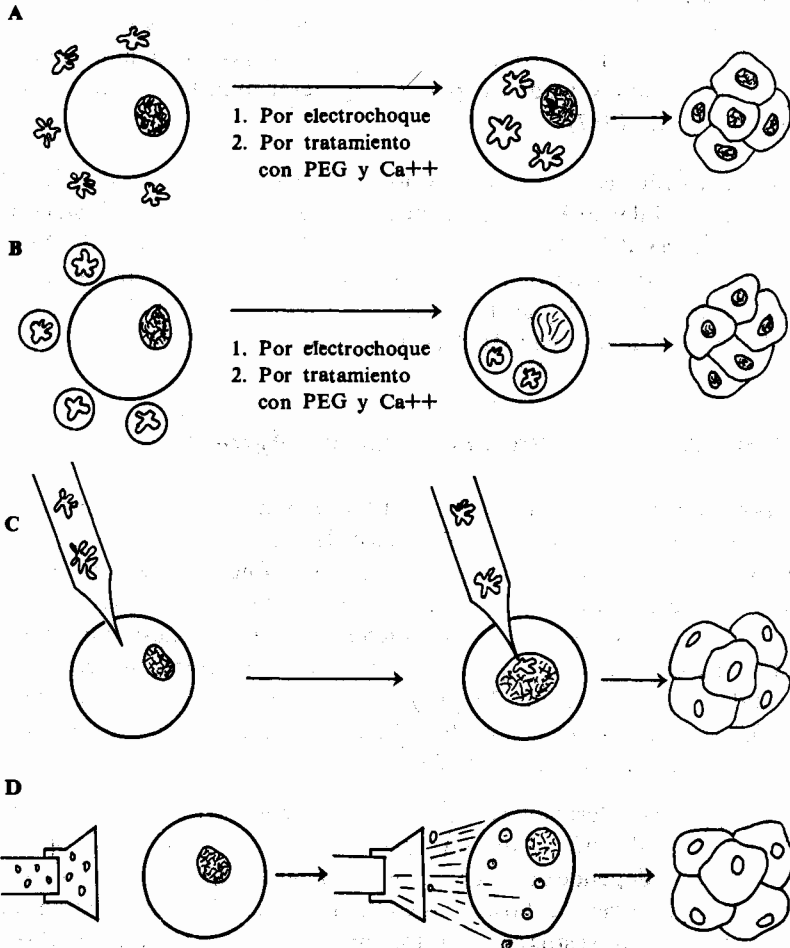


Figura 33.3. Métodos para transportar ADN extraño al interior de las células vegetales. A) moléculas de ADN; B) moléculas de ADN encerradas en liposomas; C) microinyección de ADN; D) bombardeo con partículas de oro o de tungsteno que contienen ADN. ⚡ = molécula.

La introducción directa de moléculas de ADN exógenas ha hecho posible la transformación de protoplastos (Paszkowski et al., 1984; Hain et al., 1985). Existe, sin embargo, una gran limitante: deben establecerse sistemas de obtención de protoplastos y de regeneración de plantas a partir de ellos. La falta de estos sistemas es especialmente notoria en los cereales; solamente en el arroz existe un sistema de regeneración a partir de protoplastos (Kyojuka et al., 1987). Como solución a esta limitante, se desarrolló la inyección directa de moléculas de ADN en los retoños florales (de la Peña et al., 1987) y la llamada agroinoculación (Grimsley et al., 1987). Otro de estos sistemas promisorios es la microinyección de moléculas de ADN en embriones, ya que se pueden regenerar plantas a partir de ellos (Neuhaus et al., 1987).

Se desarrolló recientemente un novedoso sistema de introducción de ADN en la célula: en él se utilizan microproyectiles a alta velocidad como transportadores del ADN (Klein et al., 1987). Las moléculas de ADN, atrapadas dentro de partículas de oro, son disparadas a la célula mediante un acelerador de partículas. Este sistema ha demostrado su eficiencia en la transformación de la soya (MaCabe et al., 1988).

Introducción de genes mediada por *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria del suelo gram-negativa, que causa la enfermedad llamada 'agalla de la corona' en la mayoría de las plantas dicotiledóneas y en algunas monocotiledóneas; la bacteria infecta la planta en el sitio de una herida (de Cleene y de Ley, 1976). Las células de la agalla de la corona tienen dos características principales: 1) producen sustancias denominadas opinas que no están presentes en las células normales (Murai y Kemp, 1982), y 2) tienen la capacidad de proliferar indefinidamente en un medio de cultivo sin necesidad de hormonas de crecimiento (White y Braun, 1942).

Las opinas son derivados de intermediarios comunes en las rutas metabólicas. La producción de opinas específicas —por ejemplo, de octopina y de nopalina— depende de la cepa de *Agrobacterium* que induce el tumor y no de la especie vegetal hospedante (Petit et al., 1970). La bacteria que infecta la planta usa estos compuestos como fuente de energía, de carbono y de nitrógeno. La transformación de las células de la planta, después de ser infectadas por *Agrobacterium*, se debe a un plásmido de elevado peso molecular (200 kilopares de bases) denominado plásmido-Ti, que es transportado por *Agrobacterium* (van Larebeke et al., 1974). Más exactamente, un fragmento del plásmido-Ti es transferido al genoma de la planta y se

expresará más tarde (Chilton et al., 1977). El fragmento trasferido se llama ADN-T, en las células de la planta, y región-T, en el plásmido bacteriano.

Para la integración del ADN-T en el genoma de la planta es indispensable, primero, una secuencia de 25 pares de bases (bp) de repetición directa que se encuentra a ambos lados de la región-T (Zambryski et al., 1980). El segundo componente indispensable para esa integración de la región-T son los denominados genes *vir*. Estos genes no son trasferidos al genoma de la planta, sino que actúan en trans sobre la región-T para promover su transferencia (Hoekema et al., 1983). El ADN-T está conformado por dos grupos de genes: un grupo responsable de la morfología del tumor, y otro responsable de su crecimiento sin necesidad de hormonas (Schell et al., 1984). Esta clase de parasitismo de *Agrobacterium* en las plantas, por el cual el parásito (*Agrobacterium*) no sólo se adapta a las propiedades del hospedante (planta) sino que cambia específicamente las propiedades genéticas de éste, ha sido llamado colonización genética (Schell et al., 1979).

Considerando la biología del proceso de infección de *Agrobacterium* descrito anteriormente, es evidente que, desde el punto de vista práctico, no todas las características de ese proceso son necesarias. No hay necesidad de plantas que expresen opinas ni nadie desea plantas con tumores. Los conocimientos actuales sobre el proceso de transferencia y de expresión del ADN-T en las plantas permite modificar los plásmidos-Ti para convertirlos en convenientes y eficaces vectores de genes en las plantas.

Para la transferencia de la región-T, lo único indispensable son las secuencias en los bordes de esa región y, lógicamente, los genes *vir*. Esto quiere decir que, si la parte interna de la región-T ha sido escindida del plásmido-Ti, éste deja de ser oncogénico y las células obtenidas de la infección con el plásmido mantendrán su capacidad regenerativa. Es necesario, sin embargo, desarrollar métodos para remplazar los genes de la región-T, si se quiere utilizar el plásmido-Ti como vector.

Hay dos métodos para lograr este remplazo de genes e introducir a la vez genes en las plantas. El primero, denominado de los vectores cointegrantes, se basa en el uso de un plásmido-Ti en el cual los genes de la región-T han sido remplazados por las secuencias de un plásmido de clonamiento en *E. coli*, como el pBR322; de este modo, un gen determinado, clonado en pBR322, puede cointegrarse con el plásmido-Ti por la vía de una recombinación homóloga (Zambryski et al., 1983). El segundo sistema, denominado vector binario, se basa en la interacción de dos plásmidos compatibles: uno que transporta los genes *vir* y otro que transporta el ADN-T (junto con el gen de interés) y las secuencias que le confieren la capacidad de

replicación en bacterias de los géneros *Escherichia* y *Agrobacterium* (Hoekema et al., 1983).

Los explantes vegetales utilizados para la transformación mediada por *Agrobacterium* han sido muy variados: protoplastos (Fralely et al., 1983), discos de hojas (Horsch et al., 1985), embriones somáticos (McGranahan et al., 1988) y meristemas apicales (Ulian et al., 1988). La Figura 33.4 presenta un diagrama de algunas alternativas de transformación.

Aplicación de las Tecnologías de Introducción de Genes en Vegetales

Varias estrategias se aplican en ingeniería genética para obtener plantas tolerantes a virus, patógenos e insectos, resistentes a los herbicidas, y con mejor calidad nutricional.

Plantas tolerantes a infecciones virales

La introducción de genes dentro de las plantas es una técnica muy promisoría para lograr plantas tolerantes a infecciones virales. Se introducen entonces genes virales que detengan el desarrollo del virus en la planta, o impidan su difusión entre una y otra célula, o regulen la producción de partículas virales.

Protección cruzada ha sido un término ampliamente utilizado para identificar la protección obtenida por una planta después de su inoculación con una cepa benigna de un virus, que la protegería de la infección causada por una cepa virulenta del mismo virus. Esta metodología es bastante eficaz pero tiene las siguientes limitaciones desde el punto de vista práctico: a) la cepa benigna del virus puede convertirse, después de un proceso de mutación, en una cepa altamente virulenta que causaría a la postre pérdidas en vez de protección; b) una cepa viral puede ser benigna para un tipo de planta pero muy virulenta para otro, por lo cual no es recomendable distribuir el virus directamente en el campo.

Estas limitaciones podrían superarse si la protección dependiera de la planta, es decir, si ella fuera la expresión de un gen y no el resultado de la infección de un virus completo. Publicaciones recientes demuestran la veracidad de esta hipótesis (Abel et al., 1986; Nelson et al., 1988) porque se obtuvieron plantas de tomate tolerantes a la infección causada por el virus

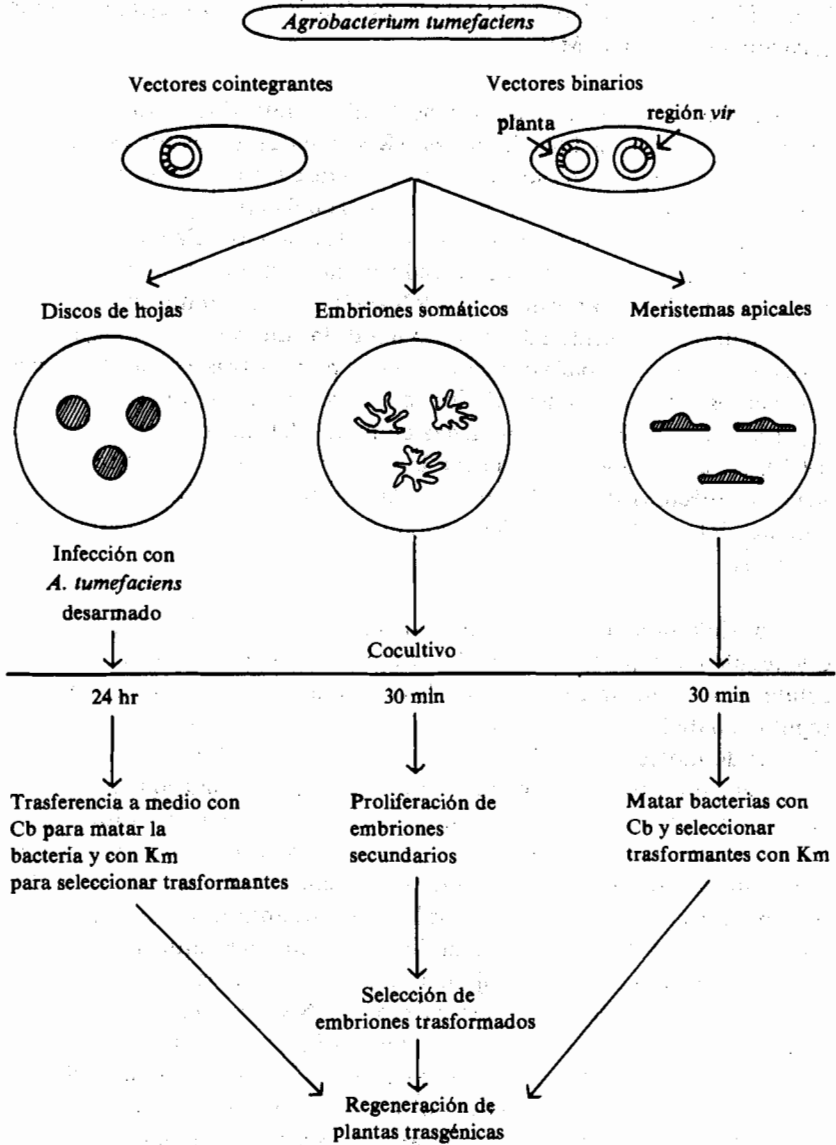


Figura 33.4. Introducción de genes en las plantas mediada por *A. tumefaciens*. (En el plásmido 'desarmado' los genes que inducen tumores han sido eliminados.) Cb = carbenicilina; Km = kanamicina.

del mosaico del tomate (ToMV); las plantas eran trasgénicas, y expresaban un gen introducido por *A. tumefaciens* que codifica para la proteína de la cápsida del virus del mosaico del tabaco (TMV), un virus estrechamente relacionado con el ToMV.

La protección cruzada se obtiene también introduciendo genes que codifiquen para los ácidos llamados ARN satélites. Estos son especies de ARN que se encuentran asociadas con cepas de ciertos virus; se replican en células infectadas por el virus particular del cual ellos dependen y, puesto que quedan empaquetados con el ARN viral en la partícula viral, acompañan a los virus de un tejido infectado de la planta a un nuevo sitio de infección. Lo interesante de estos ARN satélites es que reducen, a veces en gran medida, la severidad de los síntomas de la enfermedad causada por el virus que ellos acompañan. Se obtuvieron plantas trasgénicas de tabaco que demostraron tolerancia al virus del mosaico del pepino (Harrison et al., 1987) y al virus de las manchas en anillo del tabaco (Gerlach et al., 1987). La estrategia empleada fue la introducción dentro del tabaco de genes (moléculas de ADN) que, al ser transcritos, resultaban ser ARN satélites del tipo descrito, es decir, los que atenúan síntomas de enfermedades virales.

Es posible también conferir tolerancia a los virus utilizando métodos que regulen la expresión del ARN viral, una vez se halle éste dentro de la célula. Esto es posible empleando los llamados ARN de antisentido. La regulación dicha consiste en que los ARN de antisentido participan en la síntesis de moléculas de ARN pequeñas que no codifican para ninguna proteína, pero tienen un alto grado de complementariedad con un segundo ARN con el cual se pueden hibridar. Este tipo de regulación fue descubierto primero en procariontes, y en todos los casos descritos hasta el momento los ARN de antisentido actúan como represores del mRNA funcional. Una detallada revisión de los ARN de antisentido fue hecha por Green et al. (1986). Estas secuencias han sido llamadas también secuencias de interferencia con el mensajero (micARN), y pueden construirse de manera que sean complementarias de los ARN virales. Recientemente se han construido secuencias de ADN que codifican para ciertos micARN que son complementarios, por el extremo 5', de algunos virus ARN de plantas tropicales.¹ Estas secuencias de ADN se podrían introducir en plantas y se espera que les confieran protección regulando en ellas la

1. Jaynes, J. Información sin publicar.

expresión del ARN viral. En la Figura 33.5 se esquematiza la estrategia general para lograr el control de enfermedades virales utilizando los ARN de antisentido.

Plantas tolerantes a los insectos y resistentes a los herbicidas

Hay dos estrategias prometedoras para inducir en las plantas resistencia a los insectos: la resistencia conferida por la toxina de la bacteria *Bacillus thuringiensis*, y la acción de los inhibidores de proteasas inducidos por heridas causadas en la planta.

La bacteria *Bacillus thuringiensis* produce un polipéptido activo contra varias especies de insectos. Durante la esporulación, la bacteria produce una delta-protoxina que se almacena en cuerpos de inclusión celular; una vez ingerida por un insecto susceptible, la toxina es solubilizada y cortada por proteasas en el tracto digestivo del insecto, y se forma entonces el principio activo de la toxina. Hay varias cepas bacterianas que producen delta-toxinas diferentes; por ejemplo, la cepa *israelensis* es activa contra las especies del orden Diptera, mientras que la cepa *berliner* lo es contra las especies del orden Lepidoptera. Las delta-toxinas se consideran un sistema interesante de biocontrol puesto que afectan de manera específica un grupo de insectos; además, han sido utilizadas durante mucho tiempo como insecticidas biológicos seguros. Para obtener plantas resistentes se clonaron varios subfragmentos del gen que codifica para la delta-toxina de la cepa *berliner*, y se introdujeron en las plantas de tabaco utilizando *A. tumefaciens* como vector (Vaeck et al., 1987). Las plantas regeneradas produjeron suficiente toxina como para asegurar su protección cuando fueran atacadas por la larva del gusano del tabaco. Este nuevo gen fue transmitido como un carácter dominante a las siguientes generaciones. Un gen similar ha sido introducido también en el tomate y, de igual manera, le confiere resistencia a los insectos (Fischhoff et al., 1987).

Como se mencionó antes, otra estrategia interesante son los genes que codifican para los inhibidores de proteasas producidos después de que se ha causado una herida a una planta, ya sea mecánicamente o por la acción de un insecto; cuando así ocurre, se liberan, de manera sistemática, factores que inducen la producción de inhibidores de proteasas. Estos inhibidores están dirigidos contra las proteasas del insecto y no contra las de la planta, de modo que interfieren con la digestión del insecto protegiendo así a la planta. El gen que codifica para el inhibidor de la tripsina, clonado de una leguminosa (*Vigna unguiculata*), fue introducido en plantas de tabaco y demostró que daba una resistencia mucho más general al ataque de

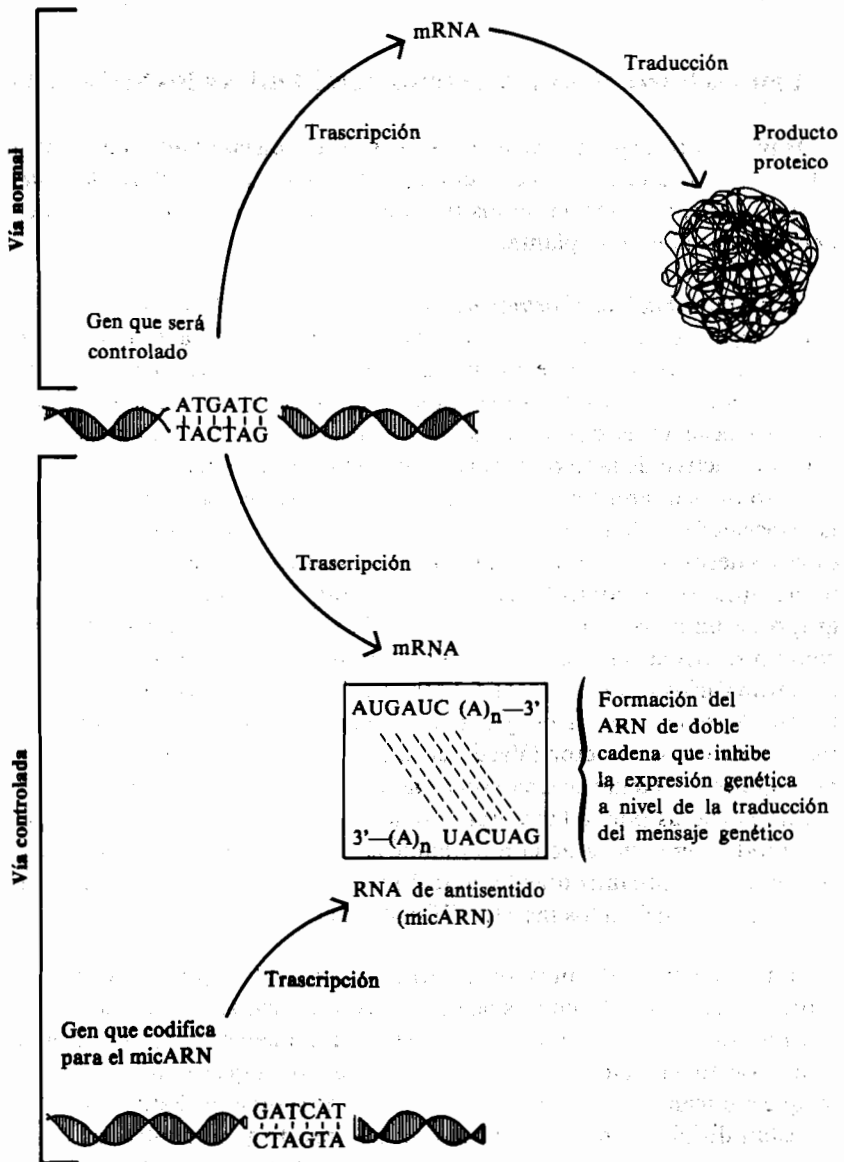


Figura 33.5. Mecanismo de inhibición de la expresión genética por medio de los micARN.

insectos herbívoros de lo que se podría esperar de las delta-toxinas (Hilder et al., 1987).

El uso de herbicidas para reducir las pérdidas en la producción de las especies vegetales económicamente importantes se ha convertido en una práctica frecuente en la agricultura moderna. La industria moderna ha producido herbicidas muy efectivos y seguros para los animales y, en general, para el medio ambiente. Estos nuevos herbicidas inhiben en la planta vías biosintéticas específicas en la producción de aminoácidos y, por lo regular, no pueden discriminar entre una maleza y la especie cultivada. Para enmendar esta limitación, se han producido plantas transgénicas capaces de modificar el herbicida para que no tenga efectos tóxicos en ellas (de Block et al., 1987). El gen que codifica para la enzima fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) ha sido clonado del hongo *Streptomyces hygroscopicus* (Thompson et al., 1987). Esta enzima confiere resistencia al herbicida fosfinotricina, que es un potente inhibidor de la glutaminosintetasa (una enzima clave en la regulación del metabolismo del nitrógeno). Las plantas transgénicas que contienen el gen que codifica para PAT son resistentes a altas concentraciones del herbicida fosfinotricina.

Mejoramiento de la calidad nutricional de los cultivos

El contenido de proteína nutritiva de las plantas se considera bajo si se compara con el de fuentes proteicas animales. Por otro lado, la calidad nutricional de las proteínas se determina según su contenido de aminoácidos esenciales. Los aminoácidos, componentes estructurales de las proteínas, se clasifican en no esenciales, o sea, que pueden ser sintetizados por el organismo animal, y esenciales, que deben ser suministrados en la dieta. **Algunas proteínas de origen animal, como la ovoalbúmina, tienen un gran valor nutritivo ya que poseen un alto porcentaje de aminoácidos esenciales: 22.8% de sus nutrimentos corresponde a lisina, metionina, triptofano, treonina e isoleucina, que son los cinco aminoácidos esenciales más escasos en las gramíneas. Este porcentaje contrasta grandemente con el contenido de aminoácidos esenciales de las gramíneas, que es de aproximadamente 13%.**

En los países semitropicales y tropicales, las dietas son nutricionalmente inadecuadas porque carecen, principalmente, de proteínas de alta calidad nutritiva. Las deficiencias en aminoácidos esenciales de los alimentos básicos del trópico (cereales y tubérculos) son ampliamente conocidas. El Cuadro 33.2 presenta la cantidad de aminoácidos esenciales contenida en determinada unidad de alimento derivado de algunos de los cultivos de más consumo en las regiones tropicales.

Cuadro 33.2. Aminoácidos esenciales^a contenidos en una cantidad calórica de alimento (500 g).

Aminoácido	Requerimientos ^b (g/día)	Contenido de aminoácidos (g) en:						
		Arroz	Trigo	Maíz	Cebada	Papa	Yuca	Soya
Histidina	0.60	0.74	1.04	0.98	0.95	0.15	0.09	4.7
Isoleucina	2.23	1.48	2.03	2.50	1.75	0.44	0.16	9.1
Leucina	2.66	2.76	3.37	5.85	3.30	0.50	0.23	13.8
Lisina	1.83	1.08	1.34	0.90	1.60	0.54	0.23	12.3
Metionina	0.80	0.61	0.99	1.21	0.77	0.13	0.04	2.9
Fenilalanina	1.70	1.55	2.48	1.96	2.46	0.44	0.16	8.9
Treonina	1.54	1.18	1.49	1.44	1.68	0.40	0.16	7.7
Triptofano	0.40	0.034	0.60	0.234	0.60	0.11	0.07	2.3
Valina	1.86	2.12	2.13	2.07	2.44	0.54	0.17	9.7

a. La producción presentada aquí supone que la proteína se encuentra biodisponible en un 100%; por tanto, estas cifras sobrestiman la producción de aminoácidos esenciales.

b. Los requerimientos en g/día han sido determinados por la FAO para un niño de 20 kg.

Una estrategia para corregir esos defectos nutricionales es la síntesis e introducción de genes que codifiquen para proteínas homopoliméricas (o sea, que contengan un solo tipo de aminoácido) o para proteínas conformadas por la repetición de 2 ó 3 aminoácidos esenciales. Se han sintetizado y clonado los genes Sp44(1), Sp44(2), Sp47(1) y Sp47(2) (Figura 33.6), que codifican para los polipéptidos poseedores de un alto contenido de los aminoácidos esenciales más limitantes (lisina, triptofano, metionina, treonina e isoleucina) de una dieta a base de cereales y tubérculos.²

Conclusiones y Perspectivas

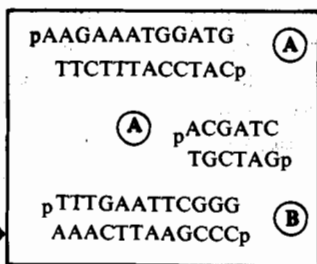
Parece evidente, por lo expuesto en este capítulo, que las técnicas de manipulación genética son importantes en el contexto general de la agricultura moderna. La biotecnología agrícola se encargará de conectar áreas básicas de biología molecular y de biología celular con las prácticas agrícolas tradicionales; esta labor de conjunto producirá las nuevas variedades de plantas que se cultivarán en los próximos 15 a 20 años en los países industrializados.

2. Jaynes, J. Comunicación personal.

Codones usados

AAA = LYS
AAG = LYS
TGG = TRP
ATG = MET
ATC = ILE
ACG = THR
CAT = HIS
CCA = PRO
TTT = PHE
CTT = LEU

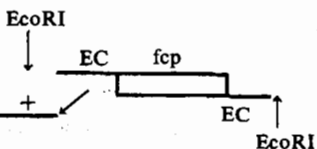
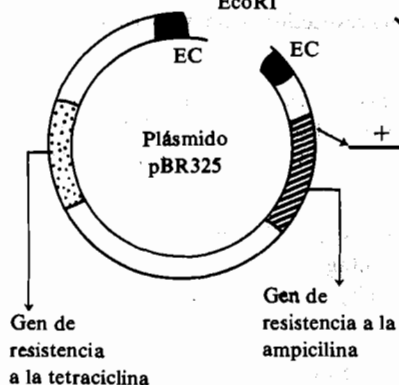
Oligonucleótidos



Se produjeron artificialmente oligonucleótidos que codificaban para aminoácidos esenciales (A) y otros que poseían sitios de reconocimiento para enzimas de restricción (B). Ambos oligonucleótidos fueron mezclados en presencia de la polimerasa del T4, y se obtuvo así su polimerización.

Las cadenas polímeras fueron tratadas con enzima de restricción de EcoRI (para obtener las cadenas de longitud deseada) y fueron ligadas con pBR325 tratado con EcoRI; luego fueron clonadas en *E. coli*.

Extremos cohesivos resultantes de la digestión con EcoRI



Así se obtuvieron cerca de 50 clones que, al ser caracterizados, demostraron que el ADN sintético había sido incorporado en el plásmido pBR325.

Se seleccionaron dos clones que fueron denominados SP44 y SP47.

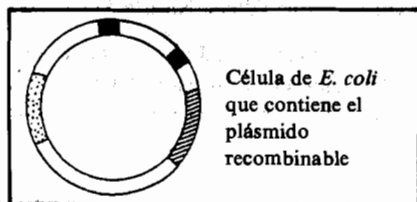


Figura 33.6. Construcción y clonamiento de ADN sintético. EC = extremo cohesivo (AAT); fcp = fragmento de la cadena polimerizada.

Conviene anotar que las técnicas de cultivo de tejidos y de células en condiciones in vitro despojan de realidad la llamada 'ventaja del trópico'. Esta ventaja confería a los países de la zona tórrida, que generalmente se consideran países subdesarrollados o en vías de desarrollo, un factor importante para la consecución de divisas, ya que se encargaban de la producción y exportación de los cultivos que solamente crecían en esa zona. Hoy, en cambio, los países en vías de desarrollo deben tomar parte activa en el desarrollo de la biotecnología agrícola con miras a evitar una dependencia agrícola que hace tan sólo unos pocos años se hubiese creído imposible.

Referencias

- Abel, P. P.; Nelson, R. S.; Hoffman, B. de N.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T. y Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plant that expresses the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232:738-743.
- Arber, W. y Linn, S. 1969. DNA modification and restriction. *Ann. Rev. Biochem.* 38:467-500.
- Chilton, M. D.; Drummond, M. H.; Merlo, D. J.; Sciaky, D.; Montoya, A.; Gordon, M. P. y Nester, E. W. 1977. Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: The molecular bases of crown-gall tumor genesis. *Cell* 11:263-271.
- de Block, M.; Botterman, J.; Vandewiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Gosselé, V.; Rao Morva, N.; Thompson, C.; van Montagu, M. y Leemans, J. 1987. Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* 6:2513-2518.
- de Cleene, M. y de Ley, J. 1976. The host range of crown gall. *J. Bot. Rev.* 42:289-466.
- de la Peña, A.; Lorz, H. y Schell, J. 1987. Transgenic rye plants obtained by injecting DNA into young flora: Tillers. *Nature* 325:274-276.
- Fischhoff, D. A.; Bowdish, K. S.; Perlak, F. J.; Morrone, P. G.; McCormick, S. M.; Niedermeyer, J. G.; Dean, D. A.; Kusano-Kretzmer, K.; Mayer, E. J. y Rochester, D. E. et al. 1987. Insect tolerant transgenic tomato plants. *Biotechnology* 5:807-813.
- Fraley, R.; Rogers, S.; Hörsch, R.; Sanders, S.; Flick, J.; Adams, S.; Bittner, M.; Brand, L.; Fink, C. y Fry, J. et al. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 80:4803-4807.

- Gerlach, W. L.; Llewellyn, D. y Haseloff, J. 1987. Construction of a plant disease resistance gene from the satellite RNA of tobacco ringspot virus. *Nature* 328:802-805.
- Green, P. J.; Pines, O. e Inouye, M. 1986. The role of antisense RNA in gene regulation. *Annu. Rev. Biochem.* 55:569-597.
- Grimsley, N.; Hohn, T.; Davies, J. W. y Hohn, B. 1987. *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
- Hain, R.; Stabel, P.; Czernilofsky, A. P.; Steinbiss, H. H.; Herrera-Estrella, L. y Schell, J. 1985. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. *Mol. Gen. Genet.* 199:161-168.
- Harrison, B. D.; Mayo, M. A. y Baulcombe, D. C. 1987. Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature* 328:799-802.
- Helinski, D. R. 1979. Bacterial plasmids: Autonomous replication and vehicles for gene cloning. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 7:83-101.
- Hilder, V. A.; Gatehouse, A. M. R.; Sheerman, S. E.; Borker, R. F. y Boulter, D. 1987. A novel mechanism of insect resistance engineered into tobacco. *Nature* 300:160-163.
- Hoekema, A.; Hirsch, P. R.; Hooikaas, P. J. J. y Shilperoort, R. A. 1983. A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T- regions of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid. *Nature* 303:179-180.
- Horsch, R. B.; Fry, J. E.; Hoffman, N. L.; Eichholtz, D.; Rogers, S. G. y Fraley, R. T. 1985. A simple and general method for transferring genes to plants. *Science* 227:1229-1231.
- Jackson, D. A.; Symons, R. H. y Berg, P. 1972. Biochemical method for inserting new genetic information into DNA of simian virus 40: Circular SV40 DNA molecules containing lambda phage genes and the galactose operon of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 69:2904-2909.
- Kessler, C.; Neumaier, P. S. y Wolf, W. 1985. Recognition sequences of restriction endonucleases and methylases: A review. *Gene* 33:1-102.
- Klein, T. M.; Wolf, E. D.; Wu, R. y Sanford, J. C. 1987. High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells. *Nature* 327:70-73.
- Kyozuka, I.; Hayashi, Y. y Shimamoto, K. 1987. High frequency plant regeneration from rice protoplasts by novel nurse culture methods. *Mol. Gen. Genet.* 206:408-413.

- McCabe, D. E.; Swain, W. F.; Mortinell, B. J. y Christou, P. 1988. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. *Biotechnology* 6:923-926.
- McGranahan, G. H.; Leslie, C. A.; Uratsu, S. L.; Martin, L. A. y Dandekar, A. M. 1988. *Agrobacterium*-mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants. *Bio/technology* 6:800-804.
- Meselson, M. y Yan, R. 1968. DNA restriction enzyme from *E. coli* nature. 217:1110-1114.
- Murai, N. y Kemp, J. D. 1982. Octopine synthase mRNA isolated from sunflower crown gall is homologous to the Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc. Natl. Acad. Sci. (E.U.)* 79:86-91.
- Nelson, R. S.; McCormick, S. M.; Delannay, X.; Dubé, P.; Layton, J.; Anderson, E. J.; Kaniewska, M.; Protesch, R. K.; Horsch, R. B.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T. y Beachy, R. N. 1988. Virus tolerance, plant growth and performance of transgenic tomato plants expressing coat protein from tobacco mosaic virus. *Bio/technology* 6:403-409.
- Neuhaus, G.; Spangenberg, G.; Mittelsten-Scheid, O. y Schweiger, H.G. 1987. Transgenic rapeseed plants obtained by the microinjection of DNA into microspore-derived embryos. *Theor. Appl. Genet.* 75:30-36.
- Paszkowski, J.; Shillito, R. D.; Saul, M.; Mandak, V.; Hohn, T. C.; Hohn, B. y Potrykus, I. 1984. Direct gene transfer to plants. *EMBO J.* 3:2717-2722.
- Petit, A.; Delhay, S.; Tempe, J. y Morel, G. 1970. Recherches sur les guanidines des tissus de crown gall: mise en évidence d'une relation biochimique spécifique entre les sources d'*Agrobacterium* et les tumeurs qu'elles induisent. *Physiol. Vég.* 8:205-213.
- Schell, J.; van Montagu, M.; de Beuckeleer, M.; de Block, M.; Depicker, A.; de Wilde, M.; Engler, G.; Genetello, C.; Hernalsteens, J.-P.; Holters, M. et al. 1979. Interactions and DNA transfer between *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid and the plant host. *Proc. Roy. Soc. Lond. B.* 204:251-266.
- ; ——; Willmitzer, L.; Leemans, J.; Deblaere, R.; Hoos, H.; Inze, D.; Wostemeyer, A.; Otten, L. y Zambryski, P. 1984. Transfer of foreign genes to plants and its use to study development processes. En: Beers Jr., R.F. y Basset, E.G. (eds.). *Cell fusion: Gene transfer and transformation*. Raven Press, Nueva York.
- Sluka, J. P.; Horvath, S. J.; Bruist, M. P.; Simon, M. I. y Dervan, P. B. 1987. Synthesis of a sequence-specific DNA-cleaving peptide. *Science* 238: 1129-1132.
- Sutcliffe, G. 1979. Complete nucleotide sequence of the *Escherichia coli* plasmid pBR322: Cold Spring Harbor symposium. *Quant. Biol.* 43:77-90.

- Thompson, C. J.; Rao-Movra, N.; Tizard, R.; Crameri, R.; Davies, J. E.; Lauwereys, M. y Botterman, J. 1987. Characterization of the herbicide-resistance gene *bar* from *Streptomyces hygroscopicus*. EMBO J. 6: 2519-2523.
- Ulian, E. C.; Smith, R. H.; Gould, J. H. y McKnight, T. D. 1988. Transformation of plants via the shoot apex. In vitro Cel. Dev. Biol. 24:951-954.
- Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Hofte, H.; Jansens, S.; de Beuckeleer, M.; Carolline, D.; Zabeau, M.; van Montagu, M. y Leemans, J. 1987. Transgenic plants protected from insect attack. Nature 328:33-37.
- van Larebeke, N.; Engler, G.; Holsters, M.; van den Elsacker, S.; Zaenen, I.; Schilperoort, R. A. y Schell, J. 1974. Large plasmid in *Agrobacterium tumefaciens* essential for crown-gall induction ability. Nature 252:169-170.
- White, P. R. y Braun, A. C. 1942. A cancerous neoplasm of plant: Autonomous bacterial-free crown-gall tissue. Cancer Res. 2:597-617.
- Winnacker, E. L. 1987. From genes to clones: Introduction to gene technology. VCH, Weinheim, Nueva York.
- Yuan, R. 1981. Structure and mechanism of multifunctional restriction endonucleases. Ann. Rev. Biochem. 50:285-315.
- Zambryski, P.; Holsters, M.; Kruger, K.; Depicker, A.; Schell, J.; van Montagu, M. y Goodman, H. M. 1980. Tumor DNA in plant cells transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. Science 209:1385-1391.
- ; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; van Montagu, M. y Schell, J. 1983. Ti plasmid vector for introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity. EMBO J. 2:2143-2150.