

INFORMACIONES
TECNICAS

42/96

INGENIERIA GENETICA EN HORTICULTURA



JUNTA DE ANDALUCIA
Consejería de Agricultura y Pesca

INGENIERIA GENETICA EN HORTICULTURA



JUNTA DE ANDALUCIA
Consejería de Agricultura y Pesca

DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA

© JUNTA DE ANDALUCIA. Consejería de Agricultura y Pesca.

Publica: DIRECCION GENERAL DE INVESTIGACION AGRARIA
Servicio de Publicaciones y Dibulgación

Colección: INFORMACIONES TÉCNICAS: N° 42/96

Autor: J. M. Guerra Sanz

Fotografías e Ilustración: Autor

Coordinación y Diseño: Heliodoro Fernández López, Rosa M^º Mateo Fernández

Depósito Legal: 1.009 - SE.

I.S.B.N.: 84-87564-51-8

Fotocomposición e Impresión: J. de Haro. Sevilla.

INGENIERIA GENETICA EN HORTICULTURA

Dr. José M. Guerra Sanz (*)

(*) Centro de Investigación y Formación Agraria
"La Mojonera" - El Ejido (Almería).

INDICE

INTRODUCCION	9
¿QUE ES UNA PLANTA TRANSGENICA?	10
TECNICAS DE TRANSFORMACIÓN GENETICA	10
REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE CELULAS TRANSFORMADAS	13
BREVE DESCRIPCION DE LA SITUACION DE TRANSFORMACION DE ESPECIES ESPECIALMENTE IMPORTANTES EN HORTICULTURA	17
¿POR QUE CREAR PLANTAS TRANSGENICAS RESISTENTES A ENFERMEDADES?	20
ENSAYOS DE CAMPO DE PLANTAS TRANSGENICAS	25
BIBLIOGRAFIA	27

INTRODUCCION

Este trabajo resume las nuevas tendencias que se pueden encontrar en la horticultura al aplicar la tecnología de transformación genética en búsqueda de soluciones de importantes problemas hortícolas, pasando revista a las técnicas de transformación genética que han tenido éxito en plantas hortícolas, haciendo especial incapié en la transgenia para resistencias a virus y terminando con algunos aspectos de la metodología de los ensayos de campo de plantas transgénicas y sus potenciales riesgos de impacto ambiental.

La modificación de una planta hortícola, para que sea interesante desde un punto de vista económico -y no olvidemos que la producción mundial hortícola según datos FAO de 1990 fue de 102.084 miles de Toneladas(FAO, 1991)-, debe atender en primer lugar a los receptores de ese beneficio potencial. Podemos intentar hacer una lista de posibles beneficiarios de los proyectos de transformación genética a manera de resumen:

- 1.- Mejoradores y agricultores
- 2.- Industria, tanto del comercio o transporte como de transformación.
- 3.- Consumidores.

El primer grupo de personas intervienen directamente en las labores de producción de plantas, y, por tanto, los posibles objetivos de modificación genética habrían de dirigirse a facilitar sus tareas. Así, en este grupo estarían aquellos proyectos de, por ejemplo, resistencias a enfermedades, herbicidas, y también -especialmente para los mejoradores-, control de la fecundidad (masculina o femenina) que permitirían una producción más fácil de híbridos.

En el segundo grupo se pueden situar aquellas mejoras que facilitan el comercio, como pueden ser la obtención de variedades de tomate con mayor cantidad de sólidos que permita un procesado mejor, o la eliminación de daños (manchas,heridas, etc) aparentes en los frutos y que rebajan su precio, o que prolonguen la capacidad de almacenamiento y transporte sin que sufran daños.

El tercer grupo es el más exigente y más sensible a la hora de tener que escoger entre frutos o productos que han sido obtenidos mediante ingeniería genética o mediante procesos normales. En este apartado se pueden agrupar la obtención de frutos con mayor sabor que el habitual o que son más digestivos, o que sean asequibles a lo largo de todo el año, en lugar de ser sólo frutos o productos de temporada.

A pesar de saber que toda simplificación es siempre reduccionista, al clasificar así los posibles beneficiarios de los mismos estaremos también en disposición de evaluar de alguna forma si los intentos de investigación tendrán cierto éxito o no.

Desde un punto de vista económico, los proyectos que estén dirigidos al primer grupo tendrán que ser de bajo coste, ya que los inputs agrícolas se estiman siempre a la baja. Esta puede ser una de las razones del porqué no ha salido al mercado todavía ningún producto terminado que contenga estas mejoras, aun sabiendo que es el grupo donde más investigación hay y mejores éxitos se han obtenido hasta ahora. Por contraste con lo anterior, el único producto transgénico comercial que se ha vendido y se vende actualmente es un tomate producido en Estados Unidos que tiene mayor sabor que el normal porque se puede cosechar muy tardíamente en la planta. "FlavrSavr", obtenido por Calgene (California) es un tomate transgénico que posee un gen en contrasentido para las enzimas que degradan la pared celular, haciendo que se pueda mantener en la planta hasta su total madurez sin pérdida de tersura, y dando como resultado mercantil un tomate tipo "long shelf life". Este es un buen ejemplo de transgenia aplicada al consumidor. Ningún producto transgénico distinto a éste se ha comercializado hasta ahora, dando quizá la razón a nuestro esquema.

¿QUE ES UNA PLANTA TRANSGENICA?

Una planta transgénica es aquella que contiene un ADN foráneo en su genoma. El ADN exógeno, que se ha introducido artificialmente mediante técnicas de ingeniería genética, debe ser capaz de transmitirse a través de la línea germinal de la planta. Esto supone la incorporación del ADN exógeno en el material hereditario nuclear, para lo cual hay que tener siempre pruebas positivas de transformación integradora, no basta con simples indicios de que el gen está en la planta, sino que se requieren conjuntamente pruebas genéticas, fenotípicas y físicas de dicha integración (Potrykus, 1991).

Sin embargo, se usa también el término transgénico al referirse a una planta que tiene un material genómico heredado establemente, tanto si el material está localizado en el núcleo o no. Un ejemplo de esto sería cuando una planta tiene un gen vírico alterado, independiente del genoma de la planta, pero que se expresa de igual manera. También es posible manipular artificialmente la producción, sobreproducción o supresión de una proteína natural, mediante mutación específica de uno de los mecanismos de control endógeno de los genes. Tal tipo de planta puede no ser "transgénica", pero el resultado final es una línea germinal alterada. En este trabajo nos referiremos fundamentalmente a la primera definición de planta transgénica.

TECNICAS DE TRANSFORMACION GENETICA

La transformación o introducción de un gen foráneo en el genoma de las células vegetales puede hacerse según varias técnicas. Los genes pueden ser

introducidos utilizando un sistema vector o "transferidor genético" natural como es el utilizado por la bacteria del suelo *Agrobacterium*, o introduciendo el ADN "desnudo", a través de una serie de métodos, directamente en la célula vegetal. Sólo aquellas técnicas que han sido aplicadas con éxito hasta ahora serán objeto de una breve revisión aquí:

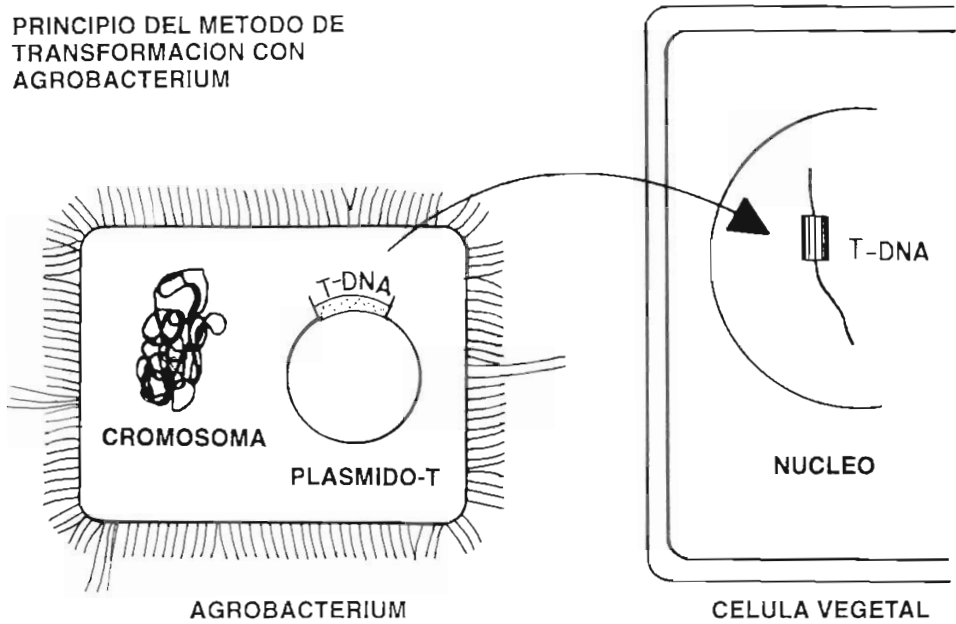
Transformación con *Agrobacterium*:

Agrobacterium tumefaciens y *Agrobacterium rhizogenes* son ambos patógenos vegetales que transfieren ADN a las células vegetales mediante un mecanismo que lo incorpora activamente dentro de los cromosomas del huésped (ver Ilustración nº 1). En el sistema natural, las especies de *Agrobacterium* explotan este sistema para introducir genes que causan crecimiento incontrolado de las células vegetales formando tumores (*A. tumefaciens*) o "raíces pelosas" (*A. rhizogenes*), y genes que codifican para la producción de opinas, análogos de aminoácidos que la bacteria utiliza a continuación para su nutrición (Klee et al., 1987). Este sistema ha sido modificado de tal forma que los genes oncogénicos (que provocan el crecimiento anormal) y los genes de las opinas han sido eliminados y pueden ser reemplazados por genes "foráneos". Estos genes exógenos suelen contener un gen marcador de selección, p.e. resistencia a un antibiótico, para poder seleccionar a partir de las células transformadas, y uno o más genes que codifican un rasgo agronómico interesante, tal como resistencia a enfermedades. La transformación con *A. tumefaciens* se usa con explantes ("método del disco foliar" de Horsch et al, 1985), aparte de otros métodos menos usuales. *A. rhizogenes* se aplica en especies que pueden ser regeneradas a partir de raíces o puede ser interesante obtener cultivos transgénicos de raíces para la producción de metabolitos secundarios.

Transferencia genética directa:

Un método alternativo de transferir un gen es la introducción directa de las moléculas de ADN que contengan los genes vegetales dentro de la célula. El método más común es la incubación de protoplastos (células vegetales a las que se les ha quitado la pared celulósica) con ADN. La toma del ADN por el protoplasto es facilitada por tratamiento químico (Davey et al, 1989), o por la aplicación de impulsos eléctricos (electroporación; véase una revisión por Joerbo & Brunstedt, 1991). Se ha conseguido en repetidas ocasiones la transformación de protoplastos en diferentes especies vegetales (véase Tabla 1). Es necesario en estos casos regenerar plantas a partir de protoplastos.

PRINCIPIO DEL METODO DE TRANSFORMACION CON AGROBACTERIUM



Una técnica recientemente desarrollada es el bombardeo de partículas o biolística (Sanford, 1990). Las moléculas de ADN recubren pequeñas (+/- μm) partículas esféricas de oro o tungsteno, que son "disparadas" a las células, usando un "cañón de partículas" o un "acelerador de partículas". Este método es aplicable virtualmente a todo tipo de células, tanto animales como vegetales. Se ha aplicado con éxito en la transformación del maíz (Fromm *et al.*, 1990) y soja (Christou *et al.*, 1990). Hasta ahora, esta técnica no se ha empleado de forma rutinaria para transformar plantas hortícolas.

Todas las técnicas de transferencia directa de genes tienen el inconveniente de que la integración estable del ADN introducido en los cromosomas del huésped es un proceso aún no bien comprendido y tienen una eficiencia muy baja, cuando se comparan con la transformación mediada por *Agrobacterium*, donde el mecanismo preciso de integración del ADN se conoce muy detalladamente.

Hay toda una serie de métodos innovadores de transferencia directa de ADN a las células que no vamos a tratar aquí, pero que van desde el uso de fibras de silicio, electroporación de tejidos intactos, microinyección, electroforesis, sonicación (someter una muestra a ultrasonidos), etc, que están aún en vía pre-experimental (Songstad *et al.*, 1995) y por tanto no cumplen los requisitos de una publicación como la presente.

Conviene subrayar antes de terminar este apartado que los métodos de transferencia genética, como creo que se deja entrever por lo anterior, constituye ya hoy día un arsenal de técnicas en creciente desarrollo, algunas de ellas con cierta solvencia (transferencia por *Agrobacterias* en muchos casos, pero no en todos) y algunas otras que están poniéndose aún a punto.

REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE CELULAS TRANSFORMADAS

Una vez que una célula vegetal ha incorporado el ADN introducido de una manera estable, la segunda tarea que tiene delante el ingeniero genético es la de regenerar una planta fértil y completa a partir de esa única célula transformada. Esto puede ser considerado una tarea meramente de biología celular, pero de cualquier forma es esencial. Se han obtenido al menos algunas plantas regeneradas, a partir de explantes, de todas las especies hortícolas más conocidas, como se expone en la Tabla nº 1. Se debe tener en cuenta al leer esa revisión que el hecho de alcanzar una o unas pocas plantas regeneradas de un genotipo de una especie no es condición suficiente para que el método desarrollado sea aplicable a la transformación: Se requieren eficiencias de regeneración altas y repetibles, porque es necesario contrarrestar el (a veces) bajo rendimiento de la transformación; además el método ha de ser aplicable a un amplio rango de genotipos, si es que se quiere obtener alguna aplicación desde el punto de vista comercial en la mejora.

Tabla nº 1. Situación de regeneración de cultivo de tejidos de las especies hortícolas más importantes.

Familia y especie	Nombre común	Explante	Protop	Ref.
Apiaceae				
<i>Apium graveolens</i>	Apio	Si	No	Browers & Orton (1986)
<i>Daucus carota</i>	Zanahoria	Si	Si	Ammirato(1986)
<i>Foeniculum Vulgare</i>	Hinojo	Si	Si	Miura & Tabata (1986)
Asteraceae				
<i>Cichorium intybus</i>	Achicoria	Si	Si	Schoofs & De Langhe (1988)
<i>Cynara scolymus</i>	Alcachofa	Si	No	Ordas <i>et al.</i> (1990)
<i>Lactuca sativa</i>	Lechuga	Si	Si	Alconero (1988)
Brassicaceae				
<i>Brassica oleracea</i>	Col. coliflor	Si	Si	Walkey & Pink (1988)
<i>Brassica rapa</i>	Col china	Si	Si	Zee & Johnson (1984)
Chenopodiaceae				
<i>Beta vulgaris</i>	Remolacha	(Si)	(No)	Atanassov (1986)
<i>Spinacia oleracea</i>	Espinaca	Si	No	Neskovic & Culafic (1988)
Cucurbitaceae				
<i>Citrullus vulgaris</i>	Sandía	Si	No	Dong & Jia (1991)
<i>Cucumis melo</i>	Melón	Si	Si	Moreno <i>et al.</i> (1986)
<i>Cucumis sativus</i>	Pepino	Si	Si	Punja <i>et al.</i> (1990)
<i>Cucurbita pepo</i>	Calabacín	Si	No	Chee (1991)
Fabaceae				
<i>Cicer arietinum</i>	Garbanzo	Si	No	Hammatt <i>et al.</i> (1986)
<i>Phaseolus vulgaris</i>	Habichuela	Si	No	Hammatt <i>et al.</i> (1986)
<i>Pisum sativum</i>	Guisante	Si	Si	Griga & Novak (1990)
<i>Vicia faba</i>	Haba	Si	No	Hammatt <i>et al.</i> (1986)
Liliaceae				
<i>Allium cepa</i>	Cebolla	Si	No	Novak <i>et al.</i> (1986a, 1986b)
<i>Allium porrum</i>	Puerro	Si	No	"
<i>Allium sativum</i>	Ajo	Si	No	"
<i>Asparagus officinalis</i>	Esparrago	Si	Si	Bui-Dang-Ha & Mackenzie (1973)
Solanaceae				
<i>Capsicum annum</i>	Pimiento	Si	Si	Morrison <i>et al.</i> (1986)
<i>Lycopersicum esculentum</i>	Tomate	Si	Si	Sink & Reynolds (1986)
<i>Solanum melongena</i>	Berengena	Si	Si	Hinata (1986)

Existen dos rutas de regeneración en las plantas. Una es la organogénesis (ver Foto nº 1), es decir, la regeneración mediante la obtención de tallos adventicios, inducida tanto a partir de callo o directamente del explante cultivado, tal como una hoja, hipocotilo o fragmento de cotiledón. Este es el método "clásico" de regeneración aplicado en, p.e., la "transformación de disco de hoja" y es muy eficiente en algunas especies vegetales, especialmente en la familia de las Solanáceas. Los tallos adventicios se hacen crecer y enraizar y producen una planta completa.



Foto 1.- Organogénesis in vitro en medio líquido. La producción de tallitos se hace a partir de la inducción controlada por el balance hormonal.

La segunda ruta es la embriogénesis somática (ver Foto nº 2), en la cual un grupo de células indiferenciadas desarrollan estructuras parecidas a los embriones a través de una secuencia de acontecimientos celulares diferentes de la formación de los embriones verdaderos (o zigóticos). Estos embriones somáticos pueden "germinar" y desarrollarse hasta dar una planta madura. En general, establecer las condiciones correctas para la inducción de embriones somáticos y para su germinación posterior es algo difícil de conseguir, pero una vez que se logra, tales sistemas embriogénicos, p.e., suspensiones celulares embriogénicas, pueden producir miles de plantas regeneradas. No todas las familias vegetales son inducibles mediante embriogénesis somática: los mejores sistemas se han establecido en la zanahoria (*Apiaceae*), y en cambio las Solanáceas parece que prefieren el método de la organogénesis. Las monocotiledóneas son regeneradas exclusivamente mediante embriogénesis somática.

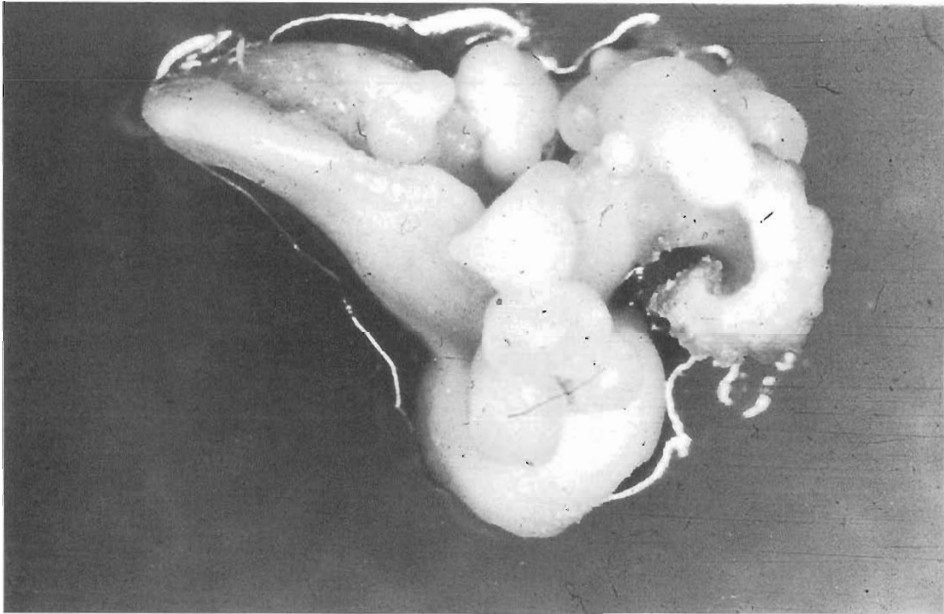


Foto 2.- Embriogénesis somática a partir de las células epidérmicas de cotiledones. Este es un ejemplo de embriogénesis somática "directa", porque no hay una fase de callo intermedia.

En general, la regeneración a partir de protoplastos es más difícil que a partir de explantes o tejido de callo (ver Fotos nº 3 y 4). Se ha demostrado que aproximadamente la mitad de las especies agrícolas más importantes pueden regenerarse a partir de cultivos de protoplastos. Generalmente, las colonias derivadas de protoplastos de las dicotiledóneas son regeneradas mediante organogénesis, pero puede reflejar meramente el hecho de que la regeneración de protoplastos se ha conseguido sólo en especies que regeneran fácilmente mediante organogénesis. Debe hacerse notar que, en general, las eficiencias de regeneración de protoplastos de la mayor parte de las especies cultivadas más importantes son muy bajas todavía.

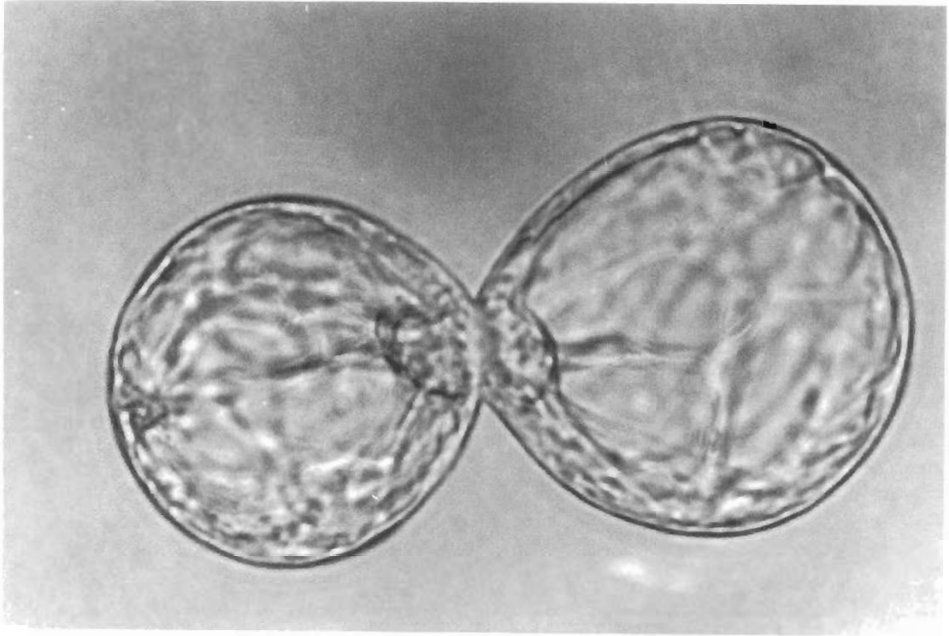


Foto 3.- Protoplastos dividiéndose en medio líquido.

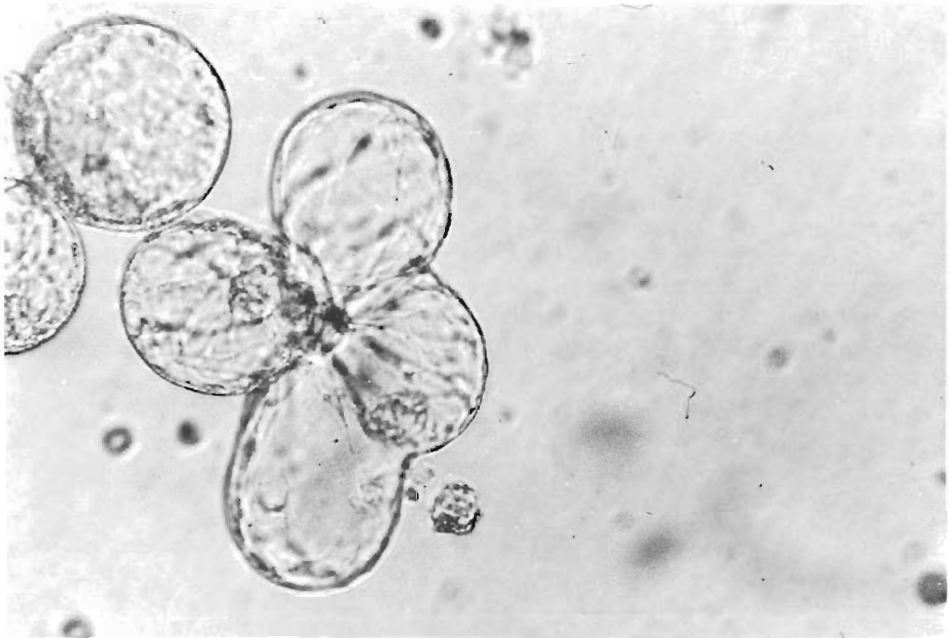


Foto 4.- Los protoplastos, al continuar dividiéndose, forman microcolonias que pueden después ser estimuladas para regenerar plantas.

BREVE DESCRIPCION DE LA SITUACION DE TRANSFORMACION DE ESPECIES ESPECIALMENTE IMPORTANTES EN HORTICULTURA

Daremos una rápida descripción, en primer lugar de los genes (Tabla nº II) que se han introducido hasta ahora en plantas hortícolas (fundamentalmente en tomate, como se explicará posteriormente), así como una lista por familias y especies de los logros en cuanto a transformación efectiva en las fechas en las que se redacta este trabajo, teniendo en cuenta que se han publicado excelentes revisiones hace poco de este tema, como la de Wijbrandi & DeBoth (1993).

TABLA Nº 2. Algunos genes comercialmente interesantes introducidos en tomate y fenotipos conferidos.

Transgen	Rasgo conf.	Especie	Ref.
Poligalacturonasa contrasentido	Fruto resblandecimiento lento	Tomate	Sheehy <i>et al.</i> (1988)
ACC sintasa contrasentido	Madurez retrasada	Tomate	Oeller <i>et al.</i> (1991)
ACC oxidasa contrasentido	Madurez retrasada	Tomate	Hamilton <i>et al.</i> (1990)
Monelina	Proteína sabor dulce	Tomate	Peñarrubia <i>et al.</i> (1992)
Sacarosa-P-sintasa del maiz	Alto rendimiento frutos	Tomate	Micallef <i>et al.</i> (1993)
Acetiltransferasa de Fosfotricin	Resistencia a Glufosinato	Tomate	De Block <i>et al.</i> (1987)
Proteína insecticida del Bt	Resistencia a lepidópteros	Tomate	Perlak <i>et al.</i> (1991)
Proteína kinasa	Resistencia a <i>Pseudomonas syringae</i> pv. tomato	Tomate	Martin <i>et al.</i> (1993)

Familia Apiaceae:

Apio (*Apium graveolens*): Se han obtenido plantas transformadas con *A. tumefaciens*, dando una descendencia con resistencia a kanamicina.

Hinojo (*Foeniculum vulgare*) No se ha publicado ningún ejemplo de transformación, si bien esta planta se comporta muy bien en cultivo de tejidos, como el resto de la familia.

Zanahoria (*Daucus carota*): Es una especie "modelo" para cultivo de tejidos, especialmente en embriogénesis somática como se mencionó anteriormente. Se han obtenido plantas transgénicas en diversas ocasiones.

Familia Asteraceae:

Achicoria (*Cichorium intybus*): Ningún caso de transformación se ha registrado, aunque se puede cultivar *in vitro*.

Alcachofa (*Cynara scolymus*): Ningún caso de transformación se ha registrado. Es una planta "difícil" de cultivar en cultivo de tejidos.

Lechuga (*Lactuca sativa*): Se han publicado diferentes trabajos de regeneración de transformantes en esta especie, tanto a partir de co-cultivo con *A. tumefaciens* como mediante electroporación de protoplastos. Desde el punto de vista comercial, se ha introducido mediante este sistema resistencia al Beet Western Yellow Virus, así como esterilidad nuclear masculina.

Familia Brassicaceae:

Col (*Brassica oleracea*): En general, las coles son especies muy manejables para cultivo de tejidos. Se han logrado diferentes tipos de transformantes, tanto con *A. tumefaciens* como con *A. rhizogenes*, si bien ninguno tiene aspectos agrónomos comercialmente interesantes.

Col china (*Brassica napa*): La regeneración de cultivo de tejidos es posible, aunque transformantes se han obtenido sólo en una ocasión, y si valor comercial.

Familia Chenopodiaceae:

Hay dos especies que pertenecen a esta familia y que tienen importancia hortícola: La espinaca y la remolacha roja. No se ha descrito transformación en ninguna de las dos especies. Por una parte, la regeneración de cultivo de tejidos de remolacha es difícil, aunque hay algunos ejemplos, y en el caso de la espinaca no existen apenas datos.

Familia Cucurbitaceae:

Calabacín (*Cucurbita pepo*): Se han obtenido transformantes con resistencias o tolerancias a tres virus: CMV, ZYMV y WV2 obtenidos mediante el método de *A. tumefaciens*.

Melón (*Cucumis melo*): Se han obtenido transformantes con resistencias a enfermedades y herbicidas, que están para ser probados en campo dentro de poco tiempo.

Pepino (*Cucumis sativus*): El cultivo de tejidos de pepino está relativamente bien estudiado, aunque la regeneración es dependiente del genotipo. Sin embargo, transformantes han tardado mucho, aunque ya hay datos de transformantes con resistencias al virus CMV y al ZYMV. Conviene subrayar que los métodos no están optimizados aún.

Sandía (*Citrullus vulgaris*): Los métodos de cultivo de tejidos están aún por ponerse a punto.

Familia Fabaceae:

Las legumbres, en general, han sido consideradas como especies "recalcitrantes" a cultivo de tejidos, aunque recientemente se han introducido métodos que prometen.

Garbanzo (*Cicer arietinum*): Se han obtenido transformaciones, aunque sólo se han introducido genes marcadores.

Guisante (*Pisum sativum*): Como la mayor parte de las legumbres, sólo se han obtenido respuesta en cultivo de tejidos (y por tanto en transformación) sólo recientemente, por lo que sólo un trabajo ha reportado la obtención de transformantes que dieran lugar a descendencia fértil.

Haba (*Vicia faba*): No se ha obtenido transformación hasta ahora en esta especie.

Habichuela (*Phaseolus vulgaris*): No se han reportado transformantes en esta especie.

Familia Solanaceae

Dos especies de dos géneros de esta familia, *Nicotiana* y *Petunia*, han servido como plantas modelo en biotecnología durante muchos años, porque responden muy bien en cultivo de tejidos. La regeneración de plantas fértiles tanto a partir de explantes como a partir de protoplastos, y transformación genética usando el método del disco de hoja, son muy fáciles y reproducibles, lo que ha llevado a un uso muy extenso de ambas especies. Las técnicas de transformación genética se aplicaron muy pronto a otros miembros de la familia, especialmente a la patata y al tomate. La patata no será estudiada aquí, ya que no es una planta hortícola, aunque es una de las especies más avanzadas en cuanto a la ingeniería genética alcanzada. Igualmente no se estudiará el tabaco, por las mismas razones, aunque habría que subrayar el papel de planta "modelo" de transformaciones genéticas que ha jugado hasta ahora y que seguirá jugando.

Berengena (*Solanum melongena*): Esta especie puede regenerarse fácilmente a partir de explantes y de protoplastos, y hasta ahora sólo se han reportado la introducción de genes marcadores, por lo que posiblemente en un futuro muy próximo se generarán plantas transgénicas con genes importantes.

Pimiento (*Capsicum annum*): El pimiento es una planta muy importante desde el punto de vista agrícola, tanto los pimientos dulces como los chiles y ha atraído considerable atracción en cultivo de tejidos durante muchos años. A pesar de ello, no existe un buen método de regeneración, y los mejores resultados se obtienen con las especies silvestres. Como la infección con *A. tumefaciens* ocurre de manera espontánea, es cuestión de hallar un buen método de regeneración de tejidos para que los transformantes empiecen a aparecer.

Tomate (*Lycopersicon esculentum*): Regeneración a partir de cultivo de tejidos se ha establecido en esta especie desde hace más de veinte años y está muy bien documentada. Fue una de las primeras especies transformadas mediante el método del disco de hoja, ya citado varias veces a lo largo de este trabajo.

Se han introducido ya diferentes genes interesantes para la agricultura, tales como el gen de la toxina de *Bacillus thuringiensis* que otorga resistencia contra

orugas, así como tolerancias al Virus del Mosaico de la Alfalfa y al Tobacco Mosaic Virus.

Otras aplicaciones interesantes que han atraído un considerable interés es la modificación de los genes en la maduración, tanto en la tersura, como en la ruta del etileno.

Se han descrito tomates resistentes a herbicidas (glifosato y glufosinato).

Podemos concluir este apartado refiriéndonos a nuestra introducción, donde se menciona la única planta transgénica que ya ha llegado a los hogares, y que es el tomate.

Familia Liliaceae

Las Liliáceas son una familia que pertenecen al grupo de monocotiledóneas. En general, las monocotiledóneas no son susceptibles a infección con *Agrobacterias* y por tanto, los sistemas de transformación con *Agrobacterium* no son aplicables. Esto parece ser realmente cierto para el caso de la familia *Poaceae* (*Gramineae*) en la que se encuentran los cereales. Sin embargo parece que algunos miembros de las monocotiledóneas son susceptibles a *Agrobacterium*.

Cebolla (*Allium cepa*): Mientras que la obtención de multiplicación mediante el cultivo meristemático es posible, la regeneración a partir de explantes es muy difícil en este género, donde se han estudiado no sólo la cebolla, sino también el cebollino y el ajo.

Parece que la cebolla es susceptible a la infección con *Agrobacterium*, pero no ha habido ningún avance importante en cuanto la posibilidad de transformación.

Espárrago (*Asparagus officinalis*): La regeneración de plantas intactas a partir de explantes y protoplastos se ha obtenido en esta especie. También es posible que sea susceptible a la infección con *A. tumefaciens*, pero aún queda un largo camino por recorrer en esta especie antes de conseguir transformación genética.

¿POR QUE CREAR PLANTAS TRANSGENICAS RESISTENTES A ENFERMEDADES?

Dicho de manera sencilla, el hacer cultivares con genes heredables de resistencia a enfermedades es, por excelencia, el método más proteccionista posible del medio ambiente (Mount & Berman, 1988), ya que reducen enormemente la cantidad de fitosanitarios que se habrían de aplicar para el control de esa enfermedad. También tiene sentido desde el punto de vista económico, pero, quizá las expectativas económicas han hecho que no se haya comercializado hasta ahora ningún producto en esta línea.

Dentro de este apartado nos detendremos con mayor extensión, ya que constituye el objetivo de las investigaciones llevadas a cabo en el C.I.D.H. de Alme-

ría, y en concreto, la resistencia a virus, ya que resistencias a otros patógenos se ven más lejanas en algunos casos (bacterias y hongos) debido a la cantidad de investigación básica que requieren aún, y, otros campos, como son la resistencia a insectos, si bien están conseguidas para algunos de ellos (Lepidópteros y Coleópteros), constituyen una especialidad lejana al autor.

Los virus que infectan las plantas superiores constituyen un grupo numeroso (más de 700 descritos) de patógenos vegetales, de enorme importancia económica y elevado interés científico básico. Una característica destacada de los virus vegetales es que la mayoría de los descritos son pequeños y sencillos y su material genético en su mayoría es ARN (más del 90%), dentro de los cuales la inmensa mayoría presentan el ARN en sentido mensajero.

La quimioterapia ha sido ineficaz en la lucha contra los virus, y, además, las plantas no poseen un sistema inmunológico semejante al que poseen los animales superiores, por lo que no se puede usar la vacunación. Por tanto, la prevención de la enfermedad queda para otros sistemas, como pueden ser la obtención de material libre de virus, o utilización de variedades resistentes como arma de la lucha contra las virosis.

Individualmente consideradas, la mayoría de las especies vegetales son no-huéspedes (es decir, son resistentes) a la mayoría de los virus vegetales. En la mayor parte de los casos no se comprende, y por tanto no se puede manejar, la biología molecular de esta incompatibilidad. Lo mismo ocurre incluso si juega un papel activo en la planta (p.e. un gen dominante de resistencia) en algunos cultivos de una especie susceptible. Por contra, todas las plantas agrícolas son susceptibles de sufrir grandes pérdidas tanto en cantidad como en calidad debidas a uno o más virus. Esta situación es la que ha llevado a las autoridades en cada país a tomar medidas de tipo sanitario: i) Plantar sólo plantas madres de especies perennes que estén certificadas como libres de virus y erradicar las plantas infectadas; ii) adoptar medidas agronómicas que minimicen las epidemias, incluyendo el uso repetido y extenso de fitosanitarios para controlar los vectores de los virus (predominantemente insectos, pero menos cuando son nematodos del suelo u hongos) y quitar los posibles reservorios de las infecciones (malas hierbas o cultivos abandonados); o iii) producir plantas con resistencias naturales contra los virus o sus vectores.

No es este el momento para discutir acerca de la relevancia de la transgenia y si es mejor o peor estrategia que la mejora clásica. Lo cierto es que es un método que tiene éxito en algunos casos y que podría ayudar a erradicar algunas epidemias.

Existen varias estrategias para obtener protección contra virus mediante ingeniería genética, dependiendo de qué tipo de gen se incorpora mediante transformación:

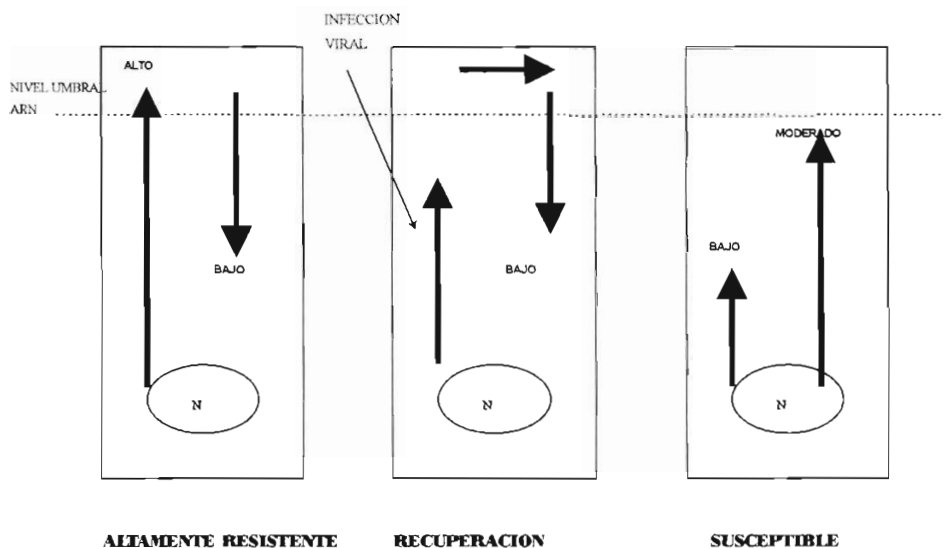
1.-Protección mediada por la proteína de la cápsida:

En los trabajos publicados en inglés se la denomina CMP (Coat Mediated Protection) y proviene de la protección cruzada que es un método ya tradicional

en las medidas sanitarias vegetales, que consiste en que la planta inoculada con una raza débil de un virus es protegida frente a los ataques de las razas virulentas. Este procedimiento es muy laborioso y tiene el riesgo de que la raza débil puede aumentar en virulencia y/o actuar de manera sinérgica con otros virus (Loesch-Fries, 1991). Las técnicas de ingeniería genética (Fraleley, 1991) son capaces de expandir la aplicación de este mecanismo de resistencia mediante la transformación de células vegetales para incluir ADN foráneo que codifique las proteínas de la cápsida viral, de acuerdo también con diferentes estrategias, ya que el gen codificante de la proteína de la cápsida puede ser manipulado antes de ser integrado en el genoma de la planta, dando lugar a diferentes modalidades, tales como genes mutados, genes contrasentido, etc. El mejor logro de este procedimiento es que concede protección frente a virus homólogos al clonado y que se ha integrado en el genoma nuclear de la planta.

Los mecanismos por los cuales "funciona" la CMP no están totalmente aclarados y son objeto de numerosos proyectos de investigación. La Protección mediada por la Cápsida, de forma tradicional se sabe que está involucrada en los primeros eventos del desamblaje de los virus (Wilson, 1993), sin embargo existen también datos que indican un efecto inhibitorio en los eventos tardíos de la replicación de virus, sobre todo cuando el inóculo es ARN viral. Que haya diferentes niveles de interferencias dependerá de la naturaleza precisa de las interacciones virus-planta, incluyendo especificidad celular o tisular, tanto donde se expresa la Proteína de la Cápsida como donde se replica el virus, y en el movimiento de los virus dentro de la planta, tanto en movimiento célula a célula como en el de larga distancia. Además, el rango de protección puede abrirse y proteger otros virus que tengan cierta homología con la proteína de la cápsida del virus insertado (Beachy *et al.*, 1990), aunque en general funciona mejor con los virus o razas más cercanas a la utilizada en el gen insertado. Usando una serie de Tobamovirus, la protección era detectable cuando su Proteína Capsídica era aprox. 60% homóloga con la secuencia de aminoácidos del gen insertado. También se ha dicho que hay una baja, aunque real protección contra otros virus, cuando infectan plantas transgénicas que se han transformado para virus diferentes.

La diversidad de resultados obtenidos en experimentos llevados a cabo con genes de la proteína de la cápsida (CMP), hay que entenderla con las precauciones debidas, ya que hay muchos eventos a nivel molecular en la traducción de los genes integrados que aún no están bien comprendidos. Esta situación se hace aún más complicada cuando se combinan los efectos de un gen integrado en diferentes sentidos o potencial de traducción (p.e. un ARNm que se hace intraducible mediante la introducción de una señal de parada, o un gen de la proteína de la cápsida pero orientado en contrasentido, etc.). Todo esto hay que observarlo también en la relación huésped-virus, cuyas relaciones tampoco están conocidas a fondo. Hay algunos modelos propuestos a nivel de tentativa, y aquí incluimos uno (Smith *et al.*, 1994) (ver Ilustración nº 2), como muestra de la complejidad de este tipo de estudios.



La transcripción de un transgen dentro del núcleo (N) produce diferentes cantidades de ARN dentro de las diferentes líneas transgénicas. Las plantas con altas tasas de transcripción generan niveles de ARN que exceden ciertos niveles umbrales, lo que activa un proceso celular, basado en el citoplasma que señala específicamente a este ARN para su eliminación y resulta en niveles bajos de ARNm del transgen. Si el transgen comparte homología de secuencia con un virus vegetal, las plantas son fenotípicamente resistentes a dicho virus (Izquierda). Alternativamente, en las líneas en las que las tasas de transcripción son más bajas y no se excede el nivel umbral, el posible mecanismo citoplásmico de degradación no se induce. Los niveles estacionarios de ARNm serán proporcionales a la tasa de transcripción del gen. El sistema citoplásmico regulatorio no es funcional y un fenotipo susceptible será el resultado (Derecha). La resistencia "inducible" da lugar a un fenotipo "recuperable" (Centro). Esto tiene lugar cuando la adición del ARNm del transgen y del ARN viral que contiene homología de secuencias exceden entre las dos el nivel umbral, lo que se manifiesta en la bajada del nivel de ARNm del transgen y el establecimiento concomitante de un fenotipo resistente.

La lista de virus que pueden ser controlados mediante este método alcanza el año 1994 los siguientes: AMV (Alfalfa Mosaic Virus), PRSV (Papaya Ringspot Virus), PLRV (Potato Leaf Roll Virus), CMV (Cucumber Mosaic Virus), PVS (Potato Virus S), PVX (Potato Virus X), PVY (Potato Virus Y), SbMV (Soybean Mosaic Virus), TEV (Tobacco Etch Virus), TMV (Tobacco Mosaic Virus), TRV (Tobacco Rattle Virus), ToMV (Tomato Mosaic Virus) y TSWV (Tomato Spotted Wilt Virus) (Raman & Altman, 1994).

2.- Expresión transgénica de genes de proteínas virales no estructurales:

Aunque los genomas víricos suelen ser pequeños, el número de genes que albergan es variable, por lo que la generalización que era posible en el apartado

anterior, aquí se reducirá a algunos casos concretos en torno al gen de la replicasa, por ser el mejor estudiado hasta ahora.

De los ejemplos más interesantes en esta línea de estudio, debemos destacar en primer lugar el registrado por Golemboski *et al.* (1990), donde, estudiando el papel de un gen putativo del complejo del enzima replicasa del TMV (Tobacco Mosaic Virus) de tamaño de 54 kD, encontraron que al construir plantas de tabaco transgénicas con este gen, codificante de un componente de ese complejo, y al infectar esas plantas transgénicas con virus de la raza U1, así como con ARN desnudo del virus de la misma raza, esas plantas fueron resistentes a la infección. Las plantas transformadas tenían un número variable de copias de dicho gen, aunque todas se comportaron como resistentes frente a la raza homóloga. No se encontró ninguna proteína que produjera esa planta del tamaño esperado, aunque sí acumulaban un transcrito de ARN del tamaño previsto. La única explicación que dieron los autores del estudio anterior para explicar porqué esas plantas transgénicas eran protegidas frente a la infección, era una hipótesis de competitividad entre dicho gen y el complejo de replicación, aunque no es posible hallar ninguna prueba experimental hasta ahora.

En conexión con el experimento anterior, cuando Donson *et al.* (1993), transformaron plantas de tabaco con el gen completo de la replicasa del TMV, que tiene un tamaño de 183 kD, encontraron que la mayoría de las plantas fueron susceptibles a la infección con el virus, pero hubo una serie de plantas que fueron transformadas con (teóricamente) el mismo gen que presentaron una resistencia total frente al virus. Al secuenciar el gen insertado encontraron que había un elemento transponible que había sido insertado en el gen, seguramente durante la construcción del plásmido en la bacteria, y que hacía que la lectura del gen se detuviera en un momento determinado y no produjera el transcrito completo de ARN. Estas plantas no sólo se comportaron como resistentes frente a infección con TMV, sino con otros Tobamovirus.

En general, los estudios realizados hasta ahora con plantas transgénicas que codifican el gen de la replicasa, dan tres tipos de resultados: a) El primero son aquellas plantas que tienen el gen de la replicasa insertado en forma funcional y todas son susceptibles a los virus. b) Un segundo grupo lo constituyen aquellas plantas con insertos del gen de la replicasa en forma defectuosa y que dan fenotipos altamente resistentes a la infección y c) Un grupo de transformantes con insertos de genes de la replicasa "incompletos", como puede ser el caso citado más arriba de Golemboski *et al.* (1990), y que dan también resistencia frente a IZ.

Aunque se han aventurado varias explicaciones para este fenómeno de resistencia, la verdad es que está aún muy obscura la razón de dicha protección, siendo la única prueba fehaciente hasta la fecha que existe una reducción en la tasa de replicación viral dentro de esas plantas transgénicas, ya que la infección tiene lugar en esas plantas, aunque nunca llega a hacerse sistémica, dando pie a la especulación de que sea posiblemente un mecanismo de "umbral" de virus dentro de la planta y que sean defectuosos de alguna manera, lo que impide la infección sistémica.

Esta aproximación a la protección frente a la infección viral es una vía muy prometedora y que posiblemente de resultados al menos tan interesantes como los ya mencionados mediante el de CMP.

3.- Otras estrategias:

Se han efectuado también una serie de estudios sobre la posible resistencia otorgada por la inserción de copias en ADN de ARN satélites y de DI (Defectivos interfirientes), ambos tipos de moléculas se encuentran de forma natural en plantas infectadas con algunos virus y la mayor parte de estos presentan variación en los síntomas, siendo algunos atenuadores de síntomas, y otros, en cambio, acentúan la enfermedad. También tienen en común que interfieren de alguna forma en la replicación de los virus a los que acompañan.

Los resultados concretos de ambos tipos de moléculas en transgenia aún requieren un largo período experimental, aunque sin duda, podrán ayudar a encontrar alternativas a las resistencias en algunos casos.

Dentro de este apartado deberían citarse los intentos llevados a cabo de introducir los genes de los anticuerpos de ratón o conejo producidos contra los virus en la planta, así como otras estrategias como son los ARN en contrasentido y las ribozimas, que aún están muy lejos de otorgar protección efectiva en las experiencias realizadas hasta ahora. Para una revisión de los anticuerpos insertados en plantas, ver Conrad & Fiedler (1994).

El papel que podrían jugar los ARN contrasentido en la protección de las plantas aún está lejos de poder llevarse a cabo de manera sistemática, si bien parece que en virus animales podrían ser un vehículo interesante para curar determinadas virosis importantes tales como la producida por el VIH (Agrawal, 1992).

ENSAYOS DE CAMPO DE PLANTAS TRANSGÉNICAS

Hemos descrito en las páginas anteriores ejemplos de investigaciones sobre plantas realizados en laboratorios de investigación, pero la industria de la producción de semillas siempre busca el rendimiento, por lo que en cuanto un sistema de transformación tiene éxito y se puede aplicar a alguna planta con interés económico, enseguida se tiende a efectuar ensayos de campo en los que evaluar los rasgos genéticos modificados mediante transgenia.

Desde un punto de vista de diseño experimental, esos ensayos no difieren de cualquier otro "screening" genético para uno o varios rasgos fenotípicos, pero lo que añade la transgenia a dichos ensayos son las necesidades de cumplimentar una serie de requisitos legales, que en Europa (en los países pertenecientes a la EU) han de seguir las normativas del Decreto EEC 220/90, sobre liberación intencional de Organismos Modificados Genéticamente, y que son una aplicación de las Regulaciones que la Administración de Estados Unidos puso en marcha

cinco años antes. En definitiva, dicha regulación hace que los ensayos de campo de plantas transgénicas:

- a) Sean supervisados y manejados por personal experto.
- b) Hay obligación de hacer público el cultivo de estas plantas, así como el sitio, duración, etc.
- c) Hace necesario identificar el posible daño ambiental, si lo hubiera.

Y después de diez años de experiencia en ensayos de campo en Estados Unidos, las normativas americanas han rebajado los requisitos a una serie de notificaciones administrativas, mientras que en los países del ámbito de la UE continúan con una serie de exigencias que hacen más restrictivos dichos ensayos.

¿Qué peligro potencial alberga el ensayo de campo de plantas transgénicas?

Parece que el más señalado es el de la adquisición no intencional de los genes foráneos por parte de plantas silvestres o agrícolas que sean compatibles, desde un punto de vista de fertilidad, con las transgénicas.

Por ejemplo, en un ensayo de patatas transgénicas (Skogsmyr, 1994) se encontró que los genes marcadores (resistencia a antibióticos y marcador histológico) se encontraban con más abundancia en las plantas sembradas en las cercanías de las transgénicas, que en las más alejadas, aunque persistía un porcentaje constante en todo el ensayo.

Este asunto nos lleva a considerar un aspecto biológico más general como es el denominado “flujo horizontal de genes” que ocurre en toda comunidad de seres vivos. Es indudable que las transferencias naturales vía pólen son muy difíciles de evaluar en condiciones de campo, por lo que este aspecto debería tenerse en cuenta a la hora de estos ensayos, sobre todo a la hora de mantener la “propiedad” de los genes transferidos a las plantas y del asesoramiento del potencial impacto ambiental, y es que, p.e., la alta capacidad de hibridación interespecífica en algún grupo vegetal debería tenerse en cuenta a la hora de establecer estos ensayos. El riesgo se minimiza si el género taxonómico en que se ha hecho la transgenia no es originario del sitio del ensayo, como puede ser el caso del tomate o la patata en Europa. En estos casos la posibilidad de “escape” de genes es mínima si se siguen las precauciones agrícolas. El riesgo se vuelve máximo cuando se establecen transgenias en grupos taxonómicos originarios de la misma zona, o cuando es un grupo de distribución universal.

Queda, no obstante, evaluar los posibles riesgos de los genes “en sí mismos” considerados. Los genes que suelen incorporarse a las plantas transgénicas son:

- Genes marcadores de selección mediante resistencia a antibióticos o herbicidas (el más popular es el que porta el plásmido binario pBI121 (Jefferson, 1987), denominado *nptII* que da resistencia al antibiótico Kanamicina, aunque hay otros semejantes).
- Genes marcadores de localización histológica, siendo el más usado, de nuevo el del pBI121 (Jefferson, 1987), denominado *GUS*, que permite la produc-

ción de un enzima que proviene de *Escherichia coli* y que mediante la adición del sustrato conveniente, permite la visualización mediante color.

-El gen introducido como rasgo deseado, y que puede ser muy variable (cápsida vírica, enzima, etc).

Hoy día, la tendencia en las técnicas de transformación genética es la de intentar dejar "fuera" de la planta estos genes que pudieran convertirse en un cierto riesgo al no saber qué comportamiento tendrían fuera del laboratorio. No obstante, estas técnicas hacen que la transformación se convierta en algo mucho más laborioso de lo que por sí ya es una tarea muy compleja. Sin embargo, el futuro producto comercial lo requiere.

BIBLIOGRAFIA

AGRAWAL, S. (1992). Antisense oligonucleotides as antiviral agents. TIBTECH, 10: 152-158.

ALCONERO, R. (1988). Lettuce (*Lactuca sativa*, L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 6:Crops II. Springer. Berlin, pp: 351-369.

AMMIRATO, P.V. (1986). Carrot. En: D.A. Evans, W.R. Sharp and P.V. Ammirato (ed.). Handbook of plant cell culture, Vol. 4. McMillan, New York, pp: 457-499.

ATANASSOV, A.I. (1986). Sugar beet (*Beta vulgaris* L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2:Crops I. Springer, Berlin, pp: 462-470.

BEACHY, R.N.; LOESCH-FRIES, S; TUMER, N.E. (1990). Coat protein mediated resistance against virus infection. A. Rev. Phytopathology. 28: 451-474.

BROWERS, M.A. & ORTON, T.J. (1986). Celery (*Apium graveolens* L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 2: Crops I. Springer, Berlin, pp: 405-420.

BUI-DANG-HA, D. & MACKENZIE, I.A. (1973). The division of protoplasts from *Asparagus officinalis* L. and their growth and differentiation. Protoplasma, 78: 215-221.

CONRAD, U. & U. FIEDLER (1994). Expression of engineered antibodies in plant cells. Plant Mol. Biol. 26: 1023-1030.

CHEE, P.P. (1991). Somatic embryogenesis and plant regeneration of squash *Cucurbita pepo* L. cv. YC 60. Plant Cell Rep., 9: 620-622.

CHRISTOU, P.; McCABE, D.E.; MARTINELL, B.J.; SWAIN, W.F. (1990). Soybean genetic engineering - commercial production of transgenic plants. TIBTECH, 8: 145-151.

DAVEY, M.R.; RECH, E.L.; MULLIGAN, B.J. (1989). Direct DNA transfer to plant cells. Plant Mol. Biol. 13: 273-285.

De BLOCK, M.; BOTTERMAN, J.; VANDEWIELE, M.; DOCKX, J.; THOEN, C.; GOSSELE, V.; RAO MOVVA, N.; THOMPSON, C.; VAN MONTAGU, M.; LEEMANS, J. (1987). Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. EMBO J 6: 2513-2518.

DONG, J.-Z. & JIA, S.-R. (1991). High efficiency plant regeneration from cotyledon of watermelon (*Citrullus vulgaris* Schrad.). Plant Cell Rep., 9: 559-562.

DONSON, J.; KEARNEY, C.M.; TURPEN, T.H.; KHAN, I.A.; KURATH, G.; TURPEN, A.M.; JONES, G.E.; DAWSON, W.O.; LEWANDOWSKI, D.J. (1993). Broad resistance to Tobamoviruses is mediated by a modified Tobacco Mosaic Virus replicase transgene. Molecular Plant-Microbe Interact. 6: 635-642.

FAO (1991). FAO yearbook, vol. 44: Production 1990. FAO. Rome.

FRALEY, R.T.(1991) Genetic Engineering in Crop Agriculture. Commissioned background paper prepared for Office of Technology Assessment. Washington. DC.

FROMM, M.E.; MORRISH, F.; ARMSTRONG, C.; WILLIAMS, R.; THOMAS, J.; KLEIN, T.M. (1990). Inheritance and expression of chimeric genes in the progeny of transgenic maize plants. *Biotechnology*, 8: 833-839.

GOLEMBOSKI, D.B.; LOMONOSSOFF, G.P.; ZAITLIN, M. (1990). Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87: 6311-6315.

GRIGA, M. & NOVAK, F.J. (1990). Pea (*Pisum sativum* L.) . En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 10: Legumes and Oilseed Crops I. Springer, Berlin, pp: 65-99.

HAMMATT, N.; GHOSE, T.K.; DAVEY, M.R. (1986). Regeneration in Legumes. En: I.K. Vasil (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 3. Academic Press, Orlando, FL, pp: 67-95.

HAMILTON, A.J.; LYCETT, G.W.; GRIERSON, D. (1990). Antisense gene that inhibit synthesis of the hormone ethylene in transgenic plants. *Nature* 346: 284-287.

HINATA, K. (1986). Egg Plant (*Solanum melongena* L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 2:Crops I. Springer, Berlin, pp: 363-370.

HORSCH, R.B.; FRY, J.E.; HOFFMANN, N.L.; EICHHOLTZ, D.; ROGERS, S.G. & FRALEY, R.T. (1985) A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*. 227: 1229-1231.

JEFFERSON, R.A. (1987). Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rpt.* 5: 387-405.

JOERSBO, M. & BRUNSTEDT, J. (1991). Electroporation; Mechanism and transient expression, stable transformation and biological effects in plant protoplasts. *Physiol. Plant.* 81: 256-264.

KLEE, H.; HORSCH, R.; ROGERS, S. (1987) Agrobacterium-mediated plant transformation and its further application to plant biology. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 38: 467-486.

LOESCH-FRIES, S. (1991) Genetic Modification for Disease Resistance. Commissioned background paper fro the Office of Technology Assessment. Washington DC.

MARTIN, G.B.;BROMMONSCHENKEL, S.H.; CHUNWONGSE, J.; FRARY, A.; GANAL, M.W.;SPIVEY, R.; WU, T.; EARLE, E.D.; TANSKLEY, S.D. (1993). Map-based cloning of a protein kinase gene conferring disease resistance in tomato.*Science* 262: 1432-1436.

MICALLEF, B.J.;ROH, K-S.; SHARKEY, T.D. (1993). Altering photosynthetic performance in plants by genetically manipulating sucrose biosynthesis. *Plant Physiol. Sppl.* 102: 32.

MIURA,Y. & TABATA, M. (1986). Direct somatic embryogenesis from protoplasts of *Foeniculum vulgare*. *Plant Cell Rep.*, 5: 310-313.

MORENO, V.;ZUBELDIA, L.; GARCIA-SORGO, B.; NUEZ, F. ROIG, L.A. (1986).Somatic embryogenesis in protoplast-derived cells of *Cucumis melo* L. En: W. Horn, C.J. Jensen, W. Odenbach and O. Schieder (eds.), *Genetic manipulation in Plant Breeding*, Proc. Int. Symp. *EUCARPIA, 8-13 Sept 1985, Berlin, Walter de Gruyter, Berlin*, pp: 491-493.

MORRISON, R.A.; KONING, R.E.; EVANS, D.A. (1986). Pepper. En: D.A. Evans, W.R. Sharp & P.V. Ammirato (eds.), *Handbook of plant cell culture*, vol.4, Macmillan, New York, pp: 552-573.

MOUNT, M.S. & BERMAN, P.M. (1988). Biotechnology and plant disease control: Helping nature to help itself., p. 39-43. In:S. Engelstad, W.M. Coli, and J.L. Carlson (eds.) *Innovations in pest management. Proc. Integrated Pest Management and Biological Con-*

trols. Massachusetts Dept. of Food and Agriculture, Sturbridge.

NESKOVIC, M. & CULAFIC, L. (1988). Spinach (*Spinacia oleracea* L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 6: Crops II, Springer, Berlin, pp: 370-385.

NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. (1986a). *Allium*. En: D.A. Evans, W.R. Sharp & P.V. Ammirato (eds.), *Handbook of plant Cell culture*, vol. 4, MacMillan, New York, pp: 419-456.

NOVAK, F.J.; HAVEL, L.; DOLEZEL, J. (1986b). Onion, garlic and leek (*Allium* species). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 2: Crops I, Springer, Berlin, pp: 387-404.

OELLER, P.W.; MIN-WONG, L.; TAYLOR, L.P.; PIKE, D.A.; THEOLOGIS, A. (1991). Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA. *Science* 254: 437-439.

ORDAS, R.J.; TAVAZZA, R.; ANCORA, G. (1990). In vitro morphogenesis in the globe artichoke (*Cynara scolymus* L.). *Plant Sci.* 71: 233-237.

PEÑARRUBIA, L.; KIM, R.; GIOVANNONI, J.; KIM, S.-H.; FISCHER, R.L. (1992) Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/Technology* 10: 561-564.

PERLAK, F.J.; FUCHS, R.L.; DEAN, D.A.; McPHERSON, S.L.; FISCHHOFF, D.A. (1991). Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88: 3324-3328.

POTRYKUS, I. (1991). Gene transfer to plants: Assessment of published approaches and results. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 42: 205-225.

PUNJA, Z.K.; TANG, F.A.; SARMENTO, G.G. (1990). Isolation, culture and plantlet regeneration from cotyledon and mesophyll protoplasts of two pickling cucumber (*Cucumis sativus* L.) genotypes. *Plant Cell Rep.*, 9: 61-64.

RAMAN, K.V. & ALTMAN, D.W. (1994). Biotechnology initiative to achieve plant pest and disease resistance. *Crop Protection* 13: 591-596

SANFORD, J.C. (1990). Biolistic plant transformation. *Physiol. Plantarum.* 79: 206-209.

SCHOOFS, J. & DeLANGHR, E. (1988). Chicory (*Cichorium intybus* L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 6: Crops II. Springer, Berlin, pp: 294-321.

SHEEHY, R.E.; KRAMER, M.; HIATT, W.R. (1988). Reduction of polygalacturonase activity in tomato fruit by antisense RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 85: 8805-8809.

SINK, K.C. & REYNOLDS, J.F. (1986). Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 2: Crops I. Springer, Berlin, pp: 319-344.

SKOGSMYR, I. (1994). Gene dispersal from transgenic potatoes to conspecifics: a field trial. *Theor. Appl. Genet.* 88: 770-774.

SONGSTAD, D.D.; SOMERS, D.A.; GRIESBACH, R.J. (1995) Advances in alternative DNA delivery techniques. *Plant Cell, Tissue & Organ Cult.* 40: 1-15.

SMITH, H.A.; SWANEY, S.L.; PARKS, T.D.; WERNSMAN, E.A.; DOUGHERTY, W.G. (1994). Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: Expression, regulation and fate of nonessential RNAs. *The Plant Cell*, 6: 1441-1453.

WALKEY, D.G.A. & PINK, D.A.C. (1988). Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. *gemnifera*) and broccoli (*B. oleracea* var. *italica*). En: Y.P.S. Bajaj (ed.), *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Vol. 6: Crops II. Springer, Berlin, pp: 252-276.

WIJBRANDI, J. & DeBOTH, M.T.J. (1993). Temperate vegetable crops. *Scien. Hort.* 55: 37-44

WILSON, T.M.A. (1993). Strategies to protect crop plants against viruses: Pathogen-derived resistance blossoms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 3134-3141.

P. V. P. 400 Ptas.

