

EL DESARROLLO DE CEREALES TRANSGÉNICOS¹

The development of transgenic cereals

Hugo Campos de Q.²

S U M M A R Y

In this review topics about the production of transgenic cereals in four species: wheat, rice, maize and barley are discussed, as well as the related technological breakthroughs obtained so far. The main difficulties faced in the transgenic cereal production are the inherent low regenerative ability of monocotyledonous tissues as well as the lack of high expression promoter genes for cereals crops.

Furthermore, the advantages of the biolistic as a methodology for the production of transgenic plants in recalcitrant species are emphasized. The production of transgenic cereals certainly is a complementary contribution to conventional plant breeding.

Key words: cereals, breeding, biotechnology, transgenesis.

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético tradicional de los cereales ha desarrollado aplicaciones tan productivas como las variedades híbridas en maíz, así como la obtención de variedades de trigo y arroz del tipo semienano, de un mayor índice de cosecha, amplia adaptación y elevada respuesta a la fertilización nitrogenada. Se estima que alrededor de un 50% del incremento en los rendimientos obtenidos por los cereales durante los últimos 30 años se debe exclusivamente al desarrollo de variedades mejoradas. Sin embargo, la producción mundial de cereales presenta una tendencia decreciente en los últimos diez años (Vasil, 1995).

En paralelo, durante los últimos 15 años han sido desarrolladas una serie de metodologías mediante las cuales ha sido posible potenciar el mejoramiento genético de numerosas especies, así como optimizar los procesos de generación de variabilidad genética y posterior selección de los materiales segregantes. A pesar del progreso tecnológico, los avances obtenidos con la producción de cereales transgénicos, entendiéndose como tal a aquéllos que poseen, integrados en forma estable, genes distintos a los habitualmente existente en su composición genética, han sido sustancial-

mente inferiores a aquellos obtenidos con especies dicotiledóneas. El presente trabajo presenta algunas de las dificultades enfrentadas en la transgénesis de las especies cereales, así como los resultados obtenidos.

Regeneración *in vitro*

La principal dificultad enfrentada en el desarrollo de cereales transgénicos es la escasa "dediferenciación" y posterior regeneración que se obtiene a partir de los callos de tales especies, así como la gran cantidad de tiempo requerido para desarrollar suspensiones embriogénicas de elevada capacidad regenerativa (Vasil *et al.*, 1992; Wan y Lemaux, 1994). Además, la transformación genética de los cereales mediante *Agrobacterium tumefaciens*, sistema utilizado en especies dicotiledóneas, ha sido prácticamente improductiva. Una vez que la célula vegetal de un cereal ha sido penetrada por *A. tumefaciens* no responde "dediferenciándose", por el contrario, acumula compuestos fenólicos necrosándose, impidiendo así la expansión de los genes introducidos al resto de la planta (Potrykus, 1990).

La situación anterior ha sido superada mediante el desarrollo de suspensiones embriogénicas, a partir de las cuales es factible inducir la formación de embriones somáticos. Los embriones somáticos se desarrollan *in vitro* a partir de células somáticas, siendo anatómica, morfológica, fisiológica y molecularmente equivalentes a los embriones zigóticos originados en la reproducción sexual de un vegetal (Kiyosue *et al.*, 1993). Las suspen-

¹Recepción de originales: 24 de junio de 1994.

El autor desea agradecer los comentarios del Ingeniero Agrónomo Nilo Lizama A., así como al FIA (Fondo de Investigaciones Agropecuarias), por el apoyo financiero prestado.

²Centro Regional de Investigación Carillanca (INIA), Casilla 58-D, Temuco, Chile.

siones embriogénicas se originan a partir de embriones inmaduros, los cuales, cultivados *in vitro*, originan callos tipo C, útiles como material receptor para transformaciones genéticas (Vasil *et al.*, 1992). Asimismo, la utilización directa de embriones inmaduros ha permitido incrementar la eficiencia de la transformación genética de trigo (Weeks *et al.*, 1993).

Genes promotores

La introducción de un gen determinado a una especie vegetal, mediante una transformación genética, requiere la construcción de un gen quimérico, en el cual se integran el gen estructural de interés agronómico, un gen marcador de selección y, finalmente, un gen promotor. Los genes promotores regulan el período durante el cual se expresará el gen estructural, la velocidad de expresión del gen estructural, los tejidos en los cuales se expresará, así como las variaciones en el comportamiento de dicho gen frente a fluctuaciones del medio ambiente. En especies dicotiledóneas, en forma rutinaria se utiliza el gen promotor CaMV 35S, así como ciertos genes de expresión específica en semillas (Block, Brower y Tenning, 1989).

Los mecanismos moleculares reguladores de la expresión génica son distintos en las diversas especies. En efecto, la expresión génica de los genes promotores utilizados en especies dicotiledóneas se reduce en un factor de 10 a 50 en especies monocotiledóneas (Kyokuza *et al.*, 1993; Last *et al.*, 1991). En consecuencia, una segunda dificultad existente en el desarrollo de cereales transgénicos, es la ausencia de genes promotores de elevado rendimiento (McElroy y Brettell, 1994).

El desarrollo de nuevos genes promotores, combinando secuencias de origen mono y dicotiledóneo, ha permitido obtener niveles aceptables de expresión en los cereales transgénicos desarrollados. Ejemplo de lo anterior es el gen promotor CaMV 35S-Intrón Adh1, el cual incluye el intrón 1 del gen que codifica la enzima alcohol deshidrogenasa en maíz, combinación efectiva en maíz, avena y trigo (Fromm *et al.*, 1990; Vasil *et al.*, 1992). En paralelo, se han desarrollado genes promotores de origen monocotiledóneo de elevada expresión génica en cereales, como es el caso del gen Ubi1-Intrón1-Ubi1, proveniente de maíz, así como el gen Act1-Intrón1-Act1, proveniente de arroz, los cuales se han utilizado en cebada, trigo y arroz (Taylor, Vasil y Vasil, 1993; Wan y Lemaux, 1994).

Genes marcadores de selección

Otra limitante enfrentada en el desarrollo de cereales transgénicos se refiere a los genes marcadores de selección utilizados, mediante los cuales es factible aislar e identificar las células efectivamente transformadas, puesto que la transformación genética de plantas es un proceso muy poco eficiente (Hauptmann *et al.*, 1988). Un marcador de selección ampliamente utilizado es el gen NPT-II, el cual confiere a las células que lo portan tolerancia a antibióticos aminoglicósidos, como es el caso de la kanamicina (Hayford *et al.*, 1988). Los cereales, en general, y el arroz en particular, poseen un cierto nivel de resistencia natural a la kanamicina, por lo cual los resultados obtenidos con dicho gen marcador de selección no han sido satisfactorios (Terada y Shimamoto, 1993).

Solamente a través del desarrollo de genes marcadores de selección como el gen "bar" proveniente de *Streptomyces hygroscopicus*, el cual codifica la tolerancia al herbicida fosfinotricina, han sido desarrollados cereales transgénicos en forma reciente (McElroy y Brettell, 1994; Terada y Shimamoto, 1993).

Cereales transgénicos desarrollados

No obstante las dificultades enfrentadas, algunos grupos de investigadores han generado cereales transgénicos. Puesto que la productividad del sistema *Agrobacterium*, utilizado en forma rutinaria en plantas dicotiledóneas se ve extremadamente reducida en especies cereales, numerosas otras metodologías han sido utilizadas. La técnica más eficaz ha resultado ser la "biolística", la cual consiste en el envío a alta velocidad de proyectiles de oro o tungsteno, recubiertos con un plásmido portador del gen quimérico respectivo, hacia los tejidos vegetales que se desean transformar genéticamente (Klein *et al.*, 1992; Li *et al.*, 1993; Reggiardo *et al.*, 1991). La biolística permite transformar genéticamente un mayor número de genotipos, así como utilizar tejidos que permiten una rápida y efectiva regeneración *in vitro* de las plantas transgénicas generadas. A continuación se discuten los resultados obtenidos para las especies cereales.

Trigo

Las primeras plantas transgénicas de trigo se generaron en 1992 (Vasil *et al.*, 1992). Se obtuvieron plantas transgénicas tolerantes al herbicida fosfinotricina, mediante la introducción del gen "bar". El tejido receptor utilizado fue suspensiones

embriogénicas, a partir de las cuales es factible inducir la formación de embriones somáticos. El gen promotor empleado fue la fusión CaMV 35S-Adh1.

Un avance significativo en la obtención de trigo transgénico fue el desarrollo de un protocolo de transformación genética que utiliza otros tejidos vegetales en lugar de suspensiones embriogénicas como tejido receptor, a objeto de reducir el tiempo involucrado e incrementar la productividad de la técnica. Weeks *et al.* (1993), mediante el uso de embriones zigóticos inmaduros como tejido receptor, obtuvieron numerosas plantas transgénicas tolerantes al herbicida fosfinotricina, con un rendimiento de 1 a 2 plantas transgénicas por 1.000 embriones bombardeados. El gen promotor utilizado fue Ubi1 proveniente de maíz, mientras el gen marcador de selección "bar" se incluyó dentro del gen quimérico diseñado, a objeto de recuperar los embriones efectivamente transformados.

Cebada

En cebada, se han obtenido plantas transgénicas portadoras de dos genes, el gen bar y el gen codificador de la cubierta proteica del VEAC (Virus del enanismo amarillo de la cebada), mediante el uso de la biolística con partículas de oro. Como gen promotor se utilizó el gen Adh1 proveniente de maíz, utilizándose el gen "bar" como marcador de selección. El material vegetal utilizado fue embriones zigóticos inmaduros (Wan y Lemaux, 1994). Se generaron numerosas plantas, las cuales transmitieron a su progenie los genes introducidos (Wan y Lemaux, 1994).

Arroz

El primer cereal transgénico se desarrolló en esta especie (Hayakawa *et al.*, 1992), obteniéndose plantas transgénicas tolerantes al virus del estriado del arroz. La metodología utilizada habitualmente en esta especie es la incorporación de genes a protoplastos mediante electroporación y PEG (Polietilenglicol), puesto que el arroz es una especie cereal, para la cual existen las tecnologías requeridas para desarrollar plantas a partir de protoplastos (Gupta y Pattanayak, 1993). El componente genético ha resultado ser extremadamente importante, puesto que si bien el desarrollo de regenerantes de arroz del tipo japonica es rutinario en numerosos laboratorios, el desarrollo de regenerantes del tipo indica es mucho más complejo (Terada y Shimamoto, 1993).

Genes promotores utilizados frecuentemente en la producción de arroz transgénicos son el CaMV

35S, Adh1, Act1-Intrón1-Act1 y Ubi1-Intrón1-Act1 (Terada y Shimamoto, 1993; Datta *et al.*, 1993; McElroy y Bretell, 1994).

Maíz

El método más eficaz para desarrollar maíz transgénico es la biolística, utilizando como material vegetal callos friables embriogénicos o suspensiones celulares (Fromm *et al.*, 1990). Una desventaja del uso de callos se debe a la generación de quimeras a través de los mismos, por lo cual la presión de selección debe extenderse en el tiempo, reduciéndose en consecuencia la capacidad regenerativa de los tejidos vegetales, a la vez de inducir la formación de numerosas plantas estériles y anormales (Terada y Shimamoto, 1993).

El gen promotor más utilizado en la transformación genética del maíz es la combinación CaMV 35S/intrón Adh1 (Fromm *et al.*, 1990; Reggiardo *et al.*, 1991). En relación a los genes marcadores de selección utilizados, los más frecuentes son el gen "bar", así como un gen que codifica la tolerancia al herbicida clorsulfuron (Fromm *et al.*, 1990). Los genes insertados han sido transmitidos a la progenie en forma mendeliana, lo cual confirma la inserción en forma estable de los genes introducidos al genoma del maíz.

Una de las aplicaciones comerciales de la transgénesis en maíz es el desarrollo de plantas transgénicas mediante biolística que expresan el gen cryIA(b), el cual codifica la síntesis de una proteína con propiedades insecticidas, obtenido de *Bacillus thuringiensis* var. Kurstaki HD-1. Las plantas se evaluaron a nivel de campo, determinándose que el gen se expresó en forma correcta en las plantas transgénicas, las cuales presentaron un nivel de resistencia al gusano barrenador, *Ostrinia nubilalis*, significativamente superior al de las plantas testigo, exhibiendo además las pruebas moleculares que respaldan dicha expresión fenotípica (Koziel *et al.*, 1993).

Los resultados positivos obtenidos con la transformación genética del maíz, aunados con el desarrollo de un sistema de machoesterilidad molecular basado en la expresión de genes codificadores de ARNasas regulados por promotores de expresión específica en tejidos como anteras y tapete (Marianni *et al.*, 1992), ofrecen el potencial de modificar el sistema de producción de híbridos de maíz actualmente en uso, reduciendo su dependencia actual de la mano de obra requerida para despanojar las líneas utilizadas como progenitores maternos.

Como se desprende del presente artículo, si bien existen avances significativos en el desarrollo de cereales transgénicos, deben superarse aún una serie de limitantes tecnológicas a objeto de incrementar la productividad de la técnica. Además, resalta la utilidad de la biolística para la producción de materiales transgénicos, puesto que su simplicidad técnica, aunada con el reducido costo implicado en su fabricación (el costo del material requerido se estima en US\$ 500) (Reggiardo *et al.*, 1991), así como los resultados generados en especies cereales con dicha técnica, la convierten en una alternativa factible de utilizar en países como Chile.

Tanto en el corto como a mediano plazo, el factor limitante en el desarrollo de cereales transgénicos es la disponibilidad de genes de importancia agro-

nómico/tecnológica. Ejemplo de lo anterior, son los genes involucrados en la tolerancia del trigo a niveles elevados de Al^{+3} en el suelo (Snowden y Gardner, 1993), los cuales han sido clonados y secuenciados. Del mismo modo, los genes que codifican ciertos componentes de la calidad panadera del trigo y la calidad maltera de la cebada podrían ser utilizados para incrementar el potencial agroindustrial de tales especies (Shewry *et al.*, 1993). Tanto éstos como otros genes, permitirán desarrollar otros cereales transgénicos, a objeto de potenciar en forma complementaria el mejoramiento genético tradicional y de incrementar el progreso genético. En paralelo, será factible incrementar la utilización agroindustrial de los cereales, mejorándose, en consecuencia, sus perspectivas económicas.

RESUMEN

La presente revisión discute algunos aspectos de la producción de cereales transgénicos en cuatro especies: trigo, arroz, maíz y cebada, así como los avances tecnológicos obtenidos al respecto. Las principales dificultades existentes en la producción de cereales transgénicos son la inherente baja capacidad regenerativa de los tejidos monocotiledóneos, así como la falta de genes promotores de elevada expresión en cereales.

Además, se destacan las ventajas de la biolística como una metodología mediante la cual puede

producirse plantas transgénicas en especies recalcitrantes.

La obtención de cereales transgénicos es, sin duda alguna, un aporte complementario al mejoramiento tradicional.

Palabras claves: cereales, mejoramiento genético, biotecnología, transgénesis.

LITERATURA CITADA

- BLOCK, M., BROUWER, D., and TENNING, P. 1989. Transformation of *Brassica napus* and *Brassica oleracea* using *Agrobacterium tumefaciens* and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants. *Plant Physiology* 91: 694-701.
- DATTA, S. PETERHANS, A., DATTA, K., and POTRYKUS, I. 1990. Genetically engineered fertile indica-rice recovered from protoplasts. *Bio/Technology* 8: 685-690.
- FROMM, M., MORRISH, F., ARMSTRONG, CH., WILLIAMS, R., THOMAS, J., and KLEIN, T. 1990. Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Bio/Technology* 8: 833-839.
- GUPTA, H., and PATTANAYAK, A. 1993. Plant regeneration from mesophyll protoplasts of rice (*Oryza sativa* L.) *Bio/Technology* 11: 90-94.
- HAUPTMANN, R., VASIL, V., OZIAS-AKINS, P., TABAEIZADEH, Z., ROGERS, S., FRALEY, R., HORSCH, R. and VASIL, V. 1988. Evaluation of selectable markers for obtaining stable transformants in the Gramineae. *Plant Physiology* 86: 603-606.
- HAYAKAWA, T., ZHU, Y., ITOH, K., KIMURA, Y., IZAWA, T., SHIMAMATO, K., and TOTIYAMA, S. 1992. Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect transmitted virus. *Proceedings National Academy of Sciences USA*. 89: 9.865-9.869.
- HAYFORD, M., MEDFORD, J., HOFFMANN, N., ROGERS, S., and KLEE, H. 1988. Development of a plant transformation selection system based on expression of genes encoding gentamicin acetyltransferase. *Plant Physiology* 86: 1.216-1.222.
- KIYOSUE, T., SATOH, S., KAMADA, H., and HARADA, H. 1993. Somatic embryogenesis in higher plants. *Journal Plant Research* 3: 75-82.

- KLEIN, T., ARENTZEN, R., LEWIS, P., and FITZPATRICK-McELLAGOTT, S. 1992. Transformation of microbes, plants and animals by particle bombardment. *Bio/Technology* 10: 286-290.
- KOZIEL, M., BELAND, G., BOWMAN, C., CAROZZI, N., CRENSHAW, R., CROSSLAND, L., DAWSON, J., DESAI, N., KADWELL, S., LAUNIS, K., LEWIS, K., MADDOX, D., and EVOLA, S. 1993. Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* 11: 194-200.
- KYOKUZA, J., McELROY, D., HAYAKAWA, T., XIE, Y., WU, R., and SHIMAMOTO, K. 1993. Light-regulated and cell specific expression of tomato *rbcS*_{gusA} and rice *rbcS*_{gusA} fusion genes in transgenic rice. *Plant Physiology* 102: 991-1000.
- LAST, D., BRETTELL, R., CHAMBERLAIN, D., CHAUDHURY, A., LARKIN, P., MARSH, E., PEACOCK, W., and DENNIS, E. 1991. pEMU: an improved promoter for gene expression in cereal cells. *Theor. Appl. Genet.* 81: 581-588.
- LI, L., QU, R., DE KOCHKO, A., FAUQUET, C., and BEACHY, R. 1993. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Report* 12: 250-255.
- MARIANNI, C., GOSSELE, V., DE BEUCKELEER, M., DE BLOCK, M., GOLDBERG, R., DE GREEF, J., and LEE-MANS, J. 1992. A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature* 357: 384-387.
- McELROY, D., and BRETTELL, R. 1994. Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends In Biotechnology* 12: 62-68.
- POTRYKUS, I. 1990. Gene transfer to cereals: an assessment. *Bio/Technology* 8: 535-542.
- REGGIARDO, M., ARANA, J. ORSARIA, L., PERMINGEAT, H., SPITTELER, M., and VALLEJOS, R. 1991. Transient transformation of maize tissues by microparticle bombardment. *Plant Science* 75: 237-243.
- SHEWRY, P., TATHAM, A., HALFORD, N., BARKER, J., HANNAPEL, U., GALLOIS, P., THOMAS, M., and KREIS, M. 1993. Opportunities for manipulating the seed composition of wheat and barley in order to improve quality. *Transgenic Research* 3: 3-12.
- SNOWDEN, K., and GARDNER, R. 1993. Five genes induced by aluminum in wheat (*Triticum aestivum* L.) roots. *Plant Physiology* 103: 855-861.
- TAYLOR, M., VASIL, V., and VASIL, I. 1993. Enhanced GUS expression in cereals/grass cell suspensions and immature embryos using the maize ubiquitin-based plasmid pAHC25. *Plant Cell Reports* 12: 491-495.
- TERADA, R., and SHIMAMOTO, K. 1993. Rice as a model for studies of transformation in monocots. *Journal Plant Research* 3: 201-211.
- TERADA, R., CASTILLO, A., FROMM, M., and VASIL, I. 1992. Herbicide resistant fertile transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus. *Bio/Technology* 10: 667-674.
- VASIL, I. 1995. Cellular and molecular genetic improvement of cereals. In: Terzi, M., Cella, R. y Falavigna, A. (ed.). *Current Issues in Plant Molecular and Cellular Biology*. p: 5-18.
- WAN, Y., and LEMAUX, P. 1994. Generation of large numbers of independently transformed fertile barley plants. *Plant Physiology* 104: 37-48.
- WEEKS, J., ANDERSON, Q., and BLECHL, A. 1993. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat. *Plant Physiology* 102: 1.077-1.084.