

APLICACION DE LA BIOLOGIA MOLECULAR A LA FLORICULTURA COLOMBIANA

VIRGINIA MONTES DE GOMEZ¹

Hasta el momento, la obtención de novedades vegetales mejoradas se ha logrado por los métodos clásicos de mejoramiento, basados fundamentalmente en la habilidad del investigador para seleccionar individuos o poblaciones que presenten, en forma sobresaliente, la o las características de interés y en su habilidad para diseñar programas de cruces definidos, con miras a combinar ciertos genotipos parentales con características favorables.

Con estos métodos, se han logrado mejoras considerables a través de los años, pero con ingente inversión de tiempo y dinero. En el caso de los países en vía de desarrollo, la situación es más grave, ya que los países desarrollados han tomado especies nativas, por ejemplo, las alstroemerias, de origen andino, y, después de someterlas a mejoramiento, nos las venden, teniendo que pagarles regalías.

Si el esfuerzo de los mejoradores va a continuar con éxito en el desarrollo de nuevas variedades y, concretamente, los floricultores colombianos quieren romper la dependencia en este aspecto, deben contar con métodos adicionales de selección y de mejoramiento, particularmente, cuando un punto importante, en el éxito del mercado, es el desarrollo rápido de nuevas variedades.

Desde 1983, cuando se registró la primera transformación exitosa de células vegetales con un gen foráneo y se obtuvo la regeneración de una planta fértil a partir de estas células, el mejoramiento, a través de la ingeniería genética, es una posibilidad real.

Las técnicas de biología molecular se están usando para desarrollar nuevas herramientas útiles a los

mejoradores, pero en ningún caso sustituyen totalmente los métodos clásicos, pues simplemente lo dotan de herramientas poderosas para sobrepasar algunas limitaciones inherentes a las técnicas clásicas.

La transformación genética puede ser definida como la introducción controlada de ácidos nucleicos en el genoma del organismo receptor.

El objetivo final del empleo de la biología molecular, más exactamente de la transformación genética en la floricultura, es la obtención de plantas transformadas estables, es decir, de plantas que contienen copias permanentes de DNA foráneo que pueden ser heredadas en cada división celular.

Un esquema general, para el logro de este objetivo, puede ser:

1. Selección de la características deseables
2. Identificación del gen o genes responsables de ella
3. Obtención de ese gen en forma pura
4. Selección del vector para la introducción del gen.

En el caso de las flores, no solamente es necesario la obtención de variedades con nuevas características de color, belleza de la flor, alta productividad, vigor del tallo, etc., sino que también, estas novedades deben tener mayores niveles de resistencia al "stress" biótico y abiótico.

A menudo es posible obtener, en otras variedades, el gen o los genes que le confieren resistencia y, por lo tanto, lo importante es transferir éstos al nuevo germoplasma.

En otros casos, no se conocen los niveles apropiados de resistencia y éstos deben ser diseñados por ingeniería genética. Igualmente sucede para las otras características deseadas.

¹ Profesora Asociada. Departamento de Química. Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C.

Las técnicas de biología molecular se pueden clasificar en dos grandes grupos:

- a) Manipulación genómica
- b) Modificación del genoma

La manipulación genómica involucra el análisis del genoma "in vitro" de un organismo, con el fin de identificar regiones específicas importantes para un fenotipo particular. Una vez que se han identificado estas regiones, ellas pueden ser transferidas (manipuladas) de un germoplasma a otro por los métodos de biología molecular, para el entrecruzamiento.

El segundo grupo involucra la modificación directa del genoma existente en la planta, usualmente por la inserción de un o unos genes nuevos. Estos genes nuevos incluyen la resistencia a patógenos, a herbicidas, a salinidad, a sequía y hasta los que modifican o aumentan los niveles de proteínas en determinada planta.

Desde hace tiempo, los mejoradores y genetistas han propuesto el uso de marcadores genéticos, como mecanismo de selección indirecta, para el rastreo de una determinada característica.

De estos marcadores, se están ensayando, cuatro clases, a saber:

- 1) citológicos;
- 2) morfológicos;
- 3) bioquímicos; y
- 4) moleculares.

Desafortunadamente, los dos primeros alteran severamente el fenotipo de las plantas y resultan individuos indeseables o que presentan problemas de manipulación, en poblaciones sometidas a mejoramiento. En el tercero, la presencia de isoenzimas ha ayudado al desarrollo de la teoría de la selección basada en los marcadores.

En el grupo de investigación, conformado por el Departamento de Química y la Facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia, en asocio con la empresa Floramérica, se está iniciando, en plantas modificadas de clavel, la búsqueda de isoenzimas relacionadas con la resistencia a *Fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi*.

El bajo nivel de polimorfismo observado en varias especies vegetales y el número limitado de isoenzimas presentes en éstas, son una limitante para el uso de las isoenzimas como herramientas en los métodos de selección indirecta.

En el cuarto, el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLPs) y el polimorfismo del DNA amplificado al azar (RAPDs) se han utiliza-

do como marcadores moleculares en las investigaciones del genoma de las plantas.

Los RFLPs han sido estudiados en diferentes plantas y son útiles, tanto en estudios genéticos, como en la localización de genes responsables de una característica específica en un genoma dado.

Un RFLP es, simplemente, una diferencia en el DNA entre dos individuos y puede ser debida a la inserción o a la detección de pequeños segmentos de DNA o a cambios en una o dos bases en la secuencia del DNA.

Por varias razones, los RFLPs son los marcadores casi perfectos del genoma, por las siguientes razones:

- Presentan un comportamiento mendeliano codominante,
- Realmente están presentes en plantas sometidas a investigación,
- En todos los estados de desarrollo de la planta y en casi todos los tejidos, pueden ser detectados,
- Son neutros y, por consiguiente, no interfieren con las características en estudio,
- Las condiciones ambientales o de "stress" a que pueda ser sometido un individuo no los afecta.

Sus limitaciones son el número de pasos requeridos para detectar los RFLPs, el número simultáneo de individuos que pueden ser analizados y la velocidad de este análisis, así como en algunas especies, la dificultad de detección del polimorfismo (por ejemplo, en tomate y trigo).

Transformación Genética.

Los métodos empleados en la transformación genética son:

1. Transferencia del DNA desde la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* a células vegetales con heridas.
2. Transferencia del DNA empleando vectores virales.
3. Transformación directa: tratamiento con PEG, poliornitina o fosfato de calcio, electroporación, microinyección y biobalística.

Transferencia del DNA empleando *Agrobacterium tumefaciens*.

De hecho, el sistema de transformación con *A. tumefaciens* es un suceso natural de transgénesis. Actualmente, su plásmido ha sido modificado, para utilizarlo como vector para la introducción de cualquier secuencia de DNA deseada en el genoma nuclear de las plantas.

El procedimiento mismo de transformación involucra el cultivo de las plantas lesionadas con la bacteria.

El material vegetal a utilizar puede ser protoplastos aislados, semillas germinadas y explantes de hojas, raíces, tallos, hipocótilos, cotiledones, bulbos, etc.

Después del cultivo, las plantas transformadas se dejan proliferar en un medio selectivo y éstas, usualmente, generan nuevas plantas a través de organogénesis o embriogénesis somática, pasando por una fase de callo.

Si es posible la transferencia de genes mediada por *Agrobacterium*, es el método de elección, por que permite una integración estable de un segmento de DNA definido en una ó unas pocas copias.

Los hospedantes de *Agrobacterium tumefaciens* son plantas dicotiledóneas, aún cuando, en algunos casos, se ha logrado infección en monocotiledóneas, por ejemplo, el espárrago y la dioscorea.

La transformación de las células vegetales en los puntos de infección natural, las dota de la capacidad de crecimiento autónomo, en ausencia de estímulos externos; además, dependiendo de la bacteria infectante, las células transformadas adquieren la habilidad para sintetizar uno de los dos derivados de la arginina, llamados octopina [N- α (D-1 carboetil) L-arginina] o nopalina [N- α -(1,3 dicarboxipropil) L-arginina].

Esta opinas sirven de alimento y fuente de energía para la bacteria infectante. La bacteria que produce octopina puede utilizar este compuesto para crecer, pero no la nopalina y, al contrario, aquella que produce nopalina no puede utilizar octopina.

Los genes de las sintetasas de estas opinas se encuentran en un plásmido gigante de la bacteria, llamado plásmido Ti (plásmido inductor de tumores).

La interacción entre la bacteria infectante y la célula vegetal hospedante, estimula a la bacteria para que corte una región del plásmido Ti, conocida como T-DNA de 30 Kbp (DNA transformante), que está limitada por dos secuencias repetitivas de 25 pares de bases. El corte ocurre en sitios específicos y por recombinación entre las regiones terminales anotadas, produce un T-DNA extracromosomal.

Estos T-DNA circulares son, luego, transferidos de la bacteria al genoma nuclear de la planta hospedante, donde se integra. De esta forma, las plantas adquieren los nuevos genes que se encuentran en el T-DNA, incluyendo los responsables de la transformación celular y los de la sintetasa de la opina.

Los productos génicos, necesarios para la escisión, transferencia e integración del T-DNA en la célula

hospedante, no están codificados por el T-DNA en si, sino en otra región del plásmido, conocida como la región VIR (de virulencia).

Estos genes VIR son inducidos por productos específicos de la planta, de tal manera, que la transferencia del T-DNA, sólo se activa en presencia de la planta.

Para la movilización e integración exitosa del T-DNA, sólo se requieren las terminales repetitivas de 25 pares de bases que limitan el T-DNA y todas las demás secuencias no son indispensables. Por lo tanto, el plásmido T₂ y, dentro de él, el T-DNA constituye un vector natural para la introducción de nuevas secuencias de DNA en el genoma de las células somáticas de los vegetales.

Los genes internos del T-DNA pueden ser removidos mediante el uso de enzimas de restricción y pueden reemplazarse por cualquier otro gen que pueda expresarse en tejido vegetal, bien sea este gen de origen vegetal, animal, fungoso o bacteriano.

En general, el gen de la opina sintetasa se reemplaza por el gen foráneo. En esta forma, el promotor natural y las señales de poliadenilación de la opina sintetasa, le confieren un alto nivel de expresión de la proteína foránea.

Inicialmente, un fragmento grande del plásmido Ti, que contiene la región T-DNA como la VIR, se clona en un plásmido bacteriano común pBR 322 (acepta fragmentos hasta 5 Kbp) y el gen foráneo es, luego, clonado en la región no esencial del T-DNA y este plásmido híbrido es introducido en *A. tumefaciens* que lleva un plásmido Ti intacto. Cuando las plantas son infectadas con estas bacterias, los productos génicos de la región VIR del plásmido Ti intacto, movilizan el T-DNA recombinante y éste se integra al genoma de la planta.

Ultimamente, ha sido posible reemplazar el promotor de la opina sintetasa constitutiva por un promotor inducible por la luz, derivado de un gen que codifica la subunidad pequeña de la disfosforibulasa carboxilasa cloroplástica.

La existencia de respuesta al choque térmico en plantas, al igual que en otros reinos, permite prever la expresión de genes foráneos que sean inducibles por el calor.

Las principales limitantes de este método de transformación son:

- la imposibilidad de infectar todo tipo de plantas, debido a que la infección ocurre principalmente en dicotiledóneas.

- la regeneración de células somáticas infectadas con T-DNA nativo se bloquea algunas veces, debido a que los genes transformantes alteran los

mecanismos normales del control de crecimiento y desarrollo.

Luego, es necesario superar estas limitantes, posiblemente con la eliminación o modificación de los genes responsables de este problema.

Transformación de plantas por otros métodos.

Para otras especies recalcitrantes a *Agrobacterium tumefaciens*, existen métodos alternativos de transformación, como la electroporación y la biobalística.

La electroporación, que es un método físico-químico de protoplastos, puede ser una buena alternativa, únicamente, cuando la célula receptora es capaz de regenerar plantas.

La biobalística es un método mecánico y ha sido usado con éxito en la transferencia de DNA en tejidos intactos y es, por lo tanto, promisoría en plantas que son de difícil regeneración.

Personalmente, considero que en la floricultura colombiana, una de las posibilidades de mayor transformación de plantas es el método de la biobalística, dado que el equipo puede ser construido en el país y se pueden usar meristemos, embriones, etc., como blanco de transformación y, en Colombia, ya está disponible la metodología para la regeneración de especies florales a partir de estos explantes.

En 1987, Klein y colaboradores reportaron un nuevo fenómeno que es el envío de ácidos nucleicos a las células vegetales utilizando microproyectiles acelerados a altas velocidades. Esa investigación se condujo con la idea de superar algunos problemas de otros métodos de transformación vegetal, como la limitación de hospedantes de *Agrobacterium tumefaciens* y la imposibilidad de regenerar plantas a partir de células en algunas especies.

Para ello, se emplearon microproyectiles esféricos de Tungsteno (4µm de diámetro) para bombardear células intactas de cebolla (*Allium cepa* L.), que se transformaron adhiriendo a los microproyectiles, tanto RNA (material genético del virus del mosaico del tabaco), como DNA (el plásmido p35-CAT). En ambos casos, se obtuvieron proteínas codificadas por el ácido nucleico correspondiente.

En 1991, Sautter y colaboradores, reportaron un sistema de microproyectiles más refinado, en que las partículas son separadas o dispersadas en una fase gaseosa antes de someterlas a aceleración. Entonces, se emite un pulso de presión mediante la acción de una pistola de aire, que se alimenta con CO₂ o nitrógeno. El pulso de presión se desplaza por un tubo de Pirot que termina en un capilar de acero. En la punta de éste, se coloca una suspensión de microproyectiles en una solución del DNA

(20µ l), que es nebulizada en goticas del orden de micrones. Las gotas son sopladas por el mismo pulso de presión a través de una abertura estrecha, llamada abertura de restricción, que es un capilar de vidrio de diámetro entre 140 y 300 µl y cuya longitud puede ser hasta 10 mm de largo. Esto permite acelerar las goticas que contienen el ácido nucleico.

Después de un corto trayecto de 10 mm, a través de una cámara de vacío parcial, las partículas llegan al tejido, que constituye el blanco de localización, mediante la rejilla de un estereomicroscopio.

El sistema utiliza partículas de oro, obtenidas a partir de sales de oro, y un revelador fotográfico comercial. La suspensión de partículas y de DNA se prepara incorporando en un buffer, inmediatamente antes de usarla, el plásmido y la suspensión de proyectiles.

El tejido que sirve de blanco debe ser inmovilizado, para evitar que la corriente de gas lo mueva. Para tal fin, se prepara una lámina de agarosa con CaCl₂, sobre la cual se coloca una gota de alginato y, sobre ésta, el tejido. El alginato polimeriza en presencia del calcio. El resultado es un sandwich de agarosa - alginato -tejido, fácil de manipular.

Después del bombardeo, el tejido puede separarse para ser sometido a cultivo, con el propósito de regenerar la planta completa. Posteriormente, se deben hacer pruebas de transformación, para comprobar la incorporación del plásmido al genoma de la planta.

El entrecruzamiento clásico de flores tiene sus limitaciones y la principal de ellas es que no existe especie alguna, que posea la capacidad genética para producir variedades en todo el espectro de colores.

Por lo tanto, una de las aplicaciones más importantes de las técnicas de ingeniería genética en la floricultura está en el área del color de las flores. En la mayoría de las plantas, el color de las flores está determinado por flavonoides, provenientes de la vía fenilpropanoide, la cual ha sido bien caracterizada en petunia.

La fenilalanina es precursora común de todos los flavonoides. La primera estructura coloreada es obtenida por la condensación de una molécula de 4-cumaroil coenzima A con tres moléculas de malonil coenzima A, mediante la enzima chalcona sintetasa (CHS). El producto amarillo de esta reacción, la chalcona de naringenina, es convertida por la enzima chalcona flavona isomerasa (CHI), a la flavona de naringenina (incolora), la cual, a través de otras enzimas, es convertida en las diferentes antocianinas pigmentadas (delfinidinas azuladas, pelargonidinas anaranjadas y cianidinas rojizas).

El fenotipo de pigmentación final de la flor está determinado por la antocianina particular predominante, el pH vacuolar (donde se almacena el pigmento) y la presencia y concentración de flavonoles y otros copigmentos.

Hasta el momento, se han clonado algunos genes implicados en la generación del color, entre ellos el de la chalcona sintetasa (CHS), la chalcona flavona isomerasa (CHI) y la dihidroflavonol-4- reductasa (DFR) y se han reportado algunos experimentos exitosos en la pigmentación de flores de petunia, inicialmente, eliminando las enzimas que produce la pelargonidina anaranjada y, luego, transfiriéndole la DFR del maíz, que produce la pelargonidina anaranjada.

En otro estudio, usando la estrategia de genes antisentido, se interrumpió un gen implicado en la pigmentación de la petunia. La introducción del cDNA del gen de la CHS, bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de coliflor (CaMV), produjo una reducción efectiva de la expresión de la CHS y, como consecuencia, se logró una reducción

en la pigmentación de la flor en forma variegada con patron de pigmentación en zonas o anillos o en forma homogénea.

Finalmente, podemos decir que en la floricultura colombiana, aún no se ha aplicado la biología molecular, pero existen las posibilidades de hacerlo en corto plazo, ya que, para varias especies florales, se tienen los métodos de regeneración de plantas a partir de callos, meristemos, embriones, etc.

En las Universidades y concretamente en la Universidad Nacional de Colombia, existe el personal científico calificado que puede realizar las investigaciones correspondientes y en las empresas de flores existe la posibilidad de hacer los ensayos a nivel de campo, para verificar la transferencia.

Unicamente, es necesario fortalecer la asociación entre la Universidad y los floricultores, para que, en unión con entidades, como Colciencias, se logren llevar a feliz término los ensayos y, así, poder romper la dependencia tecnológica de otros países desarrollados.