

## 11. TRANSFERENCIA GENICA EN PLANTAS

*P. Carbonero y F. García-Olmedo*

---

Introducción

Polen como vector

Introducción de DNA exógeno durante la fecundación

Fusión de protoplastos

Virus vegetales como vectores potenciales

Vectores derivados de plásmidos Ti

Métodos de introducción directa de DNA exógeno en protoplastos

Objetivos y perspectivas

Bibliografía

---

### INTRODUCCION

La mejora genética de las especies vegetales cultivadas ha sido, y continuará siendo, una de las armas más decisivas en la lucha permanente por mantener los incrementos de la producción de alimentos por delante del crecimiento de la población humana. Puede afirmarse que el hombre ha practicado de un modo empírico la

mejora vegetal desde que, en los albores de la revolución agrícola, hace alrededor de 10.000 años, inició su gradual conversión de cazador-recolector en agricultor. Sin embargo, esta práctica no adquiere una sólida base científica hasta que, bien entrado ya el presente siglo, con cierta lentitud, asimila plenamente los conocimientos de la genética mendeliana.

La mejora convencional incide tanto sobre caracteres poligénicos (p. ej., rendimiento potencial) como sobre caracteres monogénicos (p. ej., enanismo o resistencia a ciertas enfermedades) manipulando el acervo génico comprendido dentro de las barreras específicas naturales que limitan el intercambio genético. La búsqueda de formas de obviar dichas barreras tiene un interés considerable, ya que, a menudo, la variabilidad genética (natural o inducida) disponible dentro de un ámbito específico no permite la obtención de algunas características altamente deseables en una planta concreta. En los últimos años se han producido avances importantes en las técnicas de transferencia interespecífica de genes en plantas, que permiten abrigar fundadas esperanzas sobre su aplicación práctica. En el presente capítulo pretendemos dar una sucinta visión de conjunto sobre estos avances y trataremos de evaluar los objetivos y perspectivas de estas investigaciones.

Los distintos métodos que se han explorado para la transferencia génica interespecífica en plantas los agruparemos a efectos de esta revisión en los siguientes tipos: a) ingeniería cromosómica (el polen como vector); b) introducción de DNA exógeno durante la fecundación; c) fusión de protoplastos; d) vectores víricos; e) vectores derivados de plásmidos Ti; f) introducción directa de DNA exógeno en protoplastos.

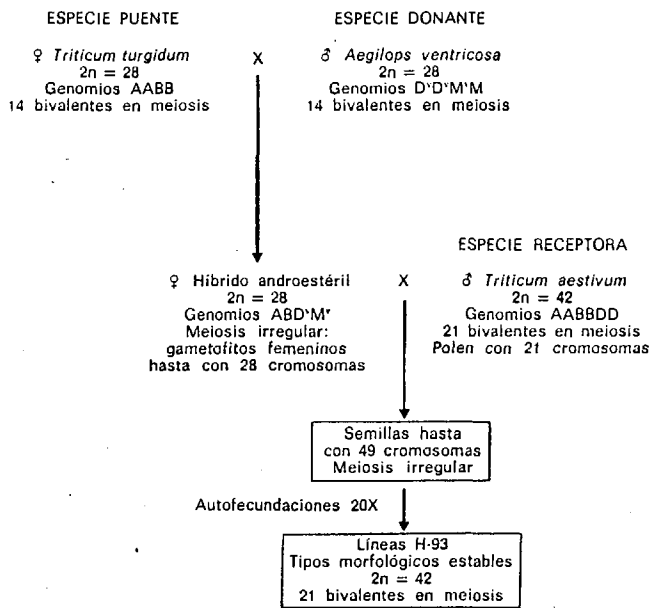


Fig. 1. Esquema de obtención de las líneas de trigo H-93, portadoras de genes transferidos desde la especie *Aegilops ventricosa*. Del cruzamiento de la especie donante y la especie puente se obtuvieron 10 individuos androestériles que fueron rescatados con polen de la especie receptora. Por autofecundaciones sucesivas se obtuvieron tipos morfológicos estables, la mayor parte de los cuales poseían 42 cromosomas (líneas H-93). En estas líneas se investigó la aparición de marcadores bioquímicos codificados por genes de los genomas D<sup>v</sup> y M<sup>v</sup> de la especie donante. Debido a homología parcial entre cromosomas del genoma D<sup>v</sup> de la especie donante y del D de la receptora, la frecuencia de genes de D<sup>v</sup> en las líneas H-93 fue mayor (30-60 %) que la de genes de M<sup>v</sup> (< 4 %). Las líneas H-93 fueron entonces ensayadas para resistencia al hongo *Pseudocercospora herpotrichoides* y una alta proporción de ellas mostraron un gran nivel de resistencia. La línea H-93-70, resistente en estado de plántula y adulto, fue cruzada con el trigo receptor. El híbrido presentó una meiosis regular. En su descendencia y en los retrocruzamientos apropiados, el carácter de resistencia se transmitió como determinado por un solo gen dominante. (Adaptado de ref. 5.)

**POLEN COMO VECTOR**

Se han realizado progresos importantes en las técnicas de hibridación interespecífica e intergenérica, incluso entre especies distantes, usando al límite la vía sexual (9). En ciertos casos, la polinación forzada con polen heterólogo produce, aunque con baja frecuencia, hibridaciones que dan lugar a embriones de desarrollo precario. Estos embriones pueden ser salvados mediante cultivo *in vitro*, obteniéndose plantas híbridas adultas. Las plantas híbridas serán en general androestériles y han de rescatarse fecundándolas con polen homólogo o heterólogo de una especie suficientemente afin. De este modo es posible transferir genes entre especies más o menos distantes, ya sea directamente o a través de otra especie, que actúa de intermediaria (especie «puente»). El seguimiento de la transferencia de un gen, segmento cromosómico o cromosoma completo en estas transferencias se realiza mediante el uso de marcadores bioquímicos de los cromosomas manipulados y mediante métodos citogenéticos. El conjunto de esta metodología se conoce desde hace tiempo con el nombre genérico de ingeniería cromosómica. De todos los tipos de métodos que tratamos en esta revisión, la ingeniería cromosómica ha sido el único que ha sido aplicado prácticamente en mejora vegetal, especialmente en el caso de los cereales, que re-

presentan alrededor de los dos tercios de la superficie sembrada (7, 9, 10). Para ilustrar este tipo de manipulaciones, se resume en la figura 1 el proceso de transferencia, desde la especie silvestre *Aegilops ventricosa* a trigo cultivado, de un gen dominante que determina un alto nivel de resistencia a la enfermedad causada por el hongo *Pseudocercospora herpotrichoides* (5). Este hongo es responsable de considerables pérdidas de rendimiento en extensas áreas de cultivo del trigo en Europa, América del Norte y del Sur, Africa, Australia y Nueva Zelanda. El nivel de tolerancia de los actuales cultivos de trigo es muy bajo y no se había descrito hasta ahora ningún gen de resistencia en ninguna especie. Se conocía desde hace 50 años que la especie *Ae. ventricosa* posee un alto nivel de resistencia y habían sido numerosos los intentos previos de obtener trigos altamente resistentes, sin que hasta ahora se hubiera alcanzado dicho objetivo.

**INTRODUCCION DE DNA EXOGENO DURANTE LA FECUNDACION**

Diversas publicaciones recientes (8, 13, 14, 16) sugieren que es posible la introducción de DNA exógeno en algún momento del proceso de fecundación. La transformación postulada podría afectar inicialmente las células terminales del tubo polínico en germinación, que carecen de pared celular, o podría ocurrir en el gametofito femenino de forma concomitante con la fertilización. Así, un grupo de la República Popular China (Zhou y cols., 1983), trabajando con especies del género *Gossypium* (algodón), han desarrollado un protocolo que consiste esencialmente en la inyección de DNA (~10<sup>7</sup> daltons), parcialmente protegido con histonas, en el eje placentario, un día después de la autopolinación. Un procedimiento distinto, seguido por el grupo de Harlan en Illinois, trabajando con maíz, consiste en germinar polen *in vitro* y mezclarlo con el DNA exógeno antes de utilizarlo para polinizar.

En la mayoría de los casos aludidos, el DNA exógeno utilizado correspondía a especies relativamente próximas a la receptora y la prueba de transformación obtenida consistía fundamentalmente en la aparición de caracteres fenotípicos en la descendencia de las plantas tratadas que no se encontraban en las no tratadas y aparentemente correspondían a la especie donante. Sin embargo, la prueba definitiva sobre la viabilidad de los métodos de transformación propuestos pasa necesariamente por la utilización de un DNA exógeno bien caracterizado y homogéneo, que pueda ser identificado física y funcionalmente en la descendencia por métodos moleculares de sondeo (hibridaciones DNA/DNA o RNA/DNA). De confirmarse esta vía de acceso para genes exógenos, tendría una gran trascendencia práctica, ya que permitiría la transformación de monocotiledóneas, entre las que se incluyen las especies cultivadas más importantes y para las que no son aplicables los métodos de transformación desarrollados hasta ahora.

**FUSION DE PROTOPLASTOS**

Una vía potencial de transferencia génica entre especies sexualmente incompatibles ampliamente divergentes es la fusión de protoplastos. Hoy es posible obtener

protoplastos, es decir, células a las que se elimina enzimáticamente la pared celular, en un número creciente de especies vegetales y realizar fusiones interespecíficas con los protoplastos así obtenidos (3, 4, 6). El procedimiento más generalmente utilizado implica un tratamiento con polietilenglicol, así como variaciones sucesivas de la concentración de iones calcio y del pH. La fusión celular podrá ser seguida de la fusión de los núcleos, y en este caso se obtendrá un híbrido celular estable, con una dotación cromosómica doble de la correspondiente a un híbrido sexual, ya que lo que se funde son células somáticas diploides. Este híbrido poseerá los genomas citoplásmicos (cloroplastos y mitocondrias) correspondientes a los dos parentales, lo que contrasta también con el caso del híbrido sexual, que sólo recibe los genomas citoplásmicos maternos. En algunos casos se consigue regenerar plantas a partir de los híbridos celulares. Estas plantas, que son a menudo estériles, especialmente cuando proceden de fusiones muy divergentes, pueden, a su vez, ser utilizadas en ulteriores manipulaciones genéticas para transferir el material genético que interese a la planta receptora final.

En la fusión de protoplastos de especies más o menos distantes pueden producirse fenómenos tales como la eliminación unidireccional de uno de los genomas parentales, incluso con la retención de cromosomas recombinados que incluyan genes del genoma parental eliminado. Es también posible, mediante irradiación u otros tratamientos que desestabilizan los cromosomas nucleares, convertir la fusión de protoplastos en una transferencia unidireccional del genoma nuclear de uno de los parentales y obtener así nuevas combinaciones genéticas núcleo-citoplásmicas (cibridos). Las dificultades actuales a una aplicación práctica generalizada de la fusión de protoplastos a la mejora vegetal no parecen ser insalvables y apuntan hacia la necesidad de un mayor esfuerzo de investigación en áreas tales como las siguientes: a) obtención de protoplastos viables en un mayor número de especies, sobre todo en las más importantes económicamente; b) desarrollo de marcadores genéticos seleccionables que permitan discriminar los productos de fusión entre los protoplastos parentales; c) búsqueda de combinaciones genéticas y de condiciones culturales que den lugar a planta adulta, y d) investigación de combinaciones específicas divergentes que den plantas fértiles y de manipulaciones que permitan rescatar material genético en híbridos estériles.

La mayoría de los híbridos somáticos obtenidos hasta ahora han implicado especies solanáceas; el ejemplo más típico es el de los híbridos somáticos de patata y tomate, pero paulatinamente se van obteniendo híbridos en otros sistemas fuera de esta familia. En este contexto, merecen mencionarse los resultados preliminares obtenidos por varios grupos que apuntan a un posible resultado práctico en relación con la obtención de variedades de *Brassica napus* (colza) resistentes a los herbicidas del grupo de las triazinas (1). El esquema general para convertir especies cultivadas en resistentes a las triazinas por fusión de protoplastos se presenta en la figura 2. Se han encontrado mutantes en la especie silvestre *Brassica campestris*, que son resistentes a las triazinas. Dichos mutantes muestran alterada la proteína QB, que está codificada por el cloroplasto. Para realizar la conversión, se funden protoplastos de la especie receptora con protoplastos de la donante, a los que se les ha destruido la información nuclear por irradiación, y se seleccionan los

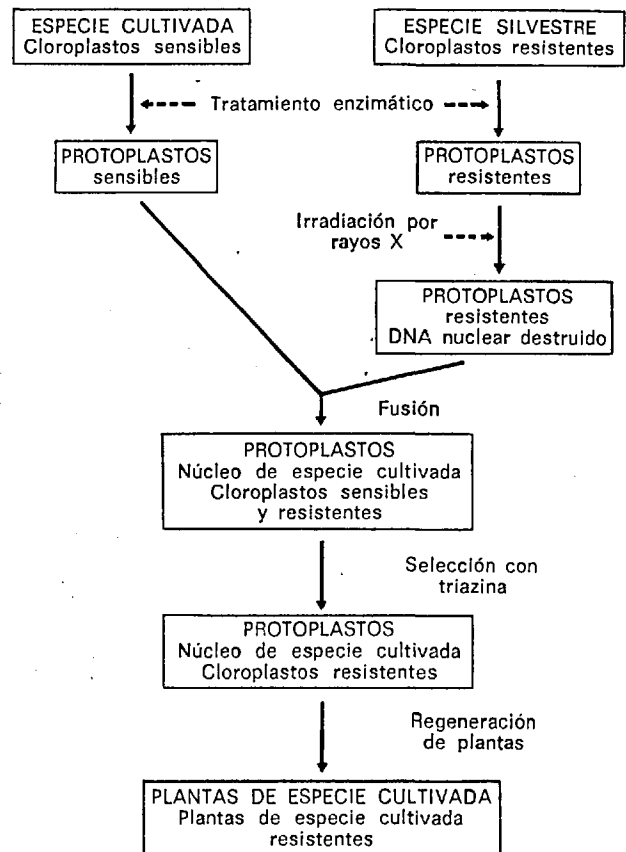


Fig. 2. Esquema general de la transferencia de la resistencia a triazinas de una especie silvestre resistente a una cultivada sensible.

híbridos resultantes (cibridos) en presencia del herbicida. Estos cibridos poseerán la información nuclear de la especie cultivada y los cloroplastos resistentes de la especie silvestre. A partir de los híbridos celulares se regenera la planta adulta.

## VIRUS VEGETALES COMO VECTORES POTENCIALES

Entre los procedimientos investigados para la introducción de DNA foráneo en plantas, han ocupado un lugar central los basados en la manipulación de sistemas patógenos naturales, tales como virus o plásmidos. Un vector de tal naturaleza ha de poseer, o ser susceptible de ser modificado para adquirir, una serie de propiedades entre las que cabe destacar tres: a) poseer un marcador seleccionable en la célula vegetal; b) disponer de un sitio para la inserción del DNA foráneo o pasajero, y c) ser capaz de replicarse autónomamente en la célula vegetal o de integrarse en uno de sus cromosomas. Los vectores basados en virus vegetales serían, en principio, de replicación autónoma. Aunque se han propuesto posibles estrategias para la utilización de viroides y de virus RNA como posibles vectores, éstas son demasiado especulativas por el momento. Más realistas han sido las propuestas basadas en virus DNA: los virus gémmini de cadena sencilla y los colimovirus de doble cadena. El estudio de los virus gémmini no ha progresado suficientemente como para intentar su utilización como vectores, mientras que el de los colimovirus ha progresado más, y se ha ensayado repetidas veces la inserción de DNA pasajero.

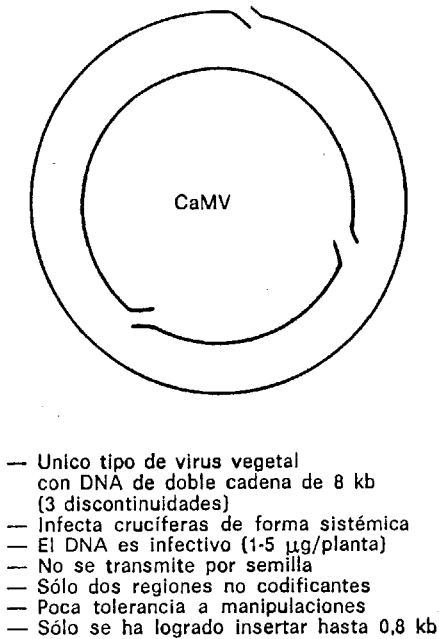


Fig. 3. Esquema y propiedades del virus del mosaico de la coliflor (CaMV).

Los colimovirus son virus relativamente específicos que infectan especies de la familia de las crucíferas (12). El virus de este tipo mejor estudiado es el del mosaico de la coliflor (CaMV). En la figura 3 se representa el DNA de este virus, que es circular, con tres discontinuidades, y se enumeran algunas de las propiedades más salientes. La principal dificultad hasta ahora para su utilización como vector ha sido la facilidad con que pierde su funcionalidad al insertarse piezas de DNA demasiado grandes, siendo el máximo tamaño insertado con éxito hasta ahora de sólo 0,7-0,8 kb. Recientemente, el grupo de T. Hohn, en Basilea (Suiza) parece haber conseguido con este vector la expresión de un gen bacteriano para la dihidrofolato reductasa, lo que confiere resistencia a methotrexato a toda la planta infectada por el virus.

### VECTORES DERIVADOS DE PLASMIDOS Ti

Las bacterias de la especie *Agrobacterium tumefaciens* son capaces de infectar un amplio espectro de plantas dicotiledóneas e inducir tumores que, una vez inducidos, no requieren la presencia de las bacterias para su crecimiento. Las células tumorales tienen la propiedad de crecer autónomamente en un medio de cultivo desprovisto de hormonas vegetales, hormonas que sí se requieren para hacer crecer las células normales y, por otra parte, sintetizan unas sustancias específicas del tumor, denominadas opinas. Estas sustancias pueden servir de sustrato carbonado y nitrogenado específico para la bacteria, ya que ésta posee las enzimas necesarias para su catabolismo. Las propiedades de *A. tumefaciens* que acabamos de describir están codificadas genéticamente en un plásmido denominado Ti (*tumor inducing*). Los primeros vectores eficaces que se han logrado refinar para introducir DNA foráneo en células vegetales son derivados de este tipo de plásmidos (2, 15).

Los plásmidos Ti, que son de gran tamaño (100-200 kb), se representan de forma simplificada en la figura 4, y en dicho esquema se indica la localización aproximada de los elementos genéticos más interesantes desde nues-

tro punto de vista. Una porción del plásmido, el T-DNA, es transferida a un cromosoma de la célula vegetal e integrada en él. El T-DNA contiene, entre otros, los genes que determinan la síntesis de opina (gen *os*) y la morfología del tumor (3 genes *tum*), y está flanqueado por dos repeticiones imperfectas y directas de 25 pares de bases. Aparte el T-DNA, una segunda región del plásmido Ti resulta esencial para la formación de células transformadas, la denominada región de virulencia, constituida por al menos 10 grupos de complementación (*vir*). Al parecer, para la integración estable del T-DNA en el cromosoma vegetal sólo se requiere que sus extremos, incluidas las secuencias repetidas flanqueantes, estén intactos y los genes *vir* sean funcionales. Se ha demostrado que es posible sustituir la mayor parte del T-DNA por DNA foráneo de igual o incluso mayor tamaño. Una célula vegetal transformada con un plásmido Ti que carezca de genes *tum* funcionales no formará tumores y carecerá de la propiedad de crecimiento autónomo, por lo que, al carecer de este carácter seleccionable, será más difícil de identificar como tal. La acción de los genes *tum* mantiene las células desdiferenciadas y hace muy difícil regenerar plantas a partir de ellas por los métodos usuales. Sin embargo, esta dificultad no parece existir para células transformadas con un T-DNA sin genes *tum* activos. Por último, la funcionalidad del gen para la síntesis de opina (*os*) no es requerida para la integración estable del T-DNA ni para la formación de tumor. Dicha función es simplemente parte del mecanismo por el cual la bacteria se beneficia específicamente de la inducción del tumor, ya que la capacidad de catabolizar la opina está codificada en un locus de la parte que no se integra del plásmido Ti.

Sobre la base de las observaciones que acabamos de resumir, se han diseñado derivados de plásmidos Ti aptos para ser utilizados como vectores. Las características generales más importantes de estos plásmidos vectores son una facilidad considerable para la inserción del DNA pasajero y la propiedad de permitir la transferencia eficiente del DNA a la célula vegetal sin interferir con el crecimiento y desarrollo normal de la planta. Entre los vectores desarrollados, nos referiremos, a título de ejemplo, al plásmido pGV3850, recientemente descrito por el grupo de S. Schell y M. van Montagu (15). Este plásmido ha sido diseñado con las siguientes características específicas: a) posee las regiones terminales del T-DNA, así como las regiones flanqueantes que no forman parte de éste; b) incluye el gen para la síntesis de opina, en este caso el gen que codifica la nopalinsintetasa (*nos*), que está situado en un locus contiguo al extremo derecho del T-DNA, y c) los genes que determinan el fenotipo tumoral desdiferenciado (*tum*), localizados en la parte interna del T-DNA, han sido sustituidos por el DNA del plásmido de *E. coli* pBR322, el cual es ampliamente usado para clonar en dicha bacteria. Estas

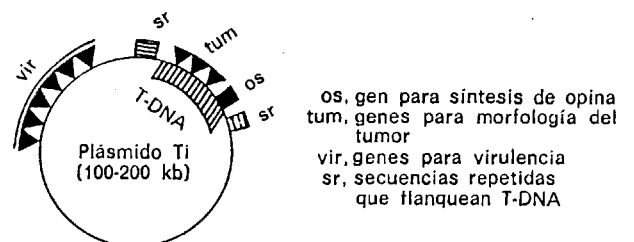


Fig. 4. Representación esquemática de un plásmido Ti.

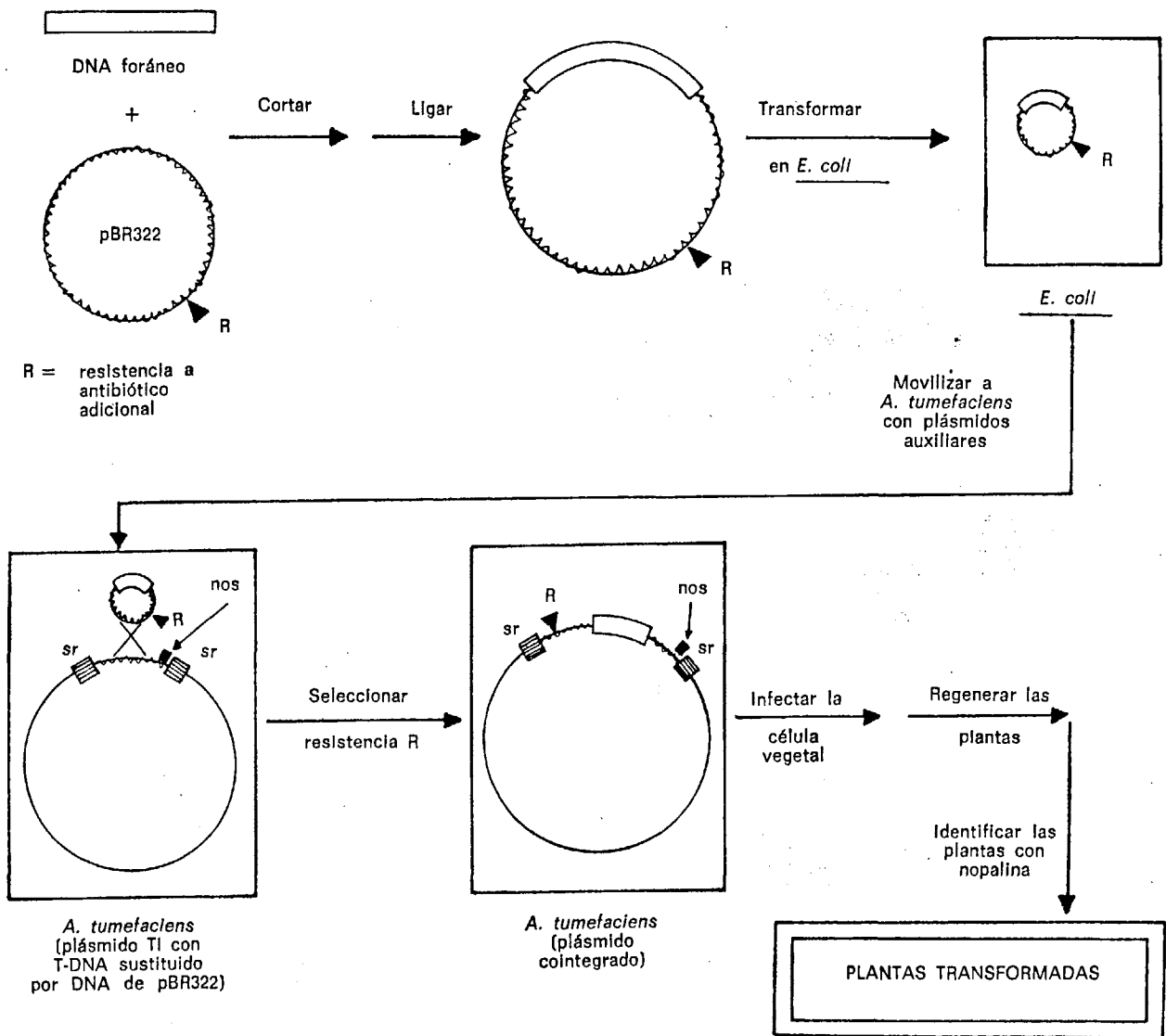


Fig. 5. Esquema general de transformación de plantas utilizando un derivado de un plásmido Ti como vector. En dicho derivado se ha sustituido la parte central del T-DNA, que incluye los genes que determinan el cruzamiento autónomo y la morfología del tumor, por DNA del plásmido pBR322. El plásmido derivado retiene el gen para la síntesis de opina (nopalín-sintetasa, nos) y las secuencias repetidas flanqueantes del T-DNA (sr). El DNA foráneo se clona inicialmente en *E. coli*, utilizando el plásmido pBR322, al que se ha introducido un gen adicional para resistencia a un antibiótico distinto de la ampicilina. b) Movilización del pBR322 con el DNA insertado desde *E. coli* a un *A. tumefaciens*, que albergue el vector pGV3850, con la ayuda de plásmidos auxiliares. Al no poderse replicar autónomamente en *A. tumefaciens*, el plásmido pBR322 transferido sólo podrá perdurar en esta bacteria cointegrándose por recombinación con el plásmido pGV3850, que sí es capaz de replicarse. Los cointegrados se seleccionan fácilmente creciendo en presencia del antibiótico cuyo gen para resistencia está presente en el pBR322 movilizado. c) La bacteria *A. tumefaciens*, portadora del plásmido debido a la cointegración, es utilizada para transformar las células vegetales, a nivel de planta entera o de protoplastos. d) A partir de cé-

secuencias de pBR322 incorporadas al vector permiten la recombinación homóloga entre este plásmido y un pBR322 portador de DNA foráneo clonado en él. El esquema operativo, que se representa en la figura 5, comprende las siguientes etapas: a) Clonación del DNA foráneo en la bacteria *E. coli*, utilizando el plásmido pBR322, al que se ha introducido un gen adicional para resistencia a un antibiótico distinto de la ampicilina. b) Movilización del pBR322 con el DNA insertado desde *E. coli* a un *A. tumefaciens*, que albergue el vector pGV3850, con la ayuda de plásmidos auxiliares. Al no poderse replicar autónomamente en *A. tumefaciens*, el plásmido pBR322 transferido sólo podrá perdurar en esta bacteria cointegrándose por recombinación con el plásmido pGV3850, que sí es capaz de replicarse. Los cointegrados se seleccionan fácilmente creciendo en presencia del antibiótico cuyo gen para resistencia está presente en el pBR322 movilizado. c) La bacteria *A. tumefaciens*, portadora del plásmido debido a la cointegración, es utilizada para transformar las células vegetales, a nivel de planta entera o de protoplastos. d) A partir de cé-

lulas potencialmente transformadas, se regeneran plantas y a posteriori se investiga cuáles de éstas proceden efectivamente de una célula transformada. Esta comprobación, que no es tan laboriosa como pudiera parecer, porque la frecuencia de transformación es alta, puede realizarse investigando la síntesis de opina (nopalina) o por hibridación tipo Southern, usando el DNA foráneo como sonda. Si, en lugar del gen de la nopalín-sintetasa, se utiliza un gen determinante de un carácter seleccionable en la célula vegetal, por ejemplo, un gen para resistencia a kanamicina, el proceso de obtención de plantas transformadas puede simplificarse.

Un aspecto crucial que hay que resolver en relación con la transferencia de genes a células vegetales es el de la expresión de estos genes. Los intentos iniciales de expresar genes eucarióticos heterólogos bajo sus propias señales de transcripción no han dado resultados positivos. Para resolver este problema se optó por utilizar las señales promotoras y terminadoras correspondientes al ya mencionado gen de la nopalín-sintetasa (nos). Se construyeron vectores de expresión en los que estas se-

ñales estaban separadas por sitios de restricción, en los que podía insertarse cualquier secuencia codificante de interés. Dado el interés práctico que en las manipulaciones genéticas tienen los genes que determinan caracteres seleccionables, estos vectores se han utilizado para expresar genes para resistencia a antibióticos, tales como G-418, kanamicina o metotrexato, que son altamente tóxicos para células vegetales no transformadas. Una tecnología similar ha permitido también la transferencia y expresión del gen que codifica la faseolina, proteína mayoritaria de la judía (*Phaseolus vulgaris*), en una especie tan distante como el girasol (*Helianthus annuus*) (11).

En la actualidad, diversos grupos trabajan intensamente en el ensayo de variantes de este tipo de vectores. Merece mención la idea, cuya viabilidad ha sido en parte demostrada, de utilizar un sistema binario de vectores: un plásmido portador de las funciones vir y otro portador de las secuencias flanqueantes del T-DNA, el carácter seleccionable en la célula vegetal y el sitio para inserción del DNA pasajero.

### MÉTODOS DE INTRODUCCIÓN DIRECTA DE DNA EXÓGENO EN PROTOPLASTOS

Existe un interés especial en poner a punto métodos de introducción de DNA exógeno en células vegetales, ya que una mayoría de las plantas de interés económico, incluidos los cereales, son monocotiledóneas, que no pa-

Tabla 1. Posibles objetivos de la manipulación genética en plantas cultivadas

Tipo de mejora	Objetivos
Factores del rendimiento	Incremento de fijación de CO <sub>2</sub> ¿Bloqueo de la fotorrespiración? Incremento de fijación de N <sub>2</sub> Nuevos sistemas (genes nif a plantas; simbiosis en cereales; fijación asociativa) Simbiosis en leguminosas (mejora de la eficiencia; cepas superfijadoras)
Factores adversos del suelo	Resistencia a Salinidad (osmorregulación) Acidez (subsuelos tropicales) Alcalinidad Toxicidad del aluminio
Factores adversos del clima	Resistencia a Sequía Temperaturas extremas
Enfermedades y plagas	Manipulación de Fitopatógenos Insectos Resistencia a Enfermedades Plagas Herbicidas
Factores de calidad	Calidad nutritiva Incremento de aminoácidos esenciales Eliminación de factores antinutritivos Calidad tecnológica
Nuevas capacidades productivas	Producción de ¿Insulina? ¿Interferón?

recen ser susceptibles de recibir información genética a través de vectores derivados de plásmidos Ti. Esencialmente se han intentado tres metodologías, que comentaremos brevemente: la transformación directa, la microinyección y la fusión con vesículas artificiales.

Parece estar bien establecido que es posible transformar directamente protoplastos vegetales por métodos de transformación similares a los utilizados en bacterias y células de mamífero: poli-L-ornitina, Ca<sup>++</sup>/alto pH o polietilenglicol (3). La primera transformación estable de células vegetales superiores por DNA aislado se consiguió incubando en presencia de poli-L-ornitina una suspensión de protoplastos de *Petunia* con plásmidos Ti purificados, utilizando el crecimiento autónomo (sin hormonas) como carácter seleccionable. El progreso de esta tecnología se ha visto entorpecido por la falta de marcadores seleccionables. Su desarrollo hace pensar en una más amplia aplicación de esta tecnología en el futuro.

La microinyección de DNA, que se ha mostrado factible en ciertas células animales, ha presentado especial dificultad en el caso de protoplastos vegetales, al parecer por la dificultad de fijar éstos a un sustrato. Recientemente, el laboratorio de R. M. Goodman (Calgene Inc. Davis, Ca.) parece haber superado los problemas mecánicos de la microinyección. Queda por demostrar la integración estable y posible expresión de un DNA apropiado.

La inclusión en una vesícula lipídica artificial (liposoma) del DNA que se desea introducir y la fusión de la vesícula con el protoplasto vegetal constituyen una técnica cuya viabilidad parece haberse demostrado, aunque, de nuevo, todavía no se han publicado pruebas fehacientes de integración y expresión de DNA exógeno.

Finalmente, en relación con todas estas técnicas es conveniente volver a resaltar que todavía existen limitaciones en la obtención de protoplastos viables y en la regeneración de plantas a partir de éstos, para muchas especies agrícolas importantes.

### OBJETIVOS Y PERSPECTIVAS

Se acepta de un modo general que el pleno desarrollo de las técnicas de transferencia génica, que hemos resumido brevemente en esta revisión, han de tener un considerable impacto en el avance de nuestros conocimientos botánicos. Sin embargo, respecto a las repercusiones prácticas de esta nueva tecnología existe una cierta controversia. Por un lado, algunos mejoradores prestigiosos son escépticos en relación con la utilidad real de dichas técnicas en mejora vegetal. Por otro lado, ciertos biólogos han prometido de forma arrogante solucionar los problemas de la producción de alimentos por técnicas de DNA recombinante. Intentaremos aquí conciliar estas posturas antagónicas.

Hemos indicado ya que la mejora vegetal incide tanto sobre caracteres poligénicos como sobre caracteres dependientes de uno o pocos genes. Es razonable pensar que las técnicas descritas van a ser de poca utilidad en el manejo de caracteres poligénicos, tales como el rendimiento potencial o la adaptabilidad. Sin embargo, estamos firmemente convencidos de que eventualmente estas técnicas van a ser de amplísima aplicación en el manejo de caracteres monogénicos. De la lista de posibles objetivos presentada en la tabla 1, que evidentemente no es exhaustiva, cabe señalar objetivos imposibles de alcanzar de momento, como, por ejemplo, la

incorporación y expresión de los genes nif en plantas, y objetivos que están siendo abordados ya con ciertas probabilidades de éxito, como la resistencia a ciertos herbicidas o a la toxicidad de metales pesados. Es de señalar que la introducción de genes foráneos en plantas, sobre todo si estos genes proceden de *taxa* muy alejados, puede afectar negativamente los factores productivos. Esto implicaría la necesidad de compensar dicho efecto negativo, reajustando el fondo genético por los métodos convencionales de mejora. En suma, la mejora convencional seguirá mediando el lanzamiento de productos terminados (semillas) al mercado, pero cabe esperar contribuciones crecientes de las nuevas técnicas a dichos productos.

#### BIBLIOGRAFIA

- Arntzen, C. J., y Duesing, J. H. (1984): Chloroplast-encoded herbicide resistance. En Ahmad, F.; Schulz, J.; Downey, K., y Voellmy, R. W. (dirs.): *Advances in Gene Technology: molecular genetics of plants and animals*. Academic Press (en prensa).
- Caplan, A.; Herrera-Estrella, L.; Inzé, D.; Van Haute, E.; Van Montagu, M.; Schell, J., y Zambryski, P.: (1983): Introduction of genetic material into plant cells. *Science*, 222, 815-821.
- Cocking, E. C.; Davey, M. R.; Pental, D., y Power, J. B. (1981): Aspects of plant genetic manipulation. *Nature* (Londres), 293, 265-270.
- Constabel, F. (1976): Somatic hybridization in higher plants. *In vitro*, 12, 743-748.
- Doussinault, G.; Delibes, A.; Sánchez-Monge, R., y García-Olmedo, F. (1983): Transfer of a dominant gene for resistance to eyespot disease from a wild grass to hexaploid wheat. *Nature* (Londres), 303, 698-700.
- Evans, D. A. (1983): Agricultural applications of protoplast fusion. *Biotechnology*, 1, 253-261.
- García-Olmedo, F.; Carbonero, P., y Jones, B. L. (1982): Chromosomal control of wheat endosperm proteins. En Pomeranz, Y. (dir.): *Advances in Cereal Science and Technology*, vol. 5, 1-47. AACCC, Saint Paul.
- Hess, D. (1980): Investigations on the intra and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as a vector. *Zeitschr. Pflanzenphysiol.*, 98, 321-337.
- Lacadena, J. R. (1978): Interspecific gene transfer in plant breeding. En Sánchez-Monge, E., y García-Olmedo, F. (dirs.): *Interspecific hybridization in plant breeding*, 45-62. Eucarpia, Madrid.
- Law, C. N. (1983): Chromosome engineering in wheat breeding and its implications for molecular genetic engineering. En Setlow, J. K., y Hollaender, A. (dirs.): *Genetic Engineering: principles and methods*, vol. 5, 157-172. Plenum Press, Nueva York.
- Murai, N.; Sutton, D. W.; Murray, M. G.; Slightom, J. L.; Merlo, D. J.; Reichert, N. A.; Sengupta-Gopalan, C.; Stock, C. A.; Barker, R. F.; Kemp, J. D., y Hall, T. C. (1983): Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor-inducing plasmid vector. *Science*, 222, 476-482.
- Old, R. W., y Primrose, S. B. (1981): *Principles of Gene Manipulation: an introduction to genetic engineering*. Blackwell, Oxford.
- Soyfer, V. N. (1980): Hereditary variability of plants under the action of exogenous DNA. *Theor. Appl. Genet.*, 58, 225-235.
- Wet, J. M. J. de; Bergquist, R. R.; Harlan, J. R.; Brink, D. E.; Cohen, C. E.; Newell, C. A., y De Wet, A. E. (1984): Manipulating the maize genome through sexual transfer of exogenous DNA fragments. *Theor. Appl. Genet.* (en prensa).
- Zambryski, P.; Joos, H.; Genetello, C.; Leemans, J.; Van Montagu, M., y 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.
- Zhou, G.; Weng, J.; Zeng, Y.; Huang, J.; Qian, S., y Liu, G. (1983): Introduction of exogenous DNA into cotton embryos. En Wu, R.; Grossman, L., y Moldave, K. (dirs.): *Methods in Enzymology*, vol. 101, 433-481. Academic Press, Londres.