

**FIRMA INVITADA****COMO SE CREA UNHA PLANTA  
TRANSXÉNICA**

**GONZÁLEZ CAAMAÑO, M<sup>a</sup> Luz**  
*Prof. Titular Biotecnoloxía Vexetal*  
*Facultade Bioloxía*  
UNIVERSIDADE DE SANTIAGO DE COMPOSTELA

Quenes algunha vez seguistes unha receta de cociña, sabes que ten dúas partes. Por unha banda están os ingredientes e, pola outra, o modo de preparación. Na obtención dunha planta transxénica, como en outras moitas tarefas de laboratorio, sucede o mesmo. Por un lado están os ingredientes: a planta ou especie vexetal que queremos transformar, o xene que queremos introducir e o vehículo transportador dese xene. Logo está o modo cómo hai que realizalo.

**1. DA MELLORA TRADICIONAL Á ENXEÑERÍA XENÉTICA**

Dende a aparición da agricultura, o home seleccionou as plantas de interese como alimento, vestimenta ou materia prima, procurando obter variedades con maior rendemento, calidade nutritiva, facilidade de cultivo, ou resistencia a enfermidades ou a condicións adversas. Pero esta selección foi realizada ata o século XX sen o coñecemento dos factores que interviñan nela. Foron os descubrimentos de Mendel no século XIX os que fixeron posible afondar no coñecemento dos caracteres dos organismos que veñen determinados por factores herdables que son os xenes.

Así comeza o método tradicional de mellora xenética e a produción de novos cultivares mellorados, obtidos mediante o cruzamento entre individuos seleccionados da mesma especie ou de especies emparentadas. Os híbridos seleccionados volvíanse a cruzar entre eles ou a retrocruzar ata obter unha xeración portadora das características desexadas á que se recoñece como unha nova variedade. Pero o principal factor limitante co que se atoparon os melloradores no proceso da produción de híbridos foi a incompatibilidade sexual entre as especies seleccionadas como proxenitores. Estes cruces non son posibles na súa maioría ou teñen unha probabilidade moi baixa de obter sementes viables.

A mellora vexetal tradicional resulta polo tanto insuficiente para conseguir novas variedades máis productivas que poidan satisfacer a demanda de alimento para a crecente poboación mundial, variedades que sexan resistentes ás principais enfermidades que estragan as colleitas ou que poidan desenvolverse en áreas con condicións ambientais adversas. Ademais, moitas das variedades dedicadas a cultivos extensivos dependen, en grande medida, de abonos químicos que danan o medio.

Cos coñecementos disponibles hoxe en día, e gracias á enxeñería xenética que permite modificar a información xenética dun organismo utilizando técnicas de bioloxía molecular, pódese aumentar o rendemento dunha colleita, diminuír as perdas ocasionadas por plagas e enfermidades e reducir os custos de produción. Pero ademais, a enxeñería xenética está enfocada tamén cara o ámbito industrial, químico e farmacéutico.

## 2. ASI SE CONSTRÚE UNHA PLANTA TRANSXÉNICA.

O termo de planta transxénica ou planta xeneticamente modificada refírese a «aquelas que coa intervención do home e por medio da enxeñería xenética, teñen algún cambio no seu xenoma». É dicir, son aquelas ás que se lles introduciu algún xene foráneo. Unha vez aclarado o termo, darei resposta a cómo se fan as plantas transxénicas, presentando a cada un dos seus protagonistas.

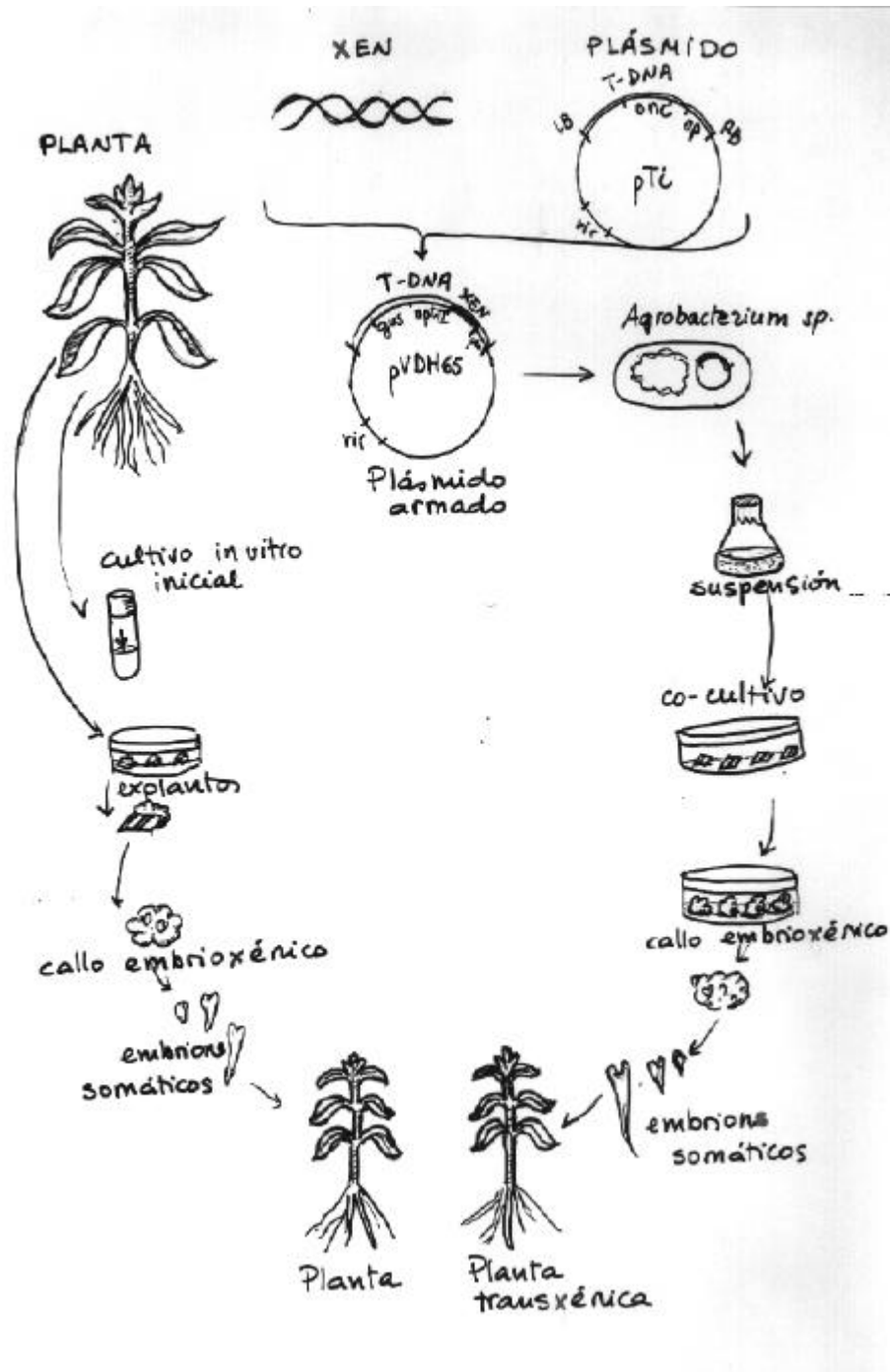
A **planta**: Soe ser unha planta seleccionada ben polas súas cualidades agronómicas (pataca, solla), forestais (castiñeiro, piñeiro), ornamentais (petunia, crisantemo) ou de interese frutícola (vide, maceira) ou ben se trata de cultivos extensivos que son a base da alimentación humana, como son os principais cereais (trigo, arroz, millo, cebada, centeo ou sorgo). Pero o home coñece que estas plantas seleccionadas teñen, ó seu entender, algún «defecto»: non son resistentes ó ataque de insectos (pataca), son sensibles á acción dalgún herbicida (solla), son susceptibles ó ataque por fungos que diezman a poboación (castiñeiro), son atacadas por virus que reducen sensiblemente as colleitas (vide), ou ben non son tolerantes a condicións extremas ou situacións de estrés como son o vivir en condicións salinas, a moi baixas ou moi altas temperaturas, con exceso de agua -como ocorre en boa parte das terras onde se cultivan-, ou se pretenden cultivar os principais cereais que son a base da alimentación.

Pero, ¿como poderían ser melloradas estas plantas?. Hoxe en día, introducindo no seu xenoma o xene que sexa responsable dalgunha das características desexadas (resistencia, tolerancia, produtividade...). Aquí está o segundo protagonista:

O **xene**: sabemos que é, basicamente, un trozo de ADN presente nos cromosomas que codifica para unha proteína determinada, enzimática ou non. Este trozo de ADN leva impresa na súa secuencia de bases dos desoxirribonucleótidos que o compoñen, a secuencia de restos aminoácidos que deberá ter a proteína resultante. Os investigadores hoxe en día saben como chegar a coñecer esa secuencia, ben detectándoa por medio dos ARNm ou ben, coñecendo a secuencia de aminoácidos da proteína, poden obte-lo seu ARNm e de aí, por medio dunha transcriptasa inversa, chegar a coñece-lo trozo de ADN (xene) que codifica para esa proteína. O xene pode proceder dun virus, bacteria, vexetal ou animal -de calquera organismo vivo- o que permite introducir información xenética moi dirixida e específica.

Pero, ¿como introducimo-lo xene da nosa elección, que está a nivel de molécula, no interior dunha planta que está a nivel de organismo? Pois realmente o que se fai é traballar a nivel celular (con cultivos de células ou tecidos) introducindo o xene no núcleo (xenoma nuclear) ou nos cloroplastos ou mitocondrias (xenomas cloroplástico ou mitocondrial), que tamén forman parte do xenoma da planta e que controlan certas características como a resistencia a herbicidas ou a esterilidade masculina respectivamente. Para introducilo e que se inserte no lugar adecuado, feito que ocorre ó chou, necesitamos un transportador molecular ou vector que, atravesando a barreira da parede celular e membrana plasmática, se introduza no interior da célula vexetal. Este transportador é o noso terceiro protagonista. Refírome ós **plásmidos** que, aínda que non é o único método que fai posible ese transporte, sí é o principal vector ou vehículo de transferencia de xenes.

¿Que é un **plásmido**? É un trozo de ADN extracromosómico, circular, que está presente nas células bacterianas en número de unha a tres mil copias, que é autónomo, que se replica de forma independente e que ten a característica de introducirse no xenoma das células ás que infecta e transferirlles un trozo do seu ADN, o chamado T-DNA. Dende hai moito tempo, sábese que existen unhas bacterias Gram (-), que viven no chan, pretencentes á Familia Rhizobiaceae e que afectan a moitas plantas, sobre todo dicotiledóneas. Estas bacterias do xénero *Agrobacterium* producen na planta un tumor en coroa ou agalla en zonas con feridas, ou ben multitude de raíces en cabeleira. Pois ben, hoxe sábese que estas bacterias, *Agrobacterium tumefaciens* e *A. rhizogenes*, conteñen no seu interior plásmidos que son os responsables da infectividade da bacteria. O plásmido Ti (inductor de tumor) ou Ri (inductor de raíces) transfíere un trozo do seu ADN, só á rexión T-DNA que é a que contén os oncoxenes, e introdúceo no xenoma da célula vexetal infectada. Esta rexión T está comprendida entre dous bordes, o esquerdo (L) e o dereito (R).



O que fixeron os investigadores é cortar, mediante enzimas de restricción, os bordes dereito e esquerdo, quitar ese anaco, é dicir, desarmalo da súa infectividade e volver a armalo pero, esta vez, cos xenes do seu interese. Sólese colocar un xene promotor máis o xene de interese (por exemplo: resistencia a un insecto, a un herbicida...) e ademais, un ou dous xenes marcadores seleccionables ou avisadores que sirvan para detectar, dunha maneira doada e rápida, se a célula en cuestión coa que se traballa foi transformada ou non. Os xenes marcadores máis utilizados son o xene *gus* que codifica para a  $\beta$ -glucuronidasa (GUS) e que produce unha coloración azul das células transformadas cando se someten a unha reacción histoquímica específica, tinción X-Gluc, e o xene marcador seleccionable *nptII* que codifica para a neomicinfosfotransferasa (NPTII) e que selecciona as células transformadas facéndoas medrar nun medio co antibiótico kanamicina. As células así seleccionadas darán lugar a plantas que serán resistentes a ese antibiótico ó terles introducido o xene e serán, polo tanto, plantas transxénicas.

Agora que xa temos ós tres protagonistas principais que intervienen, haberá que coñece-lo lugar no que se realiza a transformación e a forma como esta ocorre.

O lugar ten que ser sempre un laboratorio de biotecnoloxía vexetal especializado en cultivo «in vitro» de plantas, porque todo o proceso ocorre en anacos de planta: folla, raíz, talo, embrións, hipocotilo, ou calo (explantos), cultivados sobre un medio mineral nutritivo en envases de vidro e en condicións estériles («in vitro»).

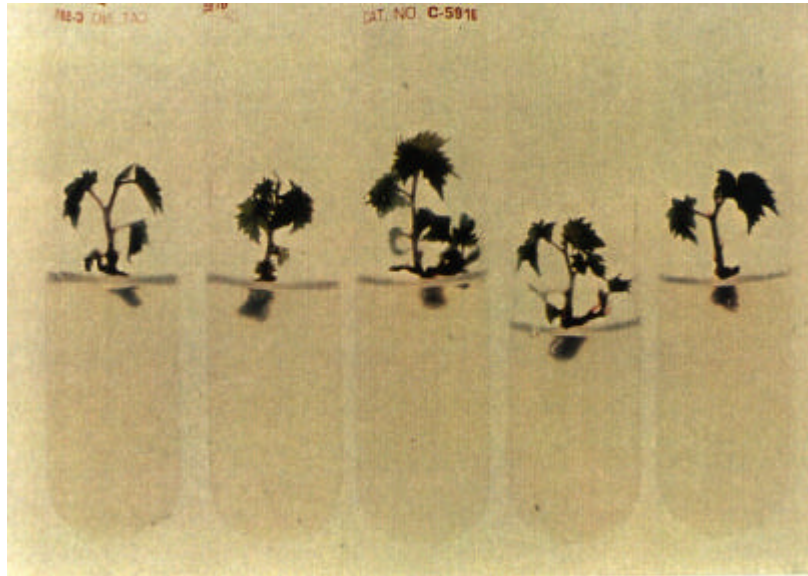


*Fig. 1: Brotes en estaquillas de vide, Vitis vinífera, var. Albariño*

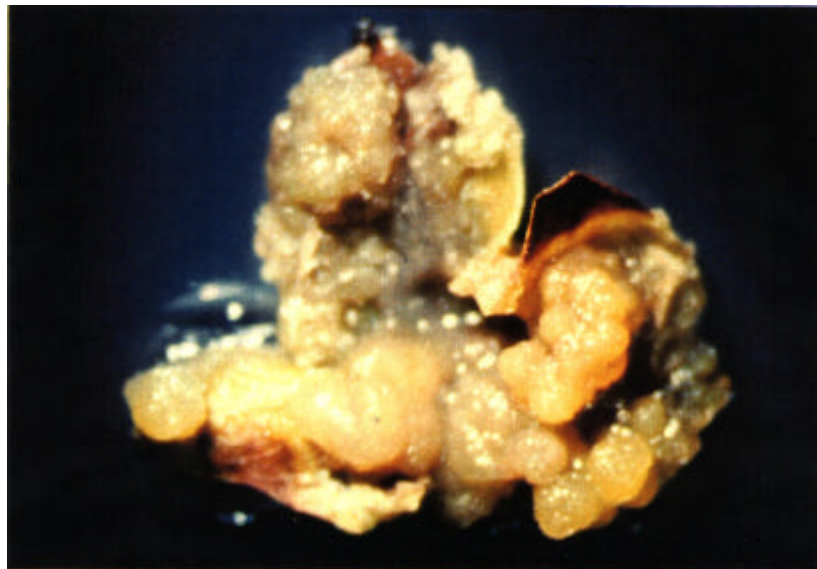
Por iso hai que lograr rexenerar unha planta completa a partir dunha soa célula, un protoplasto (célula vexetal sen parede), un trozo de folla, de raíz, de

Pero ademais, e isto é moi importante, antes de querer transformar xeneticamente unha planta, temos que ter establecido previamente un método viable de rexeneración desa planta por medio do seu cultivo «in vitro». Só así terá sentido o querer e poder transformala.

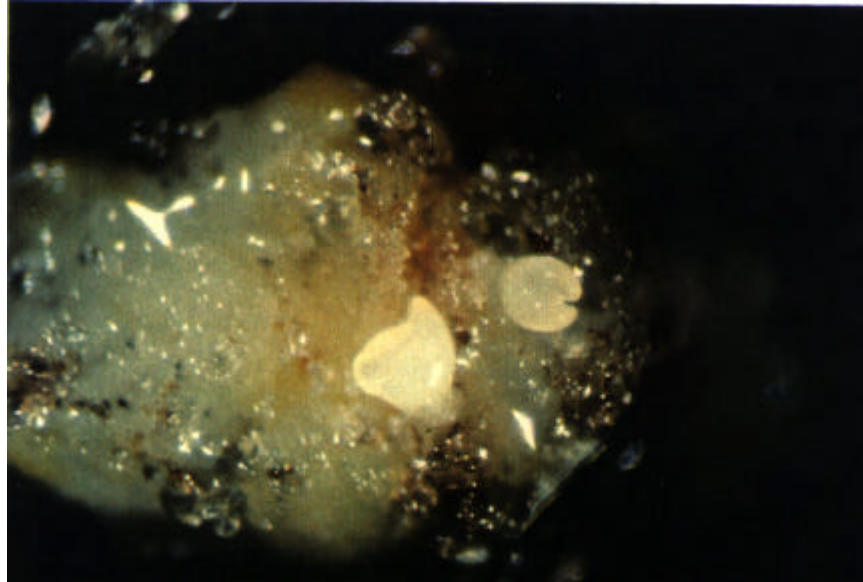
calo..., é dicir, a partir de calquera tipo de explanto que sexa capaz, gracias á acción de auxinas e citoquininas (hormonas vexetais) que son reguladores do crecemento, de rexenerar unha planta completa.



*Fig. 2: Multiplicación «in vitro» de brotes de vide*

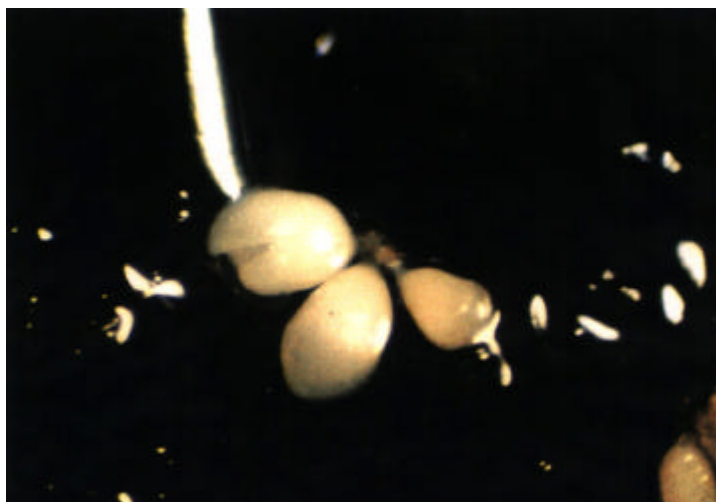


*Fig. 3: Calo embrioxénico obtido sobre explanto de folla de vide*



*Fig. 4: Embrións somáticos sobre calo*

Pero, ¿como é posible que unha soa célula de folla ou de raíz sexa capaz de rexenerar un individuo completo?. A resposta está nunha propiedade característica das células vexetais coñecida como **totipotencia** que se define como a capacidade das células vexetais para poder expresa-la totalidade do seu xenoma. Aínda que en teoría tódalas células vexetais vivas posúena, o certo é que a medida que se van diferenciando, é dicir, especializando, van perdendo esta capacidade debido a unha



*Fig. 5:  
Embrións  
somáticos de  
vide, en fase  
cotiledonar*

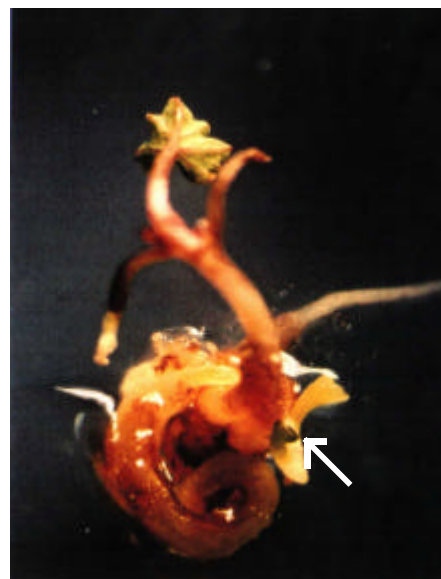
serie de cambios metabólicos e estruturais irreversibles. Debido a isto, só as células menos diferenciadas como as dos meristemos ou de parénquima, con medre activo e capaces de dividirse, teñen a posibilidade de regresar a estadios menos diferenciados e converterse en células de tipo meristemático primario. Unha vez acadado este grao máximo de desdiferenciación, estas células, co uso de reguladores de crecemento adecuados, poderán diferenciarse de novo en procesos de histoxénese e organoxénese dando lugar a órganos vexetais (xemas ou raíces) ou a embrións somáticos e, en definitiva, a unha planta completa.



*Fig. 6: Embrión somático en fase de desenvolvemento*

Tendo xa a vía de rexeneración dispoñible e o plásmido armado introducido en *Agrobacterium* temos que ver se a planta é susceptible de ser infectada pola bacteria e comprobar que o resultado sexa positivo, é dicir, que eses xenes se integren no xenoma da planta, se expresen e se herden, condicións todas elas necesarias para dicir que temos logrado unha planta transxénica.

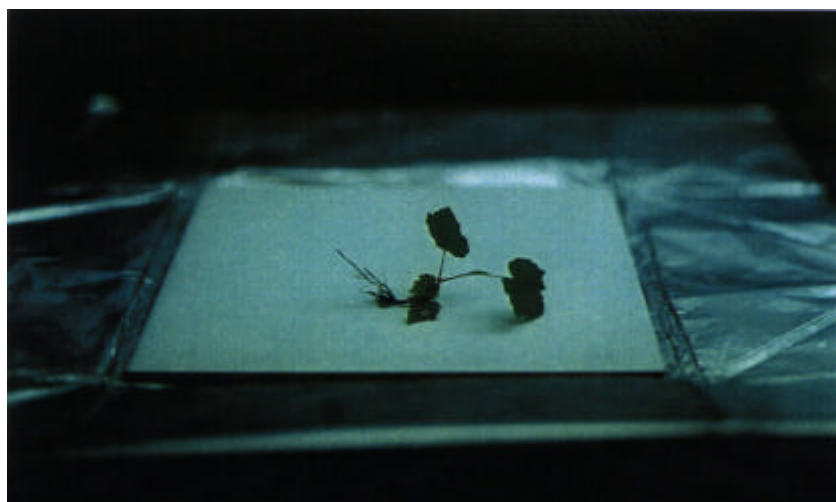
*Fig. 7: Plántula de vide obtida dun embrión somático. Na parte inferior dereita obsérvase un pequeno embrión somático*







*Fig. 8: Plántulas «in vitro» obtidas a partir de embrións somáticos*



*Fig. 9: Plántula lista para ser transplantada a solo*

Como exemplo dun **protocolo** a seguir debemos dispoñer de:

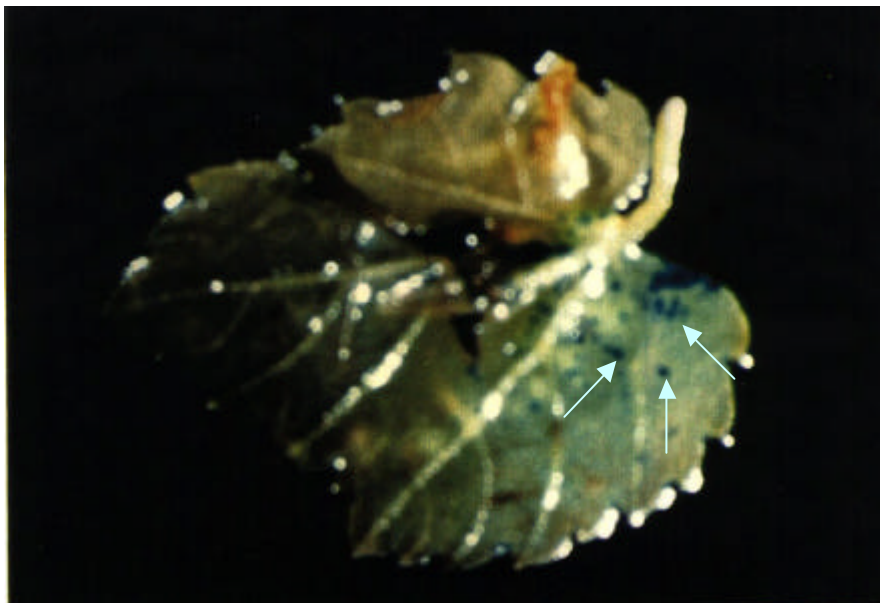
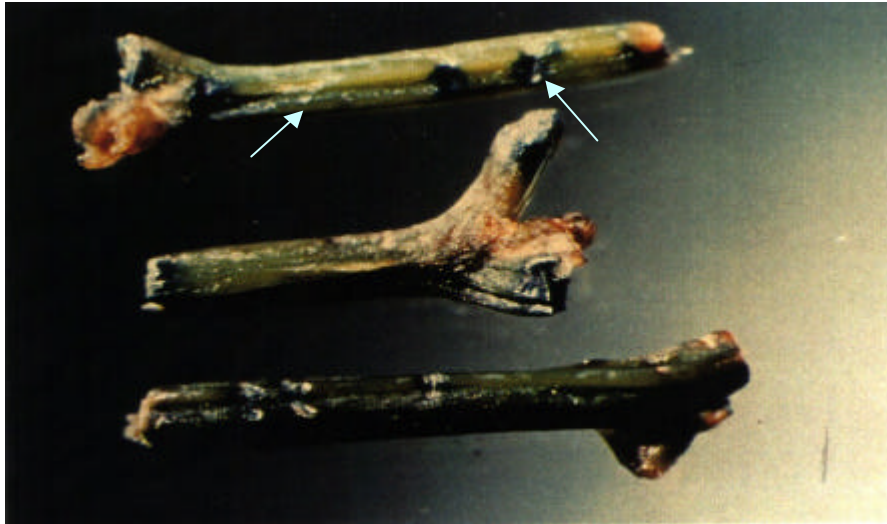
- a ) Un cultivo da bacteria que porta o plásmido armado cos xenes do noso interese. O cultivo realízase en medio líquido adecuado que contén, a parte dos nutrientes necesarios, o antibiótico (kanamicina) para o que é resistente e que elimina o medre doutras posibles cepas non resistentes.

- b) Material vexetal estéril que pode provir de cultivo «in vitro». Este material (ex: folla) córtase en pequenos trozos de 1 cm que se mergullan na solución bacteriana.
- c) Déixanse de 1 ata 12 horas segundo o tipo de tecido, o tipo de planta e o grao de susceptibilidade á infección. Pódese engadir á solución algunha substancia de tipo fenólico que actúe como sinal químico para a penetración da bacteria.
- d) Ó cabo dese tempo de inoculación, lávanse con auga estéril, sécanse sobre papel de filtro e cultívanse nunha placa de Petri que contén un medio nutritivo sólido ó que se lle engadiu un antibiótico (cefotaxime) que controle e deteña o medre da bacteria.
- e) Póñense as placas nunha cámara escura a 26° C durante 24 horas. Esta fase chámase co-cultivo e nela a bacteria vai penetrando nas células e transformándoas.
- f) Traspásanse os explantos a placas novas que conteñen medio sólido nutritivo cos reguladores de crecemento adecuados e ademais co antibiótico que controle o medre bacteriano.
- g) Déixanse as placas nas condicións, previamente establecidas, de luz e temperatura máis favorables para ese cultivo.
- h) Subcultívanse cada 4 a 6 semanas pasando os explantos a medio novo da mesma composición e compróbase a formación do calo e de posibles órganos como xemas ou raíces.
- i) Unha vez formadas as plantiñas, pásanse a frascos de vidro con medio novo e déixanse medrar para poder analizar se son plantas transxénicas ou non.

A análise de plantas transxénicas consiste principalmente en tres tipos de probas.

1. As histoquímicas e colorimétricas que indican, mediante unha reacción química, a presenza de células transformadas dando unha coloración particular a estas células, por exemplo azul no caso da presenza do xene **gus**, ou producindo luminiscencia como no caso do xene **luc** (que codifica para a luciferasa). Estas probas son as primeiras que soen facerse e corresponden a xenes avisadores como **gus** o **luc**. Sen embargo, os explantos utilizados morren durante a reacción química.
2. As de sistemas de selección de células transformadas que conteñen un xene marcador seleccionable. Só as células transformadas que conteñan o xene sobrevivirán cando se faga que medren nun medio nutritivo que conteña ademais algún sustrato específico para a expresión de ese xene. As células

e plantas transxénicas serán resistentes a ese sustrato. Inclúense os antibióticos, herbicidas ou altas concentracións doutros compostos como aminoácidos.

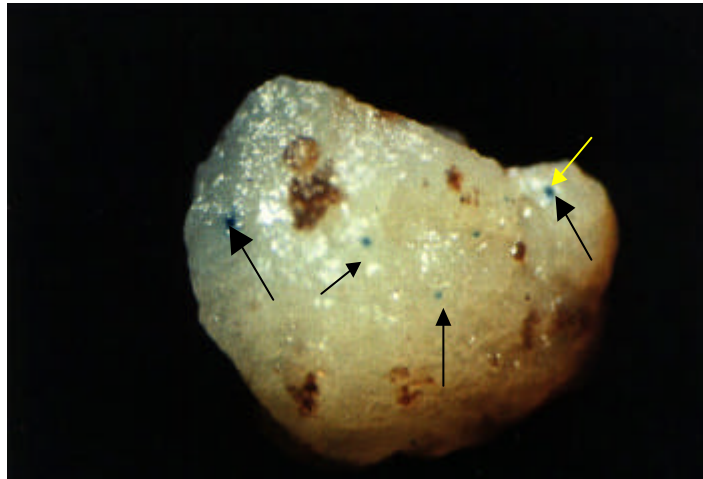


*Fig. 10 e 11: Explantos de talo e folla de vide. As zonas escuras sinaladas corresponden a células transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* portando un plásmido cos xenes *gus* e *nptII*. Tinción histoquímica X-Gluc.*

É o caso do xene marcador **nptII** que confire resistencia á kanamicina

3. As de análise do ADN das plantas supostamente transformadas. É a proba definitiva e concluínte. Realízase a extracción do ADN das células de follla, raíz ou calquera outra parte. Unha vez extraído e purificado amplifícase nun termociclador para obter maior tamaño de mostra (PCR) e compárase, mediante unha electroforese en xel de agarosa, coas mostras que conteñen as secuencias dos xenes que temos introducido, por exemplo a do xene **gus** e **nptII**. Ás mostras engádeselles unha substancia colorante visible á luz UV de unha  $\lambda$  determinada. As mostras que pertencen a plantas transformadas presentarán as súas manchas de ADN no xel á mesma distancia de percorrido que as mostras dos *primers*.

Existen outros tipos de análise, ben de tipo enzimático, con sondas de ADN etc., pero a súa explicación complicaría máis o panorama. Queda por dicir que o proceso de transformación de células vexetais é longo e laborioso, por non dicir complicado, e que ademais do sistema de transferencia dos plásmidos de *Agrobacterium*, existen outros métodos dispoñibles como o paso directo de ADN en protoplastos, o uso de transportadores químicos como o PEG (polietilenglicol), a electroporación mediante curtos pulsos eléctricos de alto voltaxe, o uso de biolística que emprega micropartículas de ouro ou tungsteno recubertas de ADN e lanzadas a alta velocidade por un disparo, a microproxección directa de ADN, e máis. Pero en calquera deles a eficacia de transferencia estable de xenes é sempre baixa.



*Fig. 12: As áreas sinaladas no calo corresponden a células transformadas mediante biolística, polo plásmido pVDH65 portando os xenes, **gus** e **nptII**. Tinción histoquímica X-Gluc*

**BIBLIOGRAFÍA**

- Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (1991): Micropropagation, technology and application. Kluwer Acad. Pub. London.
- Dixon, R.A. and Gonzales R.A. (1994): Plant cell culture: a practical approach. De. IRL-Press Limited. Oxford.
- Gamborg, O.L. and Philips, G.C. (1995): Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods. Springer-Verlag.
- Kung, S. and Wu, R. (1993): Transgenic plants. Vol I: Engineering and utilization; Vol. II: Present status and social and economic impacts. Academic Press. Inc.
- Lindsey, K. and Jones, M.G.K. (1992): Biotecnología vegetal agrícola. Ed. Acribia.
- Pierik, R.L.M. (1990): Cultivo «in vitro» de plantas superiores. De. Mundi-Prensa.
- Watson, J.D.; Tooze, J. and Kurtz, D. T. (1986): Ingeniería genética en plantas con plásmidos tumorales. En: ADN recombinante. Introducción a la ingeniería genética. Ed. Labor.
- Zrýd, J.P. (1988): Culture de cellules, tissus and organes vegetaux. Presses Polytechniques Romandes. Lausanne.Suiza.