

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS PARA RESISTENCIA A VIRUS

por

Elizabeth Hodson de Jaramillo *

Resumen

Hodson de Jaramillo, E.: Transformación genética de plantas para resistencia a virus. Rev. Acad. Colomb. Cienc. **29** (110): 5-24, 2005. ISSN: 0370-3908.

El desarrollo de técnicas de manipulación genética constituye un valioso apoyo a los sistemas de mejoramiento convencional, principalmente en aquellas situaciones en las cuales el acceso a genes de interés se encuentra limitado. La utilización de cultivos transgénicos comerciales se ha expandido en el mundo en forma acelerada desde cuando se aprobó su uso en 1994, y son numerosos los beneficios que se han determinado para el agricultor y para el ambiente. El presente artículo presenta el contexto general de la manipulación genética de cultivos, un ejemplo de desarrollos en Colombia, relativos a la transformación genética de *Passiflora edulis* para darle resistencia a virus y también hace referencia a aspectos de bioseguridad.

Palabras clave: Plantas transgénicas, transformación genética, *Passiflora edulis*, bioseguridad.

Abstract

The development of genetic manipulation techniques has become an important tool for conventional crop breeding programs, especially where the required genes for breeding are limited. The commercialization and worldwide use of transgenic plants has been expanding since their approval for liberation in 1994, showing several benefits for the farmers as well as for the environment. This paper presents the general context of crop genetic manipulation, an example of developments in Colombia in genetic transformation of *Passiflora edulis* for virus resistance, and finally it refers to Biosafety issues.

Key words: Transgenic plants, genetic transformation, *Passiflora edulis*, Biosafety.

* Profesor Titular Facultad de Ciencias, Pontificia Universidad Javeriana. Directora Unidad de Biotecnología Vegetal, Departamento de Biología, P.U.J. e-mail: ehodson@javeriana.edu.co

Introducción

Este artículo se presenta en tres secciones: la primera ofrece un contexto general sobre el mejoramiento de cultivos mediante técnicas de manipulación genética, sus principales conceptos y principios, así como una visión global sobre el tema. La segunda sección presenta un ejemplo de experiencias en Colombia: la transformación genética de *Passiflora edulis* para obtener resistencia a los virus. La tercera sección, relacionada con aspectos generales de bioseguridad, plantea la importancia del fortalecimiento en este campo para una adecuada y segura aplicación de los desarrollos biotecnológicos.

I.- Mejoramiento de cultivos y manipulación genética

Agricultura y mejoramiento de cultivos

La selección y el mejoramiento de cultivos se iniciaron desde que la humanidad, hace más de 10.000 años, dejó de ser nómada para establecerse en zonas o regiones en donde se encontraban alimentos y condiciones adecuadas para su bienestar. El cambio de los hábitos de caza, pesca y de recolección de plantas al de cultivos agrícolas se consideró tan importante que se denominó la “revolución neolítica”. La era neolítica fue una etapa de la evolución de la humanidad caracterizada por el desarrollo de nuevas herramientas y métodos de supervivencia. El sedentarismo eventualmente ocasionó un incremento en el crecimiento de la población y las sociedades desarrollaron sistemas de organización jerárquica. Como componente de este proceso, se inició la domesticación de cultivos y animales dirigida a satisfacer las necesidades del cultivador y del usuario, lo cual condujo a cambios en la composición genética de los organismos domesticados. A partir de ese momento la humanidad empezó a reducir el número de especies de las cuales procuraba alimento, utilizando preferencialmente aquéllas que le permitían obtener mejores productos o mayores rendimientos. Por otra parte, los viajes de exploración modificaron considerablemente la agricultura mundial. El intercambio intercontinental de especies vegetales alteró en forma sustancial la distribución y abundancia de muchas especies de uso agrícola. Plantas domesticadas en una región del mundo, con frecuencia encontraban en otro sitio condiciones similares, o aún más ventajosas para su desarrollo.

El mejoramiento y la manipulación genética se iniciaron, desde cuando se originó la agricultura; entonces el hombre empezó a cruzar plantas o animales para que expresaran características particulares. Durante mucho tiempo esta manipulación se limitó a la selección artificial de características deseadas en los individuos de una pobla-

ción, y a intercambios genéticos entre especies relacionadas. Estos cambios dependían de la variación genética disponible en las poblaciones, y de la estabilidad de los mismos, de su transferencia a las siguientes generaciones (Chrispeels & Sadava, 2003). Desde su inicio, el mejoramiento de cultivos, ha buscado responder a requerimientos de producción, tales como el manejo de plagas y enfermedades, rendimiento y calidad del producto cosechado, respuesta a insumos, características para el procesamiento del producto, arquitectura de la planta y tolerancia a factores abióticos, entre otros.

La selección y mejoramiento de cultivos, así como las prácticas agrícolas convencionales, durante más de 10.000 años, han ocasionado una serie de impactos ambientales entre los cuales la erosión genética es uno de los que está causando mayor preocupación. Los fitomejoradores han visto limitadas las posibilidades de mejoramiento mediante las técnicas convencionales, debido a la reducción del acervo genético de las especies cultivadas y de sus parientes silvestres (Dale *et al.*, 2002). La tecnología de genes, que permite transferir o modificar genes de interés, representa un apoyo muy valioso para el mejoramiento de cultivos con el uso de plantas genéticamente modificadas (plantas GM). El desarrollo de las técnicas de manipulación genética permite la introducción de genes de especies no relacionadas filogenéticamente, es decir, permite superar las distancias entre los acervos genéticos, manifestadas en barreras biológicas de reproducción sexual, las cuales impiden en condiciones naturales el intercambio de genes de interés agrícola (N.U., 2003).

Transformación genética de plantas

El fitomejoramiento convencional, que entre otros métodos utiliza hibridización, es lento, y se limita a un número reducido de genomas y a la restricción de las barreras naturales de cruzamiento entre especies. Los avances en biotecnología vegetal han permitido sobrepasar estas barreras y hacen posible transferir genes específicos a las plantas. La posibilidad de introducción e integración estable de genes foráneos en el genoma vegetal es una herramienta muy útil en el fitomejoramiento (Birch, 1997). La transformación genética de plantas no reemplaza al fitomejoramiento convencional. Se trata simplemente de una herramienta adicional que puede facilitar y contribuir al mejoramiento de cultivos (N.U., 2003). Una vez se obtiene una planta transgénica en el laboratorio, se requieren varios años de mejoramiento, con el fin de, por un lado asegurar que la nueva planta presente realmente los caracteres deseados y, en forma complementaria, multiplicar las semillas o propágulos para su distribución comercial.

La tecnología de genes presenta varias ventajas sobre los sistemas convencionales de fitomejoramiento. La principal es que se trata de una metodología específica, dado que se están transfiriendo o modificando en una planta, de genoma conocido, solamente unos pocos genes. Adicionalmente, es una técnica más rápida que el mejoramiento convencional (Vasil, 1999). A diferencia de los sistemas de selección y cruzamiento, la transformación genética vegetal permite al mejorador introducir cualquier gen de cualquier organismo en un cultivo (ABSP, 2004). En la práctica, los investigadores obtienen un gran número de líneas transformadas para un gen específico, y efectúan análisis convencionales para asegurar que la nueva línea presente exactamente las mismas características de la línea parental a excepción de la nueva característica introducida. La tecnología de genes no elimina el mejoramiento convencional, sino que lo complementa como cualquier otro método de laboratorio.

Un aspecto importante por considerar es el de que muchas de las características agronómicas de un cultivo se obtienen como resultado de la acción de varios genes, es decir son características poligénicas (Vasil, 1999). Muchos de los caracteres que los fitomejoradores desean incorporar a un cultivo se encuentran controlados de forma muy compleja, definida por varios genes en forma de caracteres cuantitativos, que se expresan en distribuciones continuas en poblaciones de progenie. Estas distribuciones se pueden determinar por herencia debida a múltiples genes o por el ambiente (Chrispeels & Sadava, 2003). Mediante la tecnología de genes solamente se pueden introducir o modificar uno o unos pocos genes en la planta. Para desarrollar con éxito plantas transgénicas se requiere que el carácter deseado sea producto de la expresión de uno o de muy pocos genes, y tener disponibilidad de ese gen específico, para transferirlo.

Las aplicaciones de la tecnología de genes a la transformación genética de plantas dependen esencialmente de técnicas de cultivo de tejidos, de biología molecular y también involucran técnicas microbiológicas (Vasil, 1999). En las últimas décadas, los genetistas moleculares han realizado enormes avances que han permitido el desarrollo de nuevos campos de la ciencia, principalmente en los aspectos referentes a tecnología de genes y biotecnología vegetal. Los avances en la transformación genética dependen de las nuevas tecnologías que permiten a los investigadores aislar, identificar y clonar los genes. La tecnología del DNA recombinante (rDNA), o tecnología de genes, se desarrolló principalmente en la década de 1980, pero tuvo su origen en el conocimiento de los plásmidos y de las enzimas de restricción de las

bacterias, ocurrido en la década de 1970 (Chrispeels & Sadava, 2003). Las enzimas de restricción y los plásmidos bacterianos son, actualmente, algunas de las herramientas que facilitan la manipulación de los genes en el laboratorio. Dado que el DNA de todos los organismos presenta la misma estructura, se puede fragmentar en segmentos, y los segmentos pueden ser unidos de nuevo en múltiples combinaciones y, en forma complementaria, utilizar la capacidad que tienen algunos plásmidos bacterianos de poder ser transferidos de uno a otro organismo.

El procedimiento corriente utilizado para la transformación genética de plantas de cultivo incluye varias etapas. Generalmente, a partir de la definición de un problema o limitante de producción, y el aislamiento y disponibilidad de un gen de interés a partir de cualquier organismo (que permita enfrentar el problema), se realiza la transferencia y la integración estable de ese gen al genoma de las células vegetales mediante la preparación de un vector y un sistema de transferencia adecuado. Para la transferencia exitosa de genes, uno de los factores más importantes es el de tener disponible un gran número de células competentes, tanto para la transferencia de genes, como con capacidad de regeneración adecuada en sistemas de cultivo de tejidos (Birch, 1997). En el proceso, se seleccionan las células transformadas y se obtiene regeneración de plantas completas en las cuales se evalúa tanto la presencia del transgen, como el fenotipo deseado en el momento requerido. El desarrollo de brotes y su arraigo en un medio que contenga el agente selectivo generalmente es indicativo de transformación exitosa. El transgen debe transferirse a la descendencia en forma mendeliana.

Se han utilizado varias estrategias para la obtención de plantas transgénicas, que incluyen métodos biológicos como la utilización de la bacteria *Agrobacterium*, o métodos físicos como biolística (bombardeo de partículas), electroporación, abrasión con fibras, tratamiento con polietilenglicol (PEG), utilización de láser y microinyección. Entre los métodos más utilizados y efectivos se encuentra la transformación por medio de *Agrobacterium* (utilizando *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*). *Agrobacterium*, bacteria natural del suelo, es considerada como un ingeniero genético natural, que utiliza un complejo y muy evolucionado sistema de transferencia e integración de genes, aún no dilucidado totalmente. Parte del mecanismo de transferencia e integración del DNA foráneo a la planta se efectúa mediante un complejo de proteína y DNA de cadena sencilla, que se introduce en un número reducido de copias por célula vegetal (Birch, 1997). Probablemente, la mayor ventaja de la transformación por medio de *Agrobacterium* es que ofrece el poten-

cial de generar células transgénicas a altas frecuencias relativas sin que se presente una reducción significativa en la capacidad de regeneración (Zupan & Zambryski, 1997).

En condiciones naturales, *Agrobacterium*, es patógena para algunas especies de plantas, causándoles inducción de tumores. El estudio de este fenómeno permitió el descubrimiento de la transferencia de genes bacterianos en plantas. Cuando la bacteria infecta el tejido vegetal, le transfiere parte del genoma de un plásmido que posee. Los genes transferidos ocasionan una proliferación de células no diferenciadas que constituyen el tumor o agalla de corona. De unas 200 kilobases, el plásmido llamado Ti (inductor del tumor) posee una porción denominada de transferencia (T-DNA) que es el segmento de ácido nucleico que se transfiere a la célula vegetal en donde puede integrarse de manera estable en el genoma. Aunque de origen bacteriano, los plásmidos pueden transferir secuencias regulatorias eucarióticas que se transcriben activamente en plantas (Birch, 1997, Chrispeels & Sadava, 2003).

DNA de transferencia (T-DNA)

Los estudios en *Agrobacterium* permitieron encontrar esta transferencia natural de genes entre especies diferentes, lo que facilitó el desarrollo de la ingeniería genética vegetal. El DNA que se transfiere a la célula (T-DNA) es una pequeña sección del plásmido Ti de unas 23 kilobases de tamaño, en donde pueden insertarse secuencias foráneas para la transformación genética. Al eliminar del T-DNA del plásmido Ti los genes asociados con la patogenicidad, y reemplazarlos, utilizando técnicas de rDNA, por genes de características deseadas, se encontró que se obtenían células vegetales portadoras de los genes deseados para el mejoramiento. Para la transferencia exitosa de genes a células vegetales por parte de cepas de *Agrobacterium*, son necesarios tres componentes. Se requiere el conjunto de genes de virulencia (*vir*) localizados en el plásmido Ti los cuales son activados por factores de la planta, el DNA que se transfiere (T-DNA) en sí mismo, y una serie de genes del cromosoma bacteriano (*chv*) necesarios para la expresión de la virulencia (Zupan & Zambryski, 1997).

Los bordes del T-DNA se utilizan en forma diferencial, dado que la transferencia es polar. El contexto de los bordes de DNA influye considerablemente en su actividad, el borde derecho es decisivo, puesto que la transferencia del T-DNA se inicia desde este extremo. Adyacente al segmento promotor líder se localiza una región sintética (poliligador o polylinker) con sitios únicos de restricción para la inserción de las secuencias codificantes derivadas

de genes procarióticos o eucarióticos, incluidas secuencias genómicas con intrones o cDNA (Zupan & Zambryski, 1997).

Para la expresión en células vegetales, los genes foráneos deben presentar un promotor apropiado; secuencias adecuadas de iniciación y terminación de la transcripción (5' y 3'); y estabilidad y traducción de su RNA mensajero. El enfoque convencional para obtener un buen nivel de expresión de un gen foráneo requiere la transformación de la planta con el gen (o genes) de interés ligado con un promotor adecuado (Birch, 1997). Se ha observado que los elementos reguladores de ciertos genes de *Agrobacterium* pueden ser activos al transferirse, por lo cual se han utilizado exitosamente para la expresión directa en células vegetales. Algunas de las secuencias reguladoras bacterianas que funcionan adecuadamente y han sido utilizadas incluyen los promotores de la nopalina sintetasa (*nos*), de la octopina sintetasa (*ocs*) y de la manopina sintetasa (*man*). Adicionalmente, los virus vegetales, los cuales dependen de factores de transcripción y traducción, también han sido utilizados como fuente de secuencias reguladoras en plantas. La secuencia 35S del Virus del mosaico de la coliflor (promotor CaMV 35S) ha sido uno de los promotores vegetales más caracterizados y efectivos. Es el promotor no-específico más conocido y ampliamente utilizado, tanto para especies de dicotiledóneas, como de monocotiledóneas, dado que permite mayores niveles de expresión (30-100 veces) que los de otros promotores (AGBIOS, 2002).

En principio, la clonación en vectores plasmídicos es relativamente simple. El DNA del plásmido se escinde con una enzima de restricción y se une *in vitro* con la secuencia foránea. Los plásmidos recombinantes resultantes se utilizan para la transformación de bacterias. Una vez el DNA foráneo ha sido insertado al vector Ti, la molécula recombinante es transferida a una cepa de *Escherichia coli* para su amplificación y posteriormente a un *Agrobacterium* que contenga un plásmido Ti "asistente" apropiado para el proceso (Sambrook *et al.*, 1989). Los vectores binarios pueden ser transferidos de *E. coli* a *Agrobacterium* por transformación directa o por conjugación. Uno de los sistemas más eficientes para la transformación del *Agrobacterium* es la transformación tripartita, en la cual se utilizan dos cepas de *E. coli*, y la de *Agrobacterium* que se va a transformar. Puesto que el vector (*Agrobacterium*) no posee las funciones de movilización necesarias para la transferencia durante la conjugación, se adiciona una cepa de *E. coli* de apoyo, la cual suministra esta función. La ventaja de la transformación tripartita es que permite una frecuencia de transformación

bacteriana más alta, comparada con la transformación directa (Zupan & Zambryski, 1997).

Marcadores de selección

En general, sin importar el sistema que se utilice para la transformación vegetal, la eficiencia del proceso es baja; solamente unas pocas células son transformadas y la mayoría permanece sin transformarse. Con el fin de seleccionar las células transformadas en etapas tempranas del proceso se utilizan marcadores de selección, que buscan eliminar las células no transformadas y dejan solamente las transformadas, utilizando un gen adicional al de interés, denominado gen de marcador de selección (ABSP, 2004). Los marcadores de selección más utilizados en la década de 1990, fueron algunos genes de resistencia a antibióticos o a algunos herbicidas, capaces de inactivar o de bloquear la acción del producto sobre la célula portadora del gen de resistencia.

Entre los genes que confieren resistencia a antibióticos, uno de los más utilizados para seleccionar las células vegetales y las plantas que han integrado el transgen, ha sido el gen de resistencia a kanamicina. El posible uso de plantas con genes de resistencia a antibióticos en la alimentación, ha planteado la inquietud de que estos genes puedan ser transferidos a las poblaciones de bacterias que conviven en el sistema digestivo humano. La probabilidad de que esto ocurra es infinitamente pequeña puesto que se requeriría que se verifiquen en el estómago e intestino sucesos altamente improbables, para que el gen de resistencia no se degrade junto con el resto del alimento consumido y, para que se incorpore en una bacteria que lo pueda expresar correctamente. Adicionalmente, conviene recordar que los genes de resistencia a antibióticos están ampliamente distribuidos en la naturaleza. Por ejemplo, se ha calculado que un individuo sano en un ambiente sano puede ingerir diariamente 1.200.000 bacterias resistentes a antibióticos. Por ello, sería mucho más probable que los genes de resistencia de estas bacterias, ingeridas diariamente, pasaran a las bacterias del sistema digestivo o a otras bacterias del medio ambiente, en lugar de que lo hagan los genes provenientes de la planta transgénica (Bryant, 2001). Aunque, como se ha indicado, no existe ningún motivo fundamentado para sospechar que el uso de genes de resistencia a antibióticos en las plantas transgénicas sea un riesgo para la salud, en la actualidad existen múltiples métodos de selección alternativos que están relegando el uso de los genes de resistencia a antibióticos.

Dada la preocupación por el uso de marcadores de selección cuya utilización pudiera presentar impactos en otros organismos, y teniendo en cuenta que entre los marcadores de selección más comúnmente utilizados se encuentran los de resistencia a antibióticos y herbicidas, los investigadores han tratado de buscar alternativas para el uso de marcadores ambientalmente más amigables (Daniell, 1999). Entre estos genes se encuentra el responsable de la producción de la proteína verde fluorescente (GFP) proveniente de una medusa, el cual permite seleccionar las células transformadas en cultivo *in vitro*, y no involucra el uso de antibióticos, de herbicidas, ni de genes de resistencia a los mismos (Daniell *et al.*, 2002). Entre los genes de selección positiva que se están utilizando, se incluyen el que permite la utilización de sustratos específicos con el uso de genes como β -galactosidasa (gen *lacZ*), el gen de la β -glucuronidasa (*gus*), el de la luciferasa, y el gen de la enzima fosfomansoisomerasa (*manA*) (AGBIOS, 2002). Bajo este mismo contexto, se adelantan estudios relativos a la remoción de marcadores de selección por métodos de biología molecular, y a la utilización de estrategias para el uso de herencia materna citoplasmática —exclusivamente—, entre los que se encuentra la transferencia de genes vía cloroplastos (Daniell *et al.*, 2002).

Regeneración de plantas

Otra de las etapas fundamentales en la obtención de plantas transgénicas es el desarrollo de técnicas de regeneración. La capacidad de regenerar una planta completa a partir de una célula vegetal (totipotencia) es uno de los hechos que facilitó los avances en transformación genética. La capacidad de regeneración varía, no solamente entre células y tejidos sino que difiere también entre especies, cultivariedades y genotipos, y responde a estados de desarrollo y a condiciones fisiológicas y ambientales (Birch, 1997). Las células que se van a transformar deben ser competentes tanto para transformación, como para regeneración de plantas completas. Para la regeneración se busca la inducción de mecanismos morfogenéticos y se puede lograr a través de organogénesis, es decir mediante la obtención de brotes los cuales son enraizados, o por embriogénesis somática. Los análisis moleculares de presencia del transgen y su(s) producto(s) pueden iniciarse desde los cultivos "*in vitro*". Una vez regeneradas las plantas completas se complementa la evaluación de presencia del transgen y de fenotipo, es decir el comportamiento del transgen en el nuevo individuo.

Transformación de plantas para protección contra virus

La transformación de plantas para resistencia a virus se basa en el concepto de protección o resistencia derivada del patógeno (PDR) propuesto por Sanford y Johnston, cuyos orígenes se remontan a 1929 cuando McKinney demostró que podía proteger de infección por una cepa virulenta de virus del mosaico del tabaco (TMV) a plantas de tabaco previamente inoculadas con una cepa avirulenta del mismo virus, lo que se denominó protección cruzada (Sanford & Johnston, 1985).

Los complejos procesos involucrados en este sistema de protección cruzada no han sido completamente dilucidados, se ha demostrado que son varios los mecanismos que actúan, y ningún modelo simple lo explica por completo, por lo cual han sido motivo de controversia. El concepto de resistencia derivada del patógeno propone que la resistencia a un patógeno o parásito particular puede ser obtenida mediante la introducción de un gen del genoma del patógeno a su huésped. Se fundamenta en el hecho de que en cualquier interacción huésped-patógeno se encuentran presentes ciertas funciones celulares codificadas por el patógeno, las cuales son esenciales para el patógeno, pero no para el huésped. Si se interrumpe alguna de estas funciones, el proceso de infección se puede impedir (Sanford & Johnston, 1985). Un requisito para el uso de la protección mediada por el patógeno es que ninguno de los mecanismos utilizados puede interferir con funciones esenciales del huésped; sus efectos deben ser mínimos o nulos en la planta huésped. La selección del gen adecuado del patógeno es la clave para este tipo de resistencia. Una ventaja del trabajar en este campo es que los genomas de los patógenos, particularmente los de los virus, son relativamente pequeños, lo que facilita su aislamiento e identificación (Hodson, 1999). La transformación de plantas con secuencias de genomas virales puede producir plantas protegidas contra el virus del cual se derivó esa secuencia. La naturaleza de la resistencia es variable y puede ser mediada por proteínas o por RNA (van de Boogaart *et al.*, 1998).

Los virus difieren considerablemente en su composición genética y en su morfología; sin embargo presentan mecanismos generales de expresión y control, y presentan etapas comunes en sus ciclos de vida. Cada etapa del ciclo de vida del virus puede, potencialmente ser alterada. El objetivo de la transformación genética para protección a virus, con o sin expresión de una proteína codificada por la secuencia dada, es interferir con algún aspecto de la multiplicación del virus y, de esta manera conferir resistencia funcional (Waterhouse *et al.*, 1998).

Se han utilizado diferentes secuencias virales para transformación de plantas con protección a virus. Entre las más comúnmente empleadas se encuentran el gen de la cubierta proteica (CP) y secuencias de replicasas (NIB). Los mecanismos de la protección no se conocen completamente. Sin embargo, es posible que cualquier secuencia viral tenga la capacidad de inducir resistencia a virus, mediante diferentes mecanismos, los cuales incluyen la expresión de la proteína o algún tipo de silenciamiento post-transcripcional de genes (van de Boogaart *et al.*, 1998).

Estado actual en el mundo de los cultivos transgénicos

Actualmente existe la posibilidad de que los cultivos transgénicos faciliten una nueva dimensión con respecto de los sistemas de control de plagas, enfermedades y malezas. La “primera generación” de cultivos transgénicos se dirigió principalmente a la obtención de plantas con características agronómicas que les confirieran resistencia o tolerancia a algunos de los factores limitantes de producción tales como plagas y enfermedades, o que facilitaran el control de malezas. Los desarrollos actuales buscan adicionalmente, mejora en la calidad nutricional de los productos o en calidad industrial y tolerancia a factores abióticos tales como salinidad, sequía o heladas. Es decir, la transformación genética ha pasado de la solución de problemas de producción hacia la calidad y manejo de los productos, como respuesta a requerimientos de fitomejoramiento cuyo abordaje, por sistemas convencionales, ha sido difícil (Kirby, 1999). Se trata de utilizar la posibilidad de introducir o modificar genes o secuencias útiles que no se encuentran disponibles en los cultivos o variedades comerciales o en sus parientes silvestres.

Los avances y desarrollos en manipulación genética de plantas han sido muy dinámicos en los últimos años, así como la utilización de los cultivos transgénicos. Es así, como de 1.7 millones de hectáreas plantadas en cultivos comerciales transgénicos en 1996, se pasó a 67.7 millones de hectáreas en el mundo en el año 2003. Hubo un incremento del 15% de la superficie sembrada con cultivos GM de 2002 a 2003. Estas 67.7 millones de hectáreas, fueron cultivadas por siete millones de agricultores en 18 países (11 países en desarrollo y 7 industrializados). Alrededor de un tercio (30%) del área cultivada con cultivos transgénicos –equivalente a más de 20 millones de hectáreas–, se encuentra en países en desarrollo, en los cuales el incremento de superficie sembrada es mayor que en los países desarrollados. En 2003, seis países cultivaban el 99% del área global de cultivos transgénicos, (Estados

Unidos el 63%; Argentina el 21%; Canadá el 6%; Brasil el 4%; China el 4%; y Sudáfrica el 1%). (James, 2003).

En relación con los países en desarrollo, China y Sudáfrica tuvieron un incremento del 33% en cultivos transgénicos. China presentó en 2003 el 58% de sus cultivos de algodón con algodón transgénico (2.8 millones de hectáreas) y Sudáfrica incrementó sus cultivos GM de maíz, soya y algodón, especialmente en maíz, en el cual se pasó de 6.000 hectáreas en 2002 a 84.0000 hectáreas en 2003. Argentina continúa aumentando sus cultivos GM; la adopción de soya GM se encuentra cercana al 100% del cultivo, y se presentan algunos incrementos en maíz GM. India ha incrementado el cultivo de algodón transgénico en cerca de un 100%. Entre los países que han aprobado la introducción comercial de cultivos GM se encuentran México, Uruguay, Rumania, Bulgaria, Colombia y Honduras con porcentajes relativamente bajos en relación con la cobertura mundial (James, 2003). Brasil, Indonesia y Filipinas también han iniciado siembras comerciales con cultivos GM.

El principal cultivo GM a nivel comercial es la soya (61% del área global) con 41.4 millones de hectáreas; seguida por el maíz (23%) con 15.5 millones de hectáreas; el algodón (11%) con 7.2 millones de hectáreas; y la canola (5%) con 3.6 millones de hectáreas. Durante el período evaluado 1996-2003, el rasgo dominante en los cultivos GM comercializados ha sido en forma consistente la tolerancia a herbicidas, con la soya como cultivo dominante, y en segundo lugar, la característica de resistencia a insectos. Los cultivos GM que presentan en forma conjunta genes con tolerancia a insectos y a herbicidas (“stacked genes”—genes combinados—), han tenido buena aceptación, lo cual se ratifica por el incremento en su utilización (5.8 millones de hectáreas), que cubre el 8% de la superficie total de cultivos transgénicos (James, 2003).

Beneficios de los cultivos transgénicos

La utilización de cultivos transgénicos durante el tiempo que llevan de comercialización (1994-2003), ha respondido a las expectativas de millones de grandes y pequeños agricultores, tanto en países desarrollados como en países en desarrollo, presentando ventajas económicas, ambientales y sociales a los agricultores y a su entorno (James, 2003). Después de una década de comercialización de los cultivos de transgénicos, científicamente se han comprobado beneficios ambientales como resultado de su utilización. Entre estos se encuentran, dependiendo del cultivo GM y de la región en donde se utilice, la disminución de productos químicos por resistencia o

tolerancia a plagas y enfermedades; en muchos casos el aumento en la diversidad de fauna; un incremento en los rendimientos y calidad como resultado indirecto de la disminución de plagas y enfermedades; conservación y mejor uso del suelo; mejor utilización de los insumos para una agricultura sostenible y reducción en la presión sobre ecosistemas naturales, lo cual favorece la conservación de la biodiversidad.

El gran reto está en el manejo y utilización de los cultivos transgénicos de manera tal, que sean favorables ambientalmente, y faciliten la conservación y el uso sostenible de la biodiversidad. Es necesario combinar y equilibrar el uso de cultivos GM con prácticas agronómicas que favorezcan la diversidad de cultivos, promuevan la rotación de los mismos, favorezcan la fertilidad del suelo y la biodiversidad silvestre de los ecosistemas naturales, de forma tal, que sean mínimos los impactos negativos de la agricultura en el ambiente. Bajo esta situación, las regulaciones para cultivos GM buscarían fundamentalmente aumentar su productividad, y así reducir el alto costo de impactos adversos sobre la biodiversidad y los ecosistemas que la agricultura convencional ha producido durante siglos (Dale *et al.*, 2002). Muchos de los impactos posibles y de los temores relacionados con el uso de cultivos transgénicos no son exclusivos de los cultivos modificados genéticamente, pues son similares a los presentados por cultivos convencionales.

Los avances en transgénesis han permitido la obtención de cultivos resistentes a insectos (principalmente plantas que portan genes de *Bacillus thuringiensis* Bt, o el uso de genes naturales de resistencia provenientes de otras especies), a virus (mediante la introducción de las secuencias de la cubierta proteica, secuencias anti-sentido y otras técnicas) y a hongos con diversos genes. En relación con el control de insectos, el uso extendido y frecuente de productos químicos para controlar plagas primarias, no solo contamina el ambiente, sino que afecta la presencia de otros organismos que sirven como control biológico natural y que previenen el surgimiento de plagas secundarias. Con el uso de plantas genéticamente modificadas para resistencia a insectos, se disminuye o elimina la necesidad de productos químicos de amplio espectro, y los sistemas naturales de control biológico tienen mayor posibilidad de suprimir poblaciones de plagas secundarias. De esta manera, se mantiene la diversidad y abundancia de presas para aves, roedores y anfibios (Dale *et al.*, 2002).

Algunas de las plantas transgénicas para resistencia a insectos (Bt) pueden presentar una ventaja ambiental so-

bre los productos químicos que se emplean corrientemente, porque no se esparcen indiscriminadamente, y así, no afectan a los insectos benéficos (biocontroladores), ni en general, a los que se encuentran en el agroecosistema (Kirby, 1999). Hay datos que muestran una reducción en el uso de insecticidas, hasta de más del 50%, para cultivos con genes de *Bacillus thuringiensis* (plantas Bt), los cuales confieren resistencia o tolerancia a algunos insectos (Nill, 2002; Bryant, 2001). En Australia, alrededor del 30% del algodón cultivado es GM (Bt), y para él se ha encontrado una reducción en el uso de insecticidas de cerca del 75% (Wright, 2003). Los rendimientos promedio en cultivos de algodón Bt en Estados Unidos se han incrementado en un 7% y en algunos casos, a estos cultivos no se está aplicando insecticida químico alguno. Para el caso de maíz Bt, los rendimientos han aumentado aproximadamente en un 10% y los agricultores informan que no aplican ningún tipo de insecticida (Nill, 2002). Adicionalmente, la reducción en el uso de insecticidas que se ha obtenido con el uso de los cultivos Bt con resistencia a determinados insectos, comparada con cultivos convencionales no transformados, en los cuales se utilizan insecticidas de amplio espectro, ha mostrado un incremento de especies de insectos en los cultivos GM, con un consecuente incremento en la población de fauna relacionada con estos, como es el caso de muchas especies de aves y pequeños mamíferos (Wright, 2003).

Por su parte, la utilización de plantas GM para resistencia a herbicidas ha mostrado una reducción en el uso de los mismos, principalmente en el número de aplicaciones por cosecha, aspecto de gran impacto tanto ecológico como económico. Evaluaciones de más de cinco años en remolacha azucarera tolerante a herbicida, mostraron que estos cultivos permiten proliferación de insectos y arañas en los alrededores con el consecuente incremento de la población de aves. Adicionalmente se observó el doble de malezas en las parcelas MG, comparadas con las convencionales, lo cual permitía mayor abundancia de fauna debido a una reducción en el uso de herbicidas (Arthur, 2003). Resultados análogos fueron presentados por Green (2002) quien encontró mayor abundancia de malezas, semillas e insectos, alimento fundamental para las aves silvestres en remolacha azucarera MG.

En el caso de cultivos con resistencia o tolerancia a virus, también se encuentra una reducción en el uso de plaguicidas químicos, dado que no se requiere de la aplicación de insecticidas para el control de los insectos vectores del virus. Al incrementar la población de insectos vectores, aumentan las poblaciones de sus predadores, y como consecuencia, la presencia de organismos benéfi-

cos de control biológico en los agroecosistemas (Dale *et al.*, 2002).

II Experiencias en Colombia: transformación genética de *Passiflora edulis* para resistencia a Potyvirus

El trabajo de transformación de *P. edulis* para resistencia a virus fue motivado por un estudio que se realizó en diferentes zonas de Colombia para determinar la presencia e incidencia de virus en especies de este género. Entre los factores que limitan la producción de *Passiflora* se encuentran plagas y enfermedades, principalmente ocasionadas por virus y hongos. Se ha encontrado un incremento dramático en la incidencia de virus, particularmente del género *Potyvirus*, de la familia Potyviridae. El estudio de *Potyvirus* en muestras recolectadas en cultivos comerciales de Colombia, permitió caracterizar una cepa del *Virus del Mosaico de la Soya* (SMV), la cual mostró un 97.3% de homología con la cepa original del SMV. Este virus apareció ampliamente distribuido en cultivos de maracuyá y granadilla (incidencia mayor del 95% en maracuyá), en los cuales ocasiona daños severos (Benschler *et al.*, 1996, Hodson, 1999, Varón *et al.*, 1992).

El genoma típico del *potyvirus* consiste en una cadena sencilla de RNA lineal positivo (ss + RNA) de alrededor de 10.000 nucleótidos (10 kb) (Benschler *et al.*, 1996). En contraste con los hallazgos en otros virus, en potyvirus se ha encontrado que, en la resistencia mediada por la cubierta proteica (CP), no se requiere una correlación entre los niveles de CP expresados y los niveles de protección (van de Boogaart *et al.*, 1998).

Sistemas de regeneración de plantas y sensibilidad al marcador de selección

Como se mencionó, uno de los componentes fundamentales para la transformación genética de plantas de cultivo es la disponibilidad de un sistema eficiente de regeneración de plantas completas, así como la evaluación de marcadores de selección que permitan identificar en etapas tempranas los posibles transformantes (transformantes putativos). Debido a la escasa literatura encontrada para *Passiflora spp.*, y a la carencia de metodología disponible para un sistema eficiente de regeneración/selección, este fue uno de los componentes que se desarrolló inicialmente para el trabajo de transformación genética de *P. edulis*.

Para la regeneración de plantas, se evaluaron diversos tipos de explantes (segmentos de tejido vegetal), en diferentes estados de desarrollo, en varios medios de cultivo,

condiciones de incubación, así como 82 combinaciones de reguladores de crecimiento. Los resultados de experimentos preliminares mostraron una mayor capacidad morfogenética en los explantes provenientes de segmentos de hoja (discos de hoja) de plantas jóvenes de *P. edulis*, lo cual coincide con registros para otras especies (Cancino & Hodson, 1994, Hodson, 1999). Se desarrolló un protocolo para la inducción de brotes a partir de discos de hoja de *P. edulis* provenientes de plantas jóvenes, cultivados en medio de Murashige Skoog (MS) con suplemento de

benziladenina (BA) 4.4-8.9 μM combinada con quinina (Kin) 2.3-4.6 μM . Los explantes se mantuvieron en oscuridad durante las dos primeras semanas. Después de seis a ocho semanas en cultivo *in-vitro* los brotes regenerados se individualizaron y se transfirieron a medio MS sin reguladores de crecimiento, donde se logró enraizamiento. Las plantas enraizadas fueron transferidas a suelo y se procedió al endurecimiento (aclimatización) mediante una reducción gradual de la humedad relativa y un incremento en la intensidad lumínica durante tres a cuatro semanas (Fig. 1)

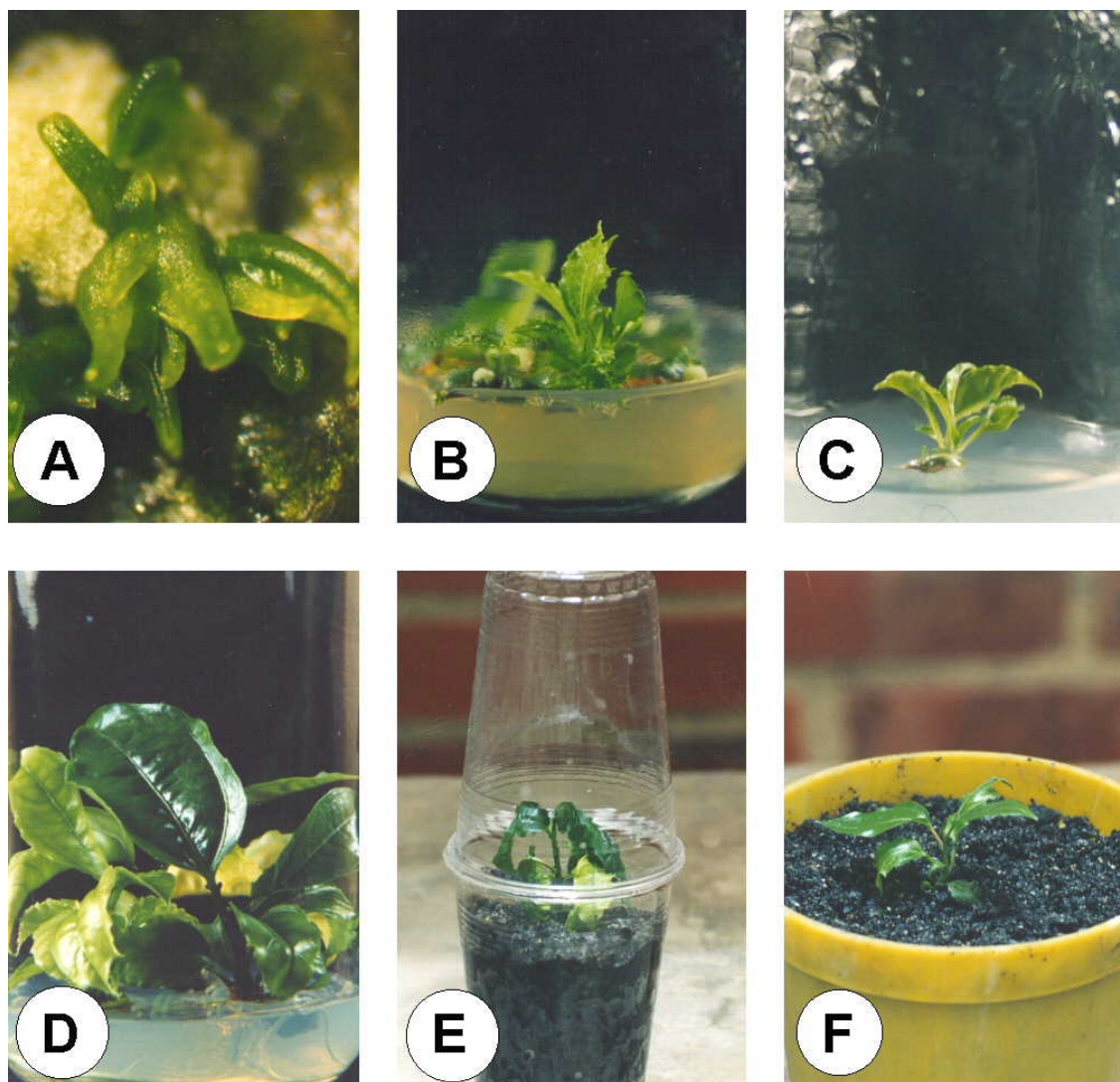


Figura 1. Secuencia de la regeneración de plantas a partir de discos de hoja de *P. edulis* fv. *flavicarpa*. **A:** iniciación de brotes y desarrollo en medio MS suplementado con BA 4.4 μM y Kin 2.3 μM (4 semanas). **B:** formación de brotes múltiples en el mismo medio (6 semanas). **C:** desarrollo de brotes individuales en medio MS sin adición de reguladores de crecimiento (9 semanas). **D:** enraizamiento de brotes en medio MS sin adición de reguladores de crecimiento (12 semanas). **E:** endurecimiento de plantas (14 semanas). **F:** transferencia a suelo en macetas individuales (16 semanas).

Posteriormente se evaluó la sensibilidad de los discos de hoja de *P. edulis* a la kanamicina para ser utilizada como agente de selección, bajo las mismas condiciones obtenidas para regeneración de brotes. Para el cultivo de los explantes se utilizó el mismo medio MS con suplemento de BA 4.4 μM y Kin 2.3 μM . Las concentraciones de kanamicina estudiadas variaron entre 0 y 400 $\mu\text{g ml}^{-1}$. La adición de kanamicina al medio de regeneración redujo la organogénesis y el crecimiento de los brotes. La respuesta obtenida en este experimento llevó a seleccionar la concentración de 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$ como la adecuada para la selección de brotes regenerados putativamente transformados (Fig. 2). Con base en los resultados obtenidos, se definió como medio de regeneración/selección, el medio de Murashige Skoog (MS) con suplemento de benziladenina (BA) 4.4 μM , quineta (Kin) 2.3 μM . y kanamicina 50 $\mu\text{g ml}^{-1}$.

Preparación del plásmido y transformación de *Agrobacterium*

La transferencia de genes con ayuda de *Agrobacterium* utiliza como estrategia general, la clonación de un DNA foráneo seleccionado en un vector basado en un plásmido Ti adecuado para transformación en *E. coli*, seguida por su transferencia a *A. tumefaciens* por conjugación o transformación y subsecuentemente a las células vegetales mediante infección con el *Agrobacterium* transformado (Birch, 1997). Para el presente trabajo se utilizó un sistema de vectores binarios, los cuales presentan un origen de replicación con amplitud de huéspedes; un marcador de selección de resistencia a antibióticos para selección y mantenimiento en *Agrobacterium* y en *E. coli*; bordes del

T-DNA entre los cuales se encuentra un gen de selección para células vegetales; y una región de secuencias (sitio múltiple de clonación) que contiene sitios únicos de restricción (poliligador o polylinker), la cual permite la inserción de los genes de interés (Zupan & Zambryski, 1997).

Se trabajó con dos genes diferentes de cubierta proteica (CP) de Potyvirus: uno del virus del mosaico de la soja (SMV CP), y otro del virus leñoso de *Passiflora* (PWV CP). La construcción del SMV CP fue suministrada por el Dr. R. Beachy (Scripps Institute, La Jolla, California), y la del PWV CP por el Dr. K.H. Gough (CSIRO División de Biomolecular Engineering, Parkville, Victoria, Australia), en ambos casos, con fines exclusivamente de investigación. El gen SMV CP, que se encontraba en el plásmido UC118, fue multiplicado en la cepa *E. coli* DH5a, y purificado por procedimientos corrientes de lisis (Sambrook *et al.*, 1989); el DNA plasmídico fue digerido sucesivamente con *EcoRI* y con *BglII*, el gen fue purificado en agarosa y precipitado con etanol. Para el gen PWV CP, suministrado como un inserto de una secuencia de 1800 pares de bases (bp), dado que no contenía los sitios de restricción requeridos para clonación, fue procesado para la introducción de los sitios de restricción mediante oligonucleótidos específicos para la secuencia del gen CP. El producto se amplificó, se purificó en agarosa y fue precipitado con etanol.

Como plásmido para la transformación se utilizó el pMON10098, facilitado por Monsanto con fines exclusivamente de investigación. Este plásmido contenía entre los bordes del T-DNA los sitios de restricción requeridos, secuencias promotoras del CaMV 35S, secuencias de terminación y de poliadenilación, el gen *nptII* para resistencia a kanamicina y una serie de secuencias reguladoras requeridas para el proceso. Externo a los bordes del T-DNA, para la amplificación y mantenimiento de las bacterias en medio selectivo, el plásmido contiene secuencias para resistencia a espectinomicina/estreptomomicina y secuencias reguladoras para orígenes de replicación. Para la preparación del vector de transformación, DNA plasmídico fue digerido sucesivamente con *EcoRI* y *BglII* y precipitado con etanol (Pappu *et al.*, 1993). El plásmido en forma linear fue mezclado en forma independiente con uno de los genes (SMV CP o PWV CP) y ligado a los sitios de restricción utilizados (Fig. 3)

Los plásmidos individuales que portaban los CP particulares (pMON10098/SMV CP y pMON10098/PWV CP), fueron transferidos separadamente a células competentes de *E. coli* DH5a y cultivados independientemente. La transformación del *Agrobacterium* ABI (GV3101) se

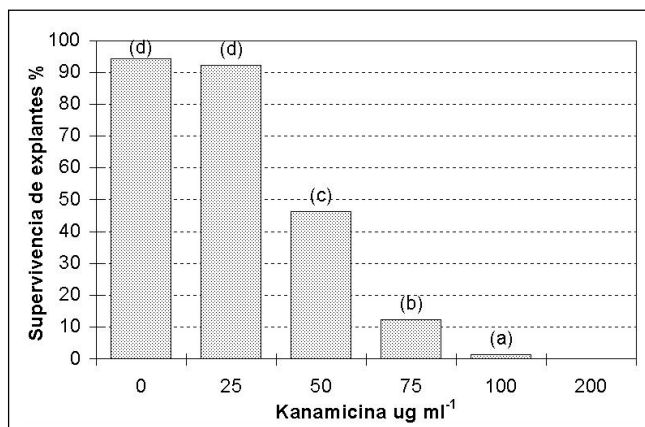


Figura 2. Efecto de la kanamicina en la viabilidad de explantes de hoja de *P. edulis* fv. *flavicarpa* después de seis semanas en cultivo. Diferentes letras indican diferencia significativa a nivel de 5% con el Test de Duncan de rango múltiple.

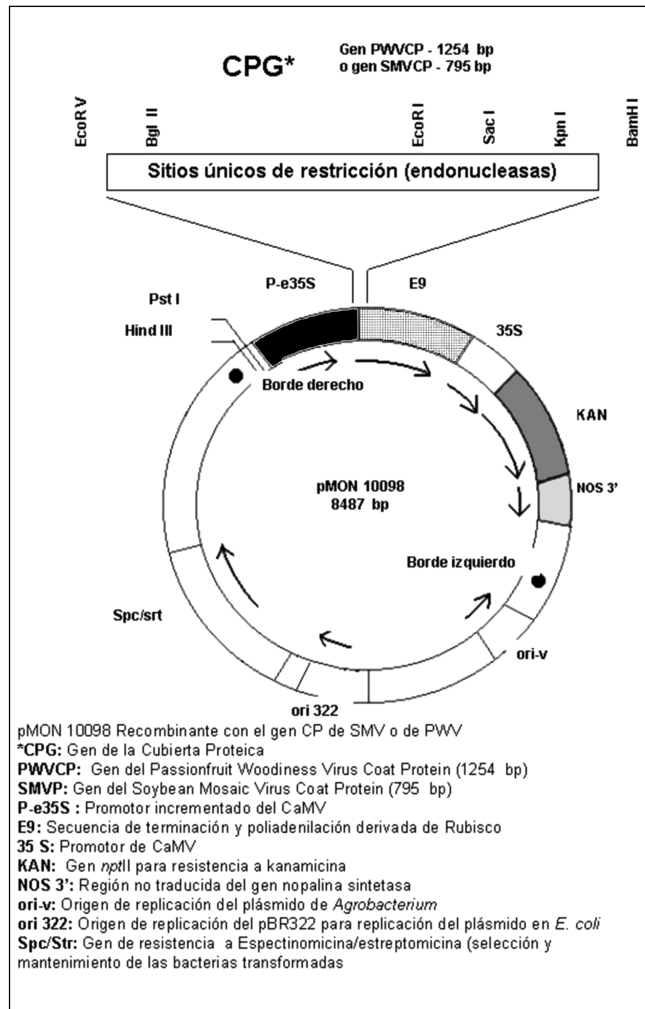


Figura 3. Plásmido MON10098 portando el gen de cubierta proteica de SMV o de PWV.

realizó utilizando el método tripartita, mediante el cultivo de la cepa con las cepas de *E. coli* pRK2013 y la DH5a pMON10098/SMV CP o con la DH5a pMON10098/PWV CP por separado. Con el fin de verificar la presencia de los genes de interés, a saber, el gen CP correspondiente y el gen *nptII*, se extrajo DNA plasmídico tanto de las colonias de *E. coli* DH5a como de *A. tumefaciens* cepa ABI (GV3101) y se analizaron por separado para cada gen por métodos de PCR y electroforesis en gel de agarosa. Los oligonucleótidos utilizados como iniciadores para el PCR producen fragmentos de 542 bp para SMVCP, de 854 bp para PWVCP y de 300 bp para *nptII*. Las electroforesis confirmaron la presencia de los genes deseados y la transformación de las dos cepas de *A. tumefaciens*, una con el gen SMVCP y otra con el gen PWVCP, requeridas para continuar con el trabajo en *P. edulis*.

Transformación de *P. edulis*

La transformación se realizó co-cultivando explantes (discos de hoja) de *P. edulis* fv *flavicarpa* con la bacteria portadora del gen deseado (*A. tumefaciens* ABI (GV3101) SMVCP o *A. tumefaciens* ABI (GV3101)PWVCP) por separado. Se evaluó el efecto de la adición de acetosiringona en la eficiencia de transformación. Los explantes fueron transferidos posteriormente a medio de regeneración/selección adicionado con antibióticos (cefotaxime/carbenicilina) para eliminar la bacteria.

Se obtuvieron brotes capaces de desarrollarse en medio con kanamicina tanto de explantes inoculados con *Agrobacterium*/SMVCP, como con *Agrobacterium*/PWVCP. Se encontró que la adición de acetosiringona estimuló una proliferación excesiva de callos (tejido no diferenciado) lo cual inhibió la producción y desarrollo de brotes. En los tratamientos de control (no inoculados o inoculados con bacteria no transformada) se observó muy baja regeneración en medio con kanamicina y, los escasos brotes obtenidos eran débiles y no se desarrollaron al ser transferidos a medio MS con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina (Fig. 4). Se calcularon las frecuencias de regeneración (definidas como número de brotes regenerados/número total de explantes inoculados) las cuales oscilaron entre el 20% y el 54% en los brotes putativamente transformados. La metodología desarrollada muestra una eficiencia de regeneración adecuada para este tipo de trabajos, de especial importancia para frutales tropicales.

Los brotes de 6-12 mm de altura se individualizaron y transfirieron a medio MS con 50 µg ml⁻¹ de kanamicina y sin reguladores de crecimiento. Los brotes obtenidos, que muestran habilidad para desarrollarse en medio de selección son indicativos de transformación, aunque esta debe

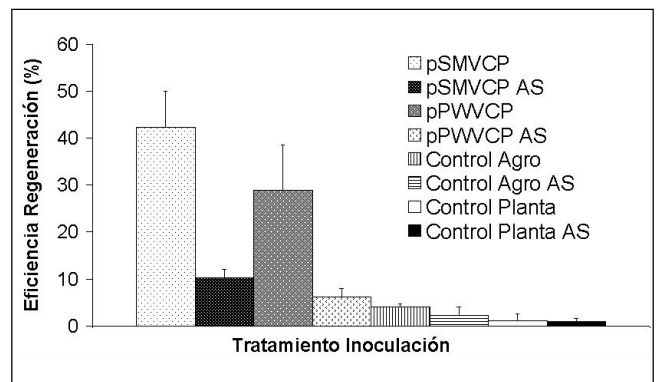


Figura 4. Regeneración de brotes de explantes de *P. edulis* inoculados y no inoculados, después de ocho semanas en medio de regeneración-selección.

verificarse por métodos moleculares que permitan detectar la presencia del gen deseado. Un 75% de los brotes desarrolló raíces tres a cuatro semanas después de la transferencia. No se obtuvo enraizamiento en los brotes provenientes de explantes no inoculados o inoculados con bacteria no transformada. Las plantas enraizadas fueron transferidas a recipientes con suelo para su endurecimiento. La supervivencia del material transplantado fue del 70%. Se obtuvo un total de 92 plantas en suelo, putativamente transgénicas (58 con pSMVCP y 34 con pPWVCP).

El trabajo permitió desarrollar un sistema eficiente y reproducible para seleccionar y regenerar plantas transformadas. Los resultados obtenidos muestran que la kanamicina es un agente de selección adecuado. Se comprobó que la transformación por medio de *Agrobacterium* es un sistema conveniente para *P. edulis*.

Evaluación molecular de las plantas transformadas

En la transformación de plantas, se pretende que el DNA se integre al genoma y se mantenga en forma estable. La evaluación de la transformación incluye la verificación molecular de la integración del DNA foráneo. La identificación de los tejidos transformados puede realizarse de múltiples formas, incluyendo el uso de marcadores de selección. El uso de los marcadores de selección facilita la selección inicial de los tejidos transformados. Sin embargo, es necesario realizar análisis adicionales para confirmar si el gen de interés se encuentra presente. Se cuenta con diversos métodos moleculares para verificar la presencia y la integración de los genes transferidos. La integración real del gen de interés se puede determinar por el método de hibridización de Southern (Sambrook *et al.*, 1989). Por su parte, la reacción en cadena de polimerasa (PCR) es un procedimiento complementario

rápido y específico que permite obtener información inicial sobre un gran número de plantas putativamente transformadas a partir del cual se seleccionan las adecuadas para el análisis Southern. La confirmación final de las plantas transformadas se realiza por identificación de la secuencia insertada en el genoma de la planta receptora (Birch, 1997). Adicionalmente, se estudia la expresión del gen de interés, mediante análisis de las proteínas, producto del gen, mediante técnicas como el Western. Las evaluaciones en invernadero de las plantas transformadas, se realizan para asegurar que el carácter introducido y deseado se manifieste de acuerdo con las necesidades.

Las evaluaciones moleculares de las plantas incluyeron análisis por técnicas de PCR y electroforesis, análisis Southern para la detección del gen y Western para determinar la expresión de la proteína de la cubierta proteica. Se realizaron análisis preliminares (después de 12 semanas en cultivo) a los brotes regenerados en medio de regeneración/selección, mediante PCR y electroforesis, utilizando DNA proveniente de tejido foliar, con el fin de detectar las secuencias específicas, *nptII*, SMVCP y PWVCP. El análisis Western para proteínas se realizó según las técnicas convencionales (Sambrook *et al.*, 1989), utilizando tejido foliar para la extracción de proteínas totales y técnicas de inmunodetección. Para las plantas transferidas a suelo, se realizó el Southern radioactivo, utilizando DNA extraído de tejido foliar, el cual fue digerido con enzimas de restricción (*EcoRI* o *BglII*), separado en agarosa y transferido a membranas. Los fragmentos de DNA utilizados como sondas se marcaron, siguiendo las técnicas convencionales, de forma que se detectaran fragmentos de 542 bp para SMVCP y de 860 bp para PWVCP (Hodson, 1999). La evaluación molecular se complementó con análisis Southern utilizando sondas marcadas con

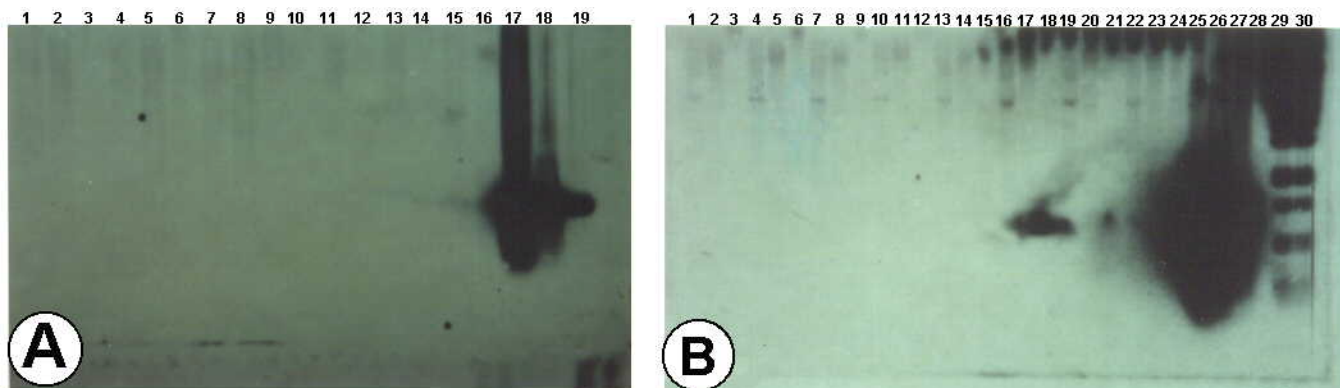


Figura 5. Análisis radioactivo Southern del DNA de plantas regeneradas. **A:** detección del gen SMVCP. Se utilizó como sonda un fragmento marcado de 544 bp del gen CP. Señal de hibridización en las líneas 15 y 16. **B:** detección del gen PWVCP. Se utilizó como sonda un fragmento marcado de 850 bp del gen CP. Señal de hibridización en las líneas 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 20, 22 y 23.

digoxigenina, empleando tanto DNA extraído de tejido foliar, como productos de amplificación de DNA foliar.

Los análisis preliminares de DNA foliar de los brotes *in vitro* mostraron la presencia de las secuencias estudiadas. De 48 brotes analizados, 39 mostraron presencia de *nptII* (300 bp), 30 de PWVCP y 18 de SMVCP. En relación con la evaluación de expresión de la cubierta proteica, los análisis de Western blot no mostraron presencia de cantidades detectables de ninguna de las cubiertas proteicas. Los análisis Southern realizados con el fin de confirmar la presencia de un gen CP integrado en forma estable, mostraron diferentes patrones de integración en las plantas transgénicas, con más de una señal de hibridación por línea (Fig. 5). De 20 plantas analizadas, 11 mostraron presencia de secuencia de algún gen CP, de la siguiente manera: de siete plantas analizadas para SMVCP, una mostró presencia del gen (planta 66, líneas 15 digerida y 16 no digerida); de 16 plantas analizadas para presencia de PWVCP, ocho mostraron presencia del gen (líneas 1, 4, 7, 10, 13, 16, 19, 20, 22 y 23). Dos de las plantas mostraron más de una señal de hibridación, indicativo de diferentes sitios de integración. En los estudios complementarios de Southern con sondas marcadas con digoxigenina, se analizaron 23 plantas para la presencia de *nptII* y del gen CP correspondiente (SMVCP o PWVCP); 18 mostraron presencia de la secuencia de *nptII*, 15 del gen PWVCP y 2 del gen SMVCP (Fig. 6).

Evaluación de protección contra el virus

Una de las caracterizaciones fenotípicas que debe realizarse, adicional a la detección del producto del transgen (expresión de la proteína), es la evaluación del carácter deseado en la planta, en el presente caso, la resistencia o tolerancia de las plantas transformadas al virus (SMV). Para ello se evaluó la susceptibilidad de las plantas transformadas enraizadas mediante monitoreo de las mismas,

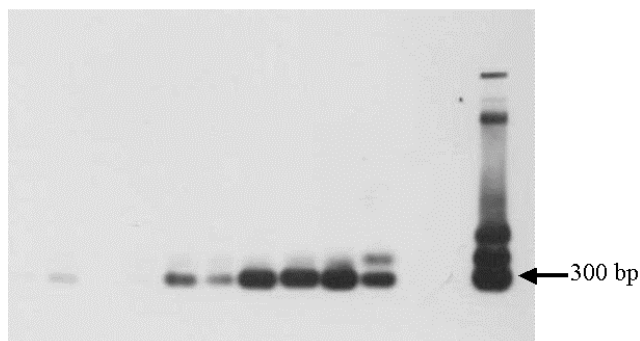


Figura 6. Análisis Southern de DNA total amplificado de plantas regeneradas, hibridizado con sonda *nptII* marcada con digoxigenina.

posterior a la inoculación de una cepa virulenta del virus (SMV P-83) aislada de cultivos comerciales infectados. La infección se realizó mediante inoculación mecánica y, adicionalmente, mediante inoculación con áfidos vectores naturales del virus SMV. Para la inoculación mecánica se evaluaron plantas regeneradas transformadas (con resultados positivos para la evaluación molecular) y controles no transformados, mediante preparación de inóculo macerando tejido foliar de *P. edulis* infectado con el virus y transfiriendo por frotamiento con el extracto a dos hojas jóvenes completamente expandidas de cada una de las plantas por evaluar. Se determinó protección o susceptibilidad por aparición visual de síntomas y adicionalmente, por análisis de la presencia del virus en tejido foliar por técnicas de ELISA a los 30 días de la inoculación mecánica. Los resultados de este ensayo mostraron diferentes niveles de protección de las plantas transformadas contra el SMV, según se determinó con las evaluaciones 30 y 60 días después del inóculo. El nivel de protección varió desde bajo, indicado por la presencia de síntomas o aparición retardada de síntomas, hasta alto con no presencia de síntomas. Todas las plantas control (no transformadas) inoculadas (100%) presentaron síntomas de infección viral y fueron positivas para la prueba de ELISA realizada (Fig. 7). Considerando la diversidad de roles de la CP en diferentes sistemas planta-virus, no es sorprendente que los mecanismos de resistencia sean también diversos. En términos generales se pueden dividir en dos categorías: los mecanismos de resistencia obtenidos por medio de proteína, y los obtenidos por medio de RNA (Baulcombe, 1996).

Para el ensayo de inoculación con áfidos, ninguna de las plantas transformadas (positivas para los análisis moleculares) presentó síntomas de infección viral y todas fueron negativas para el análisis ELISA para presencia de virus, mientras que los controles (no transformados) presentaron síntomas de infección y fueron positivas para las pruebas ELISA. Para esta situación, donde ninguna de las plantas transgénicas que se inoculó con la cepa virulenta de SMV presentó síntomas de infección viral, es probable que el fenotipo resistente se pudo manifestar merced a los bajos niveles de inóculo que transmiten los áfidos, situación que corresponde a la encontrada en condiciones de campo, en la cual los vectores son el factor más importante en la transmisión del virus.

Mecanismos de resistencia derivada del patógeno en plantas transgénicas conteniendo un gen CP

La demostración realizada a mediados de la década de 1980 por parte de Beachy y sus colaboradores, de que la expresión de una proteína de la cubierta proteica de un

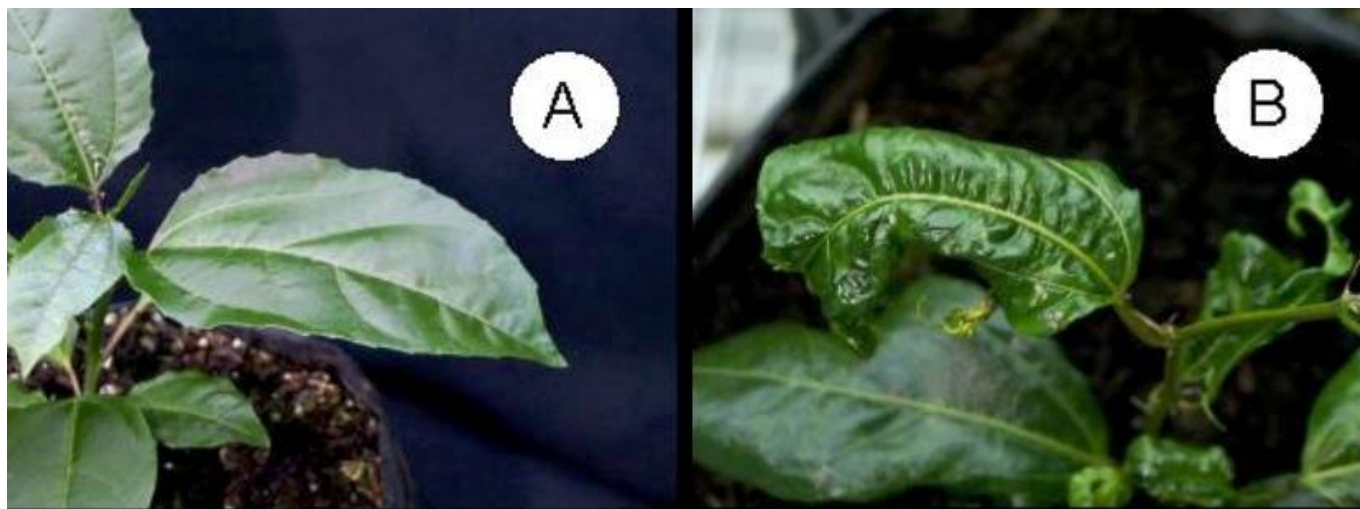


Figura 7. Respuesta de plantas transformadas primarias a la inoculación con la cepa SMV P-83, 30 días después de inoculación. **A:** plantas transformadas mostrando protección, sin síntomas de infección. **B:** plantas no transformadas susceptibles a la infección presentando distorsión foliar y clorosis ligera.

virus en una planta transgénica podía conferir resistencia frente al virus donador, abrió grandes perspectivas como fuente de resistencia de plantas a virus, en situaciones en donde las fuentes de resistencia natural se encontraban muy limitadas (Beachy *et al.*, 1990). Mientras que los primeros registros de plantas transgénicas con genes CP indicaban que el gen CP se expresaba, y que la protección obtenida se relacionaba con el nivel de CP detectado (Beachy, 1997), estudios posteriores en otros casos, no mostraron correlación entre el nivel de proteína del transgen viral expresado y resistencia. En los casos en los que no se presenta relación entre el nivel de proteína CP expresado y la resistencia, se ha demostrado que la protección se presenta a nivel de RNA (Baulcombe, 1996). Este tipo de resistencia, en la cual, aún constructos no traducibles confieren resistencia, con base en la presencia de RNA, se ha denominado resistencia mediante RNA (van de Boogaart *et al.*, 1998).

La presente discusión se enfoca hacia los virus RNA, que representan la gran mayoría de virus vegetales. Como contexto general, debe recordarse que las células vegetales se encuentran sometidas a diversos tipos de estímulos endógenos y ambientales que pueden ocasionar cambios en la estructura o en la expresión de su genoma. Por no poder movilizarse (y escapar a su ambiente), las plantas han desarrollado estrategias de defensa con el fin de limitar los efectos deletéreos de estos estímulos. Uno de estos sistemas es el silenciamiento de genes, el cual probablemente se produce por la activación de mecanismos de defensa, lo que indica que la planta posee sistemas para

controlar la estructura y la función de los genes. En el caso de transgenes o de sus productos, la célula vegetal los percibe como estímulos endógenos que activan sus respuestas de defensa, en forma similar a las condiciones patológicas (Fagard & Baucheret, 2000). El silenciamiento de genes endógenos y de transgenes puede ocurrir a nivel transcripcional (TGS) o a nivel postranscripcional (PTGS) y puede ser inducido por genes endógenos, por transgenes y por virus (Tepfer, 2002). Puede producirse por múltiples mecanismos que involucran interacciones DNA-DNA, DNA-RNA o RNA-RNA.

En los primeros hallazgos sobre resistencia mediante RNA, en plantas que expresaban un RNA satélite viral, se propuso que esta resistencia se debía a competencia para replicación entre RNA no codificante y los RNA genómicos virales. Más recientemente, se han utilizado otros RNA subvirales (incluyendo la región 3' no codificante), y se ha observado que se confiere resistencia a través de competencia con el RNA viral (van de Boogaart *et al.*, 1998). Sin embargo, la forma más importante de resistencia mediante RNA se produce a través de otro mecanismo descrito al observar que la mayor protección se encontraba en plantas que mostraban muy baja o ninguna acumulación del mRNA del transgen. Cuando se observó resistencia en plantas que inicialmente acumularon mRNA del transgen, estas plantas primero se infectaron completamente y luego se observó recuperación seguida por un estado de insensibilidad al virus, en donde el mRNA del transgen desaparecía. Se propuso que la resistencia era conferida por una degradación secuenci-

específica del mRNA del transgen y de su RNA viral correspondiente a través de un mecanismo relacionado con silenciamiento postranscripcional de genes, PTGS (Tepfer, 2002).

La expresión del RNA (sentido o anti-sentido) derivado del virus, parece inducir algún tipo de mecanismo de silenciamiento postranscripcional del virus (PTGS), el cual se tipifica por la alta degradación específica de, tanto el mRNA del transgen, como del RNA objetivo que contiene las mismas secuencias nucleótidas complementarias. Si el transgen contiene secuencias virales, el RNA genómico del virus no puede acumularse en la planta (Baulcombe, 1996). La resistencia mediante RNA se ha caracterizado por un alto nivel de resistencia que no puede ser sobrepasada fácilmente por una dosis alta de inóculo, comparada con la resistencia mediante expresión de la proteína CP (van de Boogaart *et al.*, 1998). Este podría ser el caso del presente trabajo, en el que los análisis de Western blot realizados no permitieron detectar presencia de proteína de la cubierta proteica para ninguno de los dos genes CP utilizados, pero si se observó protección contra dosis elevadas de inóculo de una cepa virulenta de SMV.

Aunque la resistencia que no requiere la expresión de la proteína se ha denominado resistencia mediante RNA, no hay evidencia de que se requiera realmente de transcripción. Es posible que, al menos en teoría, la presencia del DNA del transgen *per se* en una planta, pueda ser responsable de la resistencia. Un mecanismo que se ha sugerido para el PTGS es que el proceso se inicia, se presenta degradación de RNA en el citoplasma y el silenciamiento puede ser transmitido en forma sistémica por una señal secuencia-específica, es decir que es más activa contra la cepa de la cual fue aislado el transgen o frente a cepas estrechamente relacionadas (Baulcombe, 1996).

La resistencia mediante RNA ha mostrado ser efectiva frente a virus con identidad de secuencias del 88% o mayores. La extensión de la protección depende, al menos en parte, a la homología de secuencias entre el gen CP del virus que infecta y el gen CP del transgen (Beachy, 1997). En el caso de *P. edulis* se encontró que plantas transformadas con PWVCP mostraron protección contra la cepa virulenta de SMV, es decir protección heteróloga. Este tipo de protección ya ha sido encontrada en otros casos, y se explica por la alta similaridad del gen CP entre las cepas (Baulcombe, 1996, Beachy, 1997). También es claro que factores ambientales pueden influir en la manifestación y el mantenimiento de la resistencia (van de

Boogaart *et al.*, 1998). Factores tales como el estado fisiológico de la planta, la multiplicación viral y los factores ambientales deben ser analizados más profundamente. En el presente trabajo, en el cual no se obtuvieron niveles detectables de proteína por el análisis Western, pero sí se observó protección de las plantas transgénicas de *P. edulis* después de la inoculación con una cepa virulenta de SMV, la respuesta observada, puede relacionarse con protección mediante RNA porque presenta algunas de las características de este mecanismo. Posterior a la inoculación mecánica se observaron diferentes fenotipos de protección, desde inmunidad a susceptibilidad, incluyendo fenotipos que después de presentar síntomas de infección viral en las hojas infectadas, las plantas se recuperaron y ninguna de las hojas nuevas presentó síntomas de infección. Estos fenotipos pueden relacionarse con silenciamiento de genes o inactivación del transgen. Se ha propuesto que la presencia del virus estimula el PTGS y que puede haber factores adicionales que explican la diferencia de respuestas entre diferentes líneas o eventos de transgénesis (Beachy, 1997). La situación en plantas que expresan un gen de CP puede ser más compleja, dado que un solo transgen puede conferir tanto la resistencia mediante ayuda de la proteína, como la ayudada por RNA (Tepfer, 2002).

La capacidad de producir plantas resistentes a virus es de gran significancia agronómica, ecológica y económica, particularmente para países como Colombia. A pesar de que se han realizado grandes esfuerzos para desarrollar tecnologías para mejoramiento de especies frutales tropicales, son muy pocos los informes sobre transformación genética de frutas tropicales. En muchos casos, poco se conoce de la genética de estas especies y los programas de mejoramiento son difíciles debido a la alta heterogeneidad de los materiales utilizados. Se encuentra un potencial enorme en las tecnologías modernas para el mejoramiento genético de frutales tropicales, como lo demuestra el presente trabajo. Con el fin de obtener desarrollos que tengan impacto real en el bienestar de la sociedad, las actividades deben articularse en programas conjuntos que involucren comunidad científica, productores y usuarios, enmarcados en políticas claras y definidas de desarrollo.

III Bioseguridad

El desarrollo de cualquier actividad humana tiene implicaciones para toda la sociedad. Por esta razón, la aplicación de la tecnología de genes en la obtención de cultivos transgénicos trasciende más allá del desarrollo y aplicación de la misma tecnología. Deben considerarse

cuidadosamente los aspectos técnicos, ecológicos, éticos, sociales, legales, culturales y económicos, enfrentados a una situación de malnutrición de la humanidad, marginalización económica y degradación ambiental. Los proponentes de su utilización ofrecen soluciones a problemas de producción agrícola y de calidad de alimentos, mientras que sus detractores advierten sobre posibles desastres ecológicos y peligros para la salud. La biotecnología moderna es una herramienta poderosa y valiosa que no solamente proporciona nuevas estrategias para enfrentar problemas y limitantes, sino que simultáneamente plantea inquietudes y consideraciones concernientes a un uso adecuado y seguro (Traynor *et al.*, 2002). Por las anteriores razones, la mayor responsabilidad de quienes trabajen en transformación genética es garantizar la seguridad del producto tanto para el usuario, como para el ambiente y para la sociedad.

Es claro que la biotecnología ofrece un poderoso conjunto de herramientas para el mejoramiento y producción de cultivos, y que tiene la posibilidad de procurar beneficios significativos tanto al consumidor como al ambiente; igualmente se considera que la biotecnología puede revolucionar las estrategias necesarias para conservar la biodiversidad (NU, 2003). Sin embargo, debe mantenerse bajo evaluación permanente el posible impacto que su uso pueda tener sobre los sistemas agrícolas productivos, sobre los ecosistemas naturales y sobre la salud, así como considerar las consecuencias, tanto positivas como negativas que sus impactos puedan ocasionar. Las consideraciones que giran alrededor de la aplicación de la tecnología de genes en los cultivos agrícolas involucran varias categorías que pueden ser agrupadas en forma amplia en aspectos de seguridad del alimento, seguridad ambiental, así como implicaciones éticas, culturales y de impacto socio-económico (Traynor *et al.*, 2002).

Debido a estas implicaciones, y a la consideración de que, con el fin de que sean realmente útiles, los productos de la transformación genética deben ser seguros para el usuario y para el ambiente, se han desarrollado estrategias que regulan el uso y aplicación de los organismos modificados genéticamente, con el fin de obtener los máximos beneficios sociales de su utilización. Considerables esfuerzos internacionales, regionales y nacionales buscan desarrollar los mecanismos para, por un lado, garantizar el uso adecuado de los desarrollos biotecnológicos y, por otro, facilitar el acceso a sus beneficios para toda la sociedad a través de regulaciones sobre bioseguridad. En este contexto, la bioseguridad se define como el desarrollo de instrumentos para el estudio y manejo de los posibles efectos adversos del uso de organis-

mos modificados genéticamente –producto de la biotecnología moderna–, con el fin de garantizar la salud, el medio ambiente y la seguridad alimentaria y la prevención a posibles perjuicios resultado de la actividad humana.

Las normas y regulaciones en bioseguridad surgieron como respuesta a inquietudes de la comunidad científica y de la sociedad hacia los impactos causados por la aplicación de desarrollos tecnológicos e industriales. Es así, como por primera vez en la historia de la humanidad, los desarrollos tecnológicos y sus aplicaciones son cuidadosamente estudiados y evaluados, antes de usarse en forma comercial. Los cultivos GM son sometidos a una serie rigurosa y meticulosa de análisis, antes de ser aprobados y entregados al público. Agencias internacionales como la Organización Mundial de la Salud (OMS), la Organización para la Agricultura y la Alimentación (FAO) han participado en el desarrollo de guías para el análisis de los productos, entre los cuales se encuentra el CODEX *alimentarius*. Estas evaluaciones previas, requeridas para su aprobación, incluyen estudios del producto como alimento, sus efectos en salud y evaluaciones de efectos en el ambiente (AGBIOS, 2002). Independiente de la aprobación en un país dado, cualquier país receptor desarrolla sus propias regulaciones y las ajusta a sus necesidades y condiciones.

Como instrumento a nivel mundial en términos de seguridad de las aplicaciones de la biotecnología moderna, se cuenta con el Protocolo de Cartagena de Bioseguridad de la Biotecnología, del cual Colombia es signatario, ratificado por la Ley 740 de 2002. El Protocolo de Cartagena de Bioseguridad se deriva de los compromisos del Convenio sobre Diversidad Biológica (CDB) y se constituye en un instrumento jurídicamente común en los países signatarios que lo ratifican. Su objetivo principal es garantizar un nivel adecuado de protección para la transferencia, uso y aplicación segura de los organismos modificados genéticamente que puedan tener efectos adversos en la conservación y uso sostenible de la biodiversidad, o sobre la salud humana.

En la evaluación de los posibles peligros y riesgos asociados con las nuevas tecnologías, la pregunta adecuada no es cómo reducir los riesgos potenciales a cero, dado que en ninguna actividad humana, por sencilla que sea, se presenta posibilidad de riesgo cero, sino cuáles son realmente los riesgos potenciales relativos de las nuevas tecnologías, comparados con los riesgos potenciales de las tecnologías con las cuales éstas compiten. Adicionalmente debe evaluarse cuáles son los riesgos que conlleva la sobre-regulación, la no implementación de

las nuevas tecnologías y cómo se va a evaluar la relación costo-beneficio.

El vocablo “riesgo” presenta diferentes significados para las personas, dependiendo de sus valores y de sus antecedentes culturales y sociales, así como de las situaciones circunstanciales. En términos generales, se puede asimilar en términos de amenaza o daño. Al considerar la magnitud del daño potencial y su posibilidad de ocurrencia es cuando se calcula realmente el riesgo, es decir que se expresa como una función matemática, no como un temor sin análisis. El efecto negativo o no deseado de un evento se conoce como amenaza. El riesgo por su parte es la expresión de la probabilidad o posible tasa de ocurrencia de esa amenaza (Traynor *et al.*, 2002). La evaluación de riesgo se define frecuentemente como un proceso científico para calcular niveles cuantitativos o cualitativos de riesgo, incluyendo estimativos sobre posibles efectos en salud y otras consecuencias, así como el nivel de incertidumbre en esos cálculos, independiente de factores emocionales que influyen en la percepción de riesgo. Los análisis de riesgo implican varias consideraciones: a) la posibilidad de peligro o amenaza; b) la probabilidad de ocurrencia del mismo; y c) las consecuencias si se presenta. El objetivo de la evaluación de riesgo es producir información neutral, objetiva y transparente como elemento para la toma de decisiones (AGBIOS, 2002). Lo anterior implica que muchos peligros potenciales no representan riesgos reales, y que la existencia de un peligro no implica necesariamente un daño significativo resultado de la actividad, dado que el peligro puede no manifestarse (NRC-CEI, 2002).

En una evaluación de riesgo de un cultivo GM las principales interrogantes que surgen en el proceso de análisis incluyen: ¿Qué se considera seguro? ¿Cuáles amenazas representan realmente peligro para la salud o el ambiente? ¿Cómo pueden reducirse a un mínimo? ¿Cuáles son las alternativas de este producto (tecnología)? ¿Cuál es el beneficio de utilizarlo? ¿La comunidad (sociedad) lo necesita? ¿Cuál es el análisis costo-beneficio? ¿Cuáles son los problemas o limitantes que resuelve este producto? ¿Su utilización representa impactos más benéficos que el sistema convencional? ¿Su uso permite un manejo ambiental más amigable? ¿Cuál sería el costo de no utilizarlo? Por otro lado, en el caso específico de la utilización de cultivos modificados genéticamente, debe recordarse que la mayoría de las preocupaciones generadas por su uso, se refieren a los mismos impactos causados por los cultivos y alimentos convencionales, algunos de los cuales se están tratando de enfrentar precisamente con el uso de las nuevas tecnologías, como es el caso de la necesidad de acceder a genes de interés, de reducir el

uso de agroquímicos y buscar sistemas mas amigables ambientalmente. En este sentido la sustitución de un cultivo tradicional por uno transgénico no añadiría ningún daño adicional al medio ambiente; por el contrario, el impacto ambiental puede reducirse si con el cultivo transgénico se logra un mayor rendimiento agrícola y por lo tanto se necesitará deforestar o limpiar menos terreno para producir lo mismo.

Los sistemas de introducción de variabilidad genética, tanto los convencionales (p.e. hibridación, mutagénesis), como los transgénicos, pueden ocasionar cambios en el genoma vegetal que pueden dar como resultado alteraciones no intencionales en las características de los cultivos. Se considera que los procesos transgénicos no presentan nuevas categorías de riesgo comparados con los procesos convencionales de mejoramiento de cultivos, pero que los caracteres específicos introducidos deben ser evaluados cuidadosamente (NRC-CEI, 2002). Actualmente, no se cuenta con regulaciones ambientales formales para la mayoría de cultivos convencionales, de tal manera que las normativas establecidas para los cultivos transgénicos son mucho más estrictas y rigurosas que para sus contrapartes convencionales. Es clara la necesidad de reevaluar los efectos ambientales potenciales de los cultivos mejorados en forma convencional. Esto lleva a un enfoque de precaución en la liberación no solo de cultivos transgénicos, sino de cualquier cultivo nuevo (cultivos exóticos), así como la introducción de cambios sustanciales en las prácticas agrícolas. Debe tenerse en cuenta que la cantidad de material genético nuevo adicionado a un ecosistema al introducir una nueva especie, es considerablemente mayor que al introducir solamente un transgen. La realidad es que modificaciones genéticas, ya sean grandes o pequeñas pueden tener consecuencias ambientales importantes.

En el caso de posibles efectos en la salud y del producto como alimento, se analizan aspectos como la seguridad individual del producto, alergenicidad, toxicidad, resistencia a antibióticos, composición, estudios bromatológicos, calidad nutricional, digestibilidad, y principalmente lo relacionado con el nuevo gen insertado (transgen) y sus productos (AGBIOS, 2002). Para que un producto proveniente de un cultivo GM entre en el mercado, es sometido previamente a estudios exhaustivos y se compara con productos similares convencionales. Como punto de partida para estos estudios se utiliza el Principio de Equivalencia Sustancial. Este concepto se basa en la idea de que un organismo existente utilizado como alimento puede servir como base de comparación cuando se evalúa la inocuidad de un alimento para el consumo ya sea humano o animal. El cultivo transgénico y sus productos

son comparados con su contraparte convencional, donde existe historia de consumo seguro (**Traynor et al.**, 2002). Después de una década de comercialización de alimentos provenientes de cultivos transgénicos, no hay un solo caso documentado o con evidencia científica sobre efectos nocivos en la salud debido al consumo de alimentos GM.

Entre los principales temores que han surgido con la aplicación de la manipulación genética y la utilización de plantas transgénicas para cultivos están la posible reducción de la biodiversidad, y la incorporación de genes “foráneos” en una especie. Algunas posiciones aducen que se pondrían en riesgo las defensas naturales adquiridas por individuos y especies a lo largo del proceso evolutivo. Por otro lado, otras posiciones plantean que se debe considerar la necesidad de incrementar la producción agropecuaria (800 millones de personas mal nutridas), así como contar con sistemas de producción ecológicamente más amigables, y los requerimientos para enfrentar el aumento de enfermedades infecciosas y aparición de plagas anteriormente desconocidas, que llevan a considerar un uso prudente de la amplia gama de posibilidades que ofrecen los desarrollos biológicos actuales (**Bryant**, 2001). Con el estado actual de conocimientos y tecnologías disponibles, parece que el impacto de DNA de origen transgénico parecería ser insignificante, comparado con la cantidad total de DNA libre (**Dale et al.**, 2002).

Desde una perspectiva científica, hay la necesidad de considerar los impactos potenciales de los cultivos transgénicos dentro del contexto de los efectos ambientales ocasionados por otras prácticas y tecnologías agrícolas tradicionales. Hay evidencia sustancial de que los efectos ecológicos de las prácticas agrícolas convencionales ejercen efectos simplificadores y desestabilizadores en los ecosistemas naturales adyacentes. Estos efectos son preocupantes porque son un factor en la reducción o pérdida de la capacidad de resiliencia de los ecosistemas, es decir, su capacidad de retornar a su estructura y función ecológica original a pesar del disturbio, lo cual sitúa al ecosistema en un posición de “ecosistema amenazado o en riesgo” (**NRC-CEI**, 2002). Uno de los impactos iniciales al ambiente se origina con las propias prácticas agrícolas tradicionales que incluyen la deforestación y la limpieza de matorrales, prácticas que se han venido aceptando durante siglos sin evaluación previa de sus consecuencias, porque hasta hace muy poco tiempo no había existido ningún tipo de conciencia de protección del medio ambiente. En este sentido la sustitución de un cultivo tradicional por uno transgénico no añadiría ningún daño adicional al medio ambiente; por el contrario, el impacto ambiental puede reducirse si con el cultivo

transgénico se logra un mayor rendimiento agrícola y por lo tanto se necesitará deforestar o aclarar menos terreno para producir lo mismo.

Epílogo

La tecnología de genes que permite la transformación genética ha demostrado que puede producir cambios significativos en la agricultura. Los cultivos transgénicos, en principio, no son más agresivos para el ambiente que los cultivos tradicionales. Más bien, los resultados de cerca de una década de comercialización de los cultivos transgénicos han mostrado que si son utilizados en forma cuidadosa y adecuada, pueden ser muy útiles para la agricultura sostenible. La habilidad de manipular genes, que permite alteraciones deliberadas, racionales y dirigidas del genoma de cultivos vegetales para el mejoramiento ya sea de sus características agronómicas, para mejorar su calidad nutricional o para la obtención de productos de interés, es una realidad aplicable que ha demostrado beneficios tanto al agricultor, como al usuario. Las aplicaciones adecuadas de la tecnología de genes, incluida la transformación genética de cultivos pueden dar como resultado un uso más amplio de la diversidad genética, ya sea de especies cultivadas o silvestres, para beneficio de la humanidad.

La transformación genética se articula perfectamente con los sistemas de manejo integrado de cultivos. Sin embargo, si bien, la biotecnología moderna tiene mucho que aportar al mejoramiento de cultivos, es una tecnología nueva y se requiere de una evaluación muy cuidadosa y rigurosa de los posibles riesgos que conlleva. Para poder utilizarlos en forma segura y conveniente, es necesario tener una comprensión profunda y técnicamente competente tanto sobre los beneficios como sobre los riesgos de los cultivos transgénicos, así como contar con los instrumentos normativos adecuados de forma tal, que se garantice la salud, el medio ambiente y la producción agropecuaria. En un país de alta diversidad biológica como Colombia es necesario fortalecer las capacidades para evaluación y gestión de los posibles riesgos involucrados con la utilización de cultivos transgénicos y desarrollar sistemas normativos que, a la vez que garanticen el uso seguro de los OGM para la salud y el ambiente, permitan acceder a los beneficios de su aplicación.

Uno de los beneficios de la transformación genética de cultivos en el mantenimiento y el incremento de la agrobiodiversidad es la reducción en el uso de productos químicos cuyo impacto en el ambiente es bien conocido. En relación con la protección de cultivos, uno de los cam-

pos que se encuentra en estudio intensivo utilizando los avances moleculares y en genómica (estudio de secuencias, funciones y expresión de los genes) es la caracterización y análisis de genes vegetales que regulan los procesos de crecimiento y desarrollo vegetal, las adaptaciones a las condiciones ambientales extremas (salinidad, sequía, heladas) y especialmente, los mecanismos de defensa contra insectos y patógenos. El avance en los estudios de los “perfiles de expresión” permitirá determinar el nivel de expresión de ciertos genes, y evaluar el efecto de modificaciones y perturbaciones ambientales sobre la expresión de los genes que son en últimas, quienes definen la capacidad de respuestas y adaptación de un organismo a los cambios en su entorno. Estos desarrollos permitirán a los biólogos moleculares manipular las vías de control y expresión de genes, para estimular respuestas más rápidas a los diferentes problemas o requerimientos del fitomejoramiento.

Bibliografía

- ABSP – Agricultural Biotechnology Support Project II.** 2004. Genetically Engineered Organisms. Public Issues Education Project. www.geo.pie.cornell.edu
- Agbios - Agriculture & Biotechnology Strategies, Inc.** 2002. Essential Biosafety™. A comprehensive source of scientific and regulatory information. CD-ROM^{2nd} Edition.
- Arthur, C.** 2003. Report finds GM crops are good for environment. <http://www.checkbiotech.org>
- Baulcombe, D.C.** 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* **8**, 1833-1844.
- Beachy RN, S. Loesch-Fries and N.E. Tumer.** 1990 Coat protein-mediated resistance against virus infection. *Annu. Rev. Phytopathol.* **28**, 451-474.
- Beachy RN.** 1997. Mechanisms and applications of pathogen-derived resistance in transgenic plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**, 215-220.
- Benschel D., S.S. Pappu, C.L. Niblett, F. Varon de Agudelo, F. Morales, E. Hodson, E. Alvarez, O. Acosta and R.F. Lee.** 1996 A strain of Soybean Mosaic Virus infecting *Passiflora spp.* in Colombia. *Plant Dis.* **80**, 258-262.
- Birch RG.** 1997. Plant Transformation: Problems and strategies for practical application. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **48**, 297-326.
- Bryant, P.J.** 2001. Biodiversity and conservation. A hypertext book. School of Biological Sciences, University of California, Irvine, U.S.A. <http://darwin.bio.uci.edu/~sustain/bio65>
- Cancino-Escalante O y E. Hodson-de-Jaramillo** 1994 Cultivo de tejidos y micropropagación en “maracuyá” *Passiflora edulis* var *flavicarpa* Degener. *Revista Tablero* **47**, 81-83.
- Chrispeels, M.J. and D.E. Sadava.** 2003. *Plants, Genes and Crop Biotechnology*. Second Edition. American Society of Plant Biologists and the ASPB Education Foundation. Jones and Bartlett Publishers, Salisbury, Massachusetts, U.S.A.
- Dale, P.J., B. Clarke and E.M.G. Fontes.** 2002. Potential for the environmental impact of transgenic crops. *Nature Biotechnology* **20**, 567-574.
- Daniell, H.** 1999. Environmentally friendly approaches to genetic engineering. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* **35**, 361-368.
- Daniell, H., M.S. Khan and L. Allison.** 2002. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology. *TRENDS in Plant Science.* **7**, 84-91
- Fagard, M. and H. Boucheret.** 2000. (Trans)Gene silencing in plants: How many mechanisms? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* **51**, 167-194.
- Green, D.** 2002. GM crops could save endangered birds. <http://www.checkbiotech.org>
- Hodson de Jaramillo, E.** 1999. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Passiflora edulis* for Potyvirus resistance. Ph.D. Thesis, University of Nottingham.
- James, C.** 2003. Preview: Global Status of Commercialized Transgenic Crops: 2002. ISAAA Briefs No. 30: ISAAA Ithaca, N.Y. www.isaaa.org
- Kirby A.** 1999. GM crop can help environment. <http://www.biotech-info.net>
- Nil, K.** 2002. Let the facts speak for themselves: The contribution of agricultural crop biotechnology to American farming. American Soybean Association, St. Louis, MO. Interim Report – 16 September 2002. <http://www.tomorrowbounty.org/library/prepubvs91502a.htm>
- NRC-CEI National Research Council Committee on Environmental Impacts.** 2002. *Environmental Effects of Transgenic Plants*. National Academy Press, Washington, D.C.
- NU- Naciones Unidas.** 2003. Efectos de las nuevas biotecnologías, prestando particular atención al desarrollo sostenible, incluida la seguridad alimentaria, la salud y la productividad económica. Informe del Secretario General. 58º periodo de Sesiones de la Asamblea General. Documento A/58/76.
- Pappu, S.S., R. Brand, H.R. Pappu, E.P. Rybicki, K.H. Gough, M.J. Frenkel and C.L. Niblett.** 1993 A polymerase chain reaction method adapted for selective amplification and cloning of 3' sequences of Potyviral genomes: application to Dasheen Mosaic Virus. *J. Virol. Methods* **41**, 9-20.
- Sambrook, J., E.F. Fritsch and T. Maniatis.** 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd Ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, USA.
- Sanford, J.C. and S.A. Johnston.** 1985 The concept of parasite-derived resistance-deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J. Theor. Biol.* **113**, 395-405
- Tepfer, M.** 2002. Risk assessment of virus-resistant transgenic plants. *Annu. Rev. Phytopathol.* **40**, 467-491.
- Traynor P.L., R. Frederick and M. Koch.** 2002. *Biosafety and Risk Assessment in Agricultural Biotechnology (A Workbook for Technical Training)*. The Agricultural Biotechnology Support Project, Institute of International Agriculture, Michigan State University, USA.

- van de Boogaart, T., G.P. Lomonosoff and J.W. Davies.** 1998. Can we explain RNA-mediated virus-resistance by homology-dependent gene silencing? *Mol. Plant-Microbe Interact.* **11**, 717-723.
- Varón de Agudelo, F., M. Castaño, J.A. Arroyave, A.C. Velasco, C. Vuillaume y F.J. Morales.** 1992. Complejo viral que afecta plantaciones de maracuyá. (*Passiflora edulis* Sims.) en el Valle del Cauca. *Fruits* **47**, 321-329.
- Vasil, I.K.** 1999. Plant biotechnology: Achievements and opportunities at the threshold of the 21st century. En: *Plant Biotechnology and In Vitro Biology in the 21st Century*. Altman *et al.* (Eds). Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Waterhouse, P.M., H.W. Graham and M.B. Wang.** 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **95**, 13959-13964.
- Wright, S.** 2003. GM cotton may cut pesticides. <http://checkbiotech.org>
- Zupan, J.R. and P. Zambryski.** 1997. The *Agrobacterium* DNA transfer complex. *Crit. Rev. Plant. Sci.* **16**, 279-295.

Recibido el 4 de marzo de 2004.

Aceptado para su publicación el 10 de marzo de 2004.