
5. ENGINYERIA GENÈTICA I NOVES ESPÈCIES AGRÍCOLES

Antoni Granell*

Fa uns 12.000 anys, quan el nivell del mar començà a augmentar, a finals de l'últim període glacial, els pobles de l'Orient Mitjà descobriren una nova manera d'obtenir aliments. Consistia en el cultiu i posterior aclimatació de plantes i en la domesticació d'animals. El desenvolupament de l'agricultura a l'Orient Mitjà va ser seguit d'una ràpida expansió cap a Europa, Àsia i Àfrica. En uns milers d'anys, els grups de caçadors-recol·lectors foren substituïts pels poblats, fet que marcà definitivament el nostre esdevenidor. La història més recent de l'home ha estat per tant íntimament lligada a la de les plantes. Així l'expansió de les activitats econòmiques a Europa en l'edat mitjana va estar associada amb l'increment en la utilització de productes de plantes, alguns dels quals, com el pebre, no eren fàcils d'obtenir localment. Al segle XVI, Venècia s'havia convertit en una rica ciutat en part pels beneficis del comerç del pebre. Quan els turcs bloquejaren les rutes del comerç a l'est de la Mediterrània al voltant de l'any 1470, els exploradors portuguesos, italians i espanyols varen haver de cercar rutes alternatives a la de l'est, cosa que va conduir al descobriment de les Amèriques. Resulta interessant comentar que, en l'anàlisi de l'impacte que el descobriment d'Amèrica pogués tenir sobre els animals i plantes del Vell Món, Corsby digué: «Aquesta oscil·lació salvatge del balanç de la natura ocorre sempre que una àrea prèviament aïllada és posada en contacte amb la resta del món. Però possiblement mai tornarà a ocórrer d'una manera tan espectacular com en les Amèriques del

* Institut de Biologia Molecular i Cel·lular de Plantes. València.

primer període postcolombià, no a menys que hi haja un dia, un intercanvi de formes de vida entre planetes». Aquestes paraules foren escrites el 1972, un any després, és a dir, fa solament uns 20 anys, científics dels EUA varen clonar un gen. Deu anys més tard investigadors europeus i americans aconseguiren introduir gens en plantes i crear-ne així de noves. Les implicacions econòmiques i ecològiques d'aquests fets poden ser almenys tan importants com les que ocorregueren com a conseqüència de l'intercanvi colombià.

Si des de fa molts anys d'una manera més o menys científica l'home ha estat cercant parents salvatges (no cultivats) de les plantes que li interessaven, fent encreuaments i seleccionant noves varietats (millora genètica clàssica) que s'adaptaven millor al sòl i clima o que donaven un producte millor, què és el que té de nou aquesta nova manera de millora genètica? Què és el que pretén l'enginyeria genètica de plantes? Quins són els seus objectius i mètodes? Quins són els seus assoliments? Quins problemes ètics i socials planteja? Per a resoldre aquestes preguntes presentarem l'enginyeria genètica de plantes integrant-la dintre de la millora de plantes, junt amb la millora clàssica, i tot seguit descriurem quins són els camps d'aplicació actuals i futurs.

De manera global podríem dir que mentre que a la millora genètica clàssica se li pot atribuir ser la responsable de la meitat dels rendiments de producció de l'agricultura actual, la mecanització, la fertilització i els pesticides —les inversions més importants en agricultura— donarien compte de l'altra meitat. D'alguna manera vol dir que el medi on creixen les plantes ha estat canviat tant com les plantes mateixes (encara que les plantes també han estat seleccionades per respondre bé a aquestes pràctiques). Per diferents raons —econòmiques i mediambientals— resulta molt més interessant poder modificar més dirigidament les plantes que introduir més canvis al medi ambient. Això ara és possible mitjançant les tècniques d'enginyeria genètica.

Quan es tracta d'obtenir espècies cultivades, les tècniques de millora vegetal clàssica han estat tot un èxit, ja que s'ha aconseguit un 1% anual d'increment en la producció (d'algunes espècies) durant els darrers 50 anys. Si hom haguera de dir quins són els dos èxits més importants de la millora genètica clàssica, tot el món estaria d'acord a dir que fou la producció de dacsa híbrida l'any 1930, que quasi va doblar la producció de dacsa i el desenvolupament de les línies de dacsa, arròs i blat, que ocasionaren el que es va anome-

nar «la revolució verda». No obstant això, actualment, la confluència dels mètodes de millora tradicional i de l'enginyeria genètica de plantes està començant a produir plantes amb millors característiques, que permetran unes pràctiques agrícoles menys agressives amb el medi ambient. Tot això està propiciant el que s'ha anomenat «la segona revolució verda». No obstant això, l'entrada de la biotecnologia en la producció d'aliments planteja, com veurem, importants qüestions ètiques i socials.

Quines són les diferències i les coses en comú entre la millora genètica clàssica i l'enginyeria genètica? En què difereixen? En què es complementen? Vegeu la fig. 1.

5.1. MILLORA GENÈTICA CLÀSSICA

Tres han estat fonamentalment les tècniques emprades pels milloradors de plantes en desenvolupar noves varietats i millorar les antigues:

1. La primera és la utilització d'espècies amb capacitat per a autoencreuar-se. L'*autofertilització* condueix després de diverses generacions a una planta homozigòtica —una línia pura— en la qual les «incerteses» han estat eliminades. Aquesta línia pura facilita la formació d'híbrids, ja que és transmesa de manera predictable a la descendència. Una línia pura d'aquestes s'encreua amb una altra per produir una línia parental que té un caràcter millorat. El «vigor híbrid» introdueix una sèrie d'avantatges, tot incloent la uniformitat del cultiu, en cultius com la dacsa, l'arròs, el blat i altres cereals.

2. Una segona tècnica utilitzada clàssicament pels milloradors ha estat alterar el nombre dels conjunts de cromosomes o *ploidia* de la planta. Algunes plantes poden manipular-se de manera que augmente la ploidia (poliploidia). Les millores que normalment s'obtenen són un augment de la mida de la planta, així com dels fruits o de les llavors. Més de la tercera part de les espècies cultivades són poliploïdes (p. e., blat, maduixes, etc.).

3. La tercera tècnica és una forma d'hibridació anomenada *retroencreuament*. Aquesta tècnica s'utilitza per a transferir un tret desitjable d'una soca inferior a una de superior. Si es fertilitza encreuadament una successió de descendents d'un encreuament superior-inferior millorat amb la varietat superior s'obté la línia genètica desitjada. L'última generació del retroencreuament s'autofertilitza

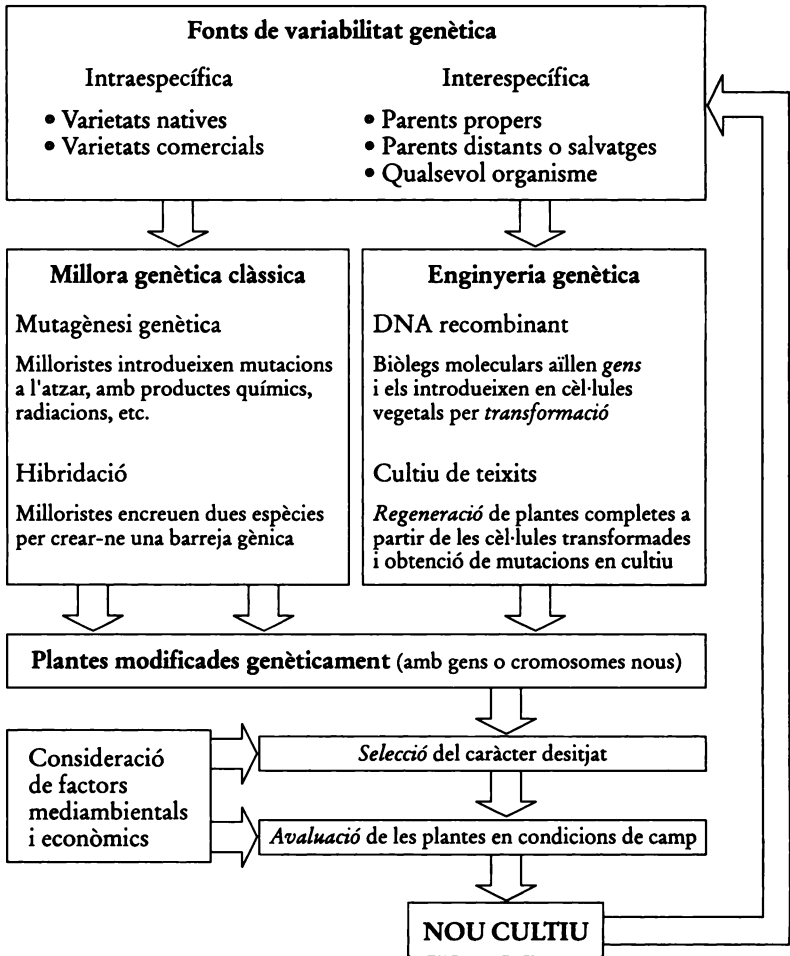


FIGURA 1. L'enginyeria genètica dintre de la millora genètica.

per donar una línia pura, que és portadora pura del caràcter desitjat i és indèntica a la varietat superior en tots els altres aspectes. Cada vegada que es requereixen gens útils de les varietats salvatges originals per a introduir-los en les varietats comercials es fa servir el retroencruament.

5.2. LIMITACIONS I INCONVENIENTS DE LA MILLORA CLÀSSICA

El *plant breeding* tradicional requereix molt temps i espai. El temps requerit per desenvolupar una varietat comercial que incrementa la producció per sols 3 o 4 anys és de 10-20 anys. Tot això per mantenir l'1% anual d'increment en la producció. Pel que fa a l'espai, calen centenars de fanecades perquè creixin milions de plantes completes amb els trets desitjats i així poder-les avaluar.

Un segon inconvenient de la millora genètica clàssica és el fet de ser un procés de prova i error. Com explica Mary Clutter de la National Science Foundation: «Quan es barregen genomes complets d'organismes, tots els gens no desitjables van junt amb el gen en el qual tu estàs interessat». Per exemple la dacsca té uns 250.000 gens, si el tret en el qual estem interessats implica sols 1 o 2 gens, vol dir que hi ha molt per depurar.

La gran limitació de la millora clàssica és que la font de variabilitat genètica emprada pels milloradors clàssics és molt restringida. Els milloradors genètics depenen quasi exclusivament dels ocells i dels insectes —són aquests els que normalment porten a terme la pol·linització en molts cultius— per a crear noves varietats i millorar les antigues. Això vol dir que els gens que controlen un tret desitjable han de buscar-lo en la mateixa espècie o en espècies molt properes (sexualment compatibles). Tècniques més recents permeten fer més àmplia la barrera de fertilitat, però tot i així és impossible entre espècies relativament distants.

5.3. MÈTODES DE L'ENGINYERIA GENÈTICA

El fonament de l'enginyeria genètica és que la major part dels productes i dels fenotips observables es deuen més o menys directament a les proteïnes (*per se* o per la seua acció). Així doncs, el ni-

vell de glucosa en sang depèn, entre altres coses, dels nivells d'insulina (una proteïna). La major part de la insulina que s'administra als malalts de diabetis és obtinguda en reactors per mètodes biotecnològics. Per a fer tal cosa es parteix del fet que la informació per a la síntesi d'insulina està continguda en el DNA (gens per a la insulina). Els científics el que fan és aïllar de la dotació gènica de les cèl·lules els trossos del DNA on està la informació genètica per fer la insulina. Aquests trossos de DNA (gens de la insulina) són inserits per tècniques de biologia molecular en el DNA d'un bacteri (organisme unicel·lular), Açò és el que s'anomena *DNA recombinant*. Aquest bacteri, que té ara el gen de la insulina, pot fer-se créixer, dividir-lo i sintetitzar insulina com si fóra una proteïna del propi bacteri en reactors especials.

L'objectiu fonamental de l'enginyeria genètica de plantes és crear una planta completa que contingui el gen/s d'interès (*planta transgènica* o *planta transformada*). Per a fer tal cosa cal: 1) disposar de vectors (vehicles) adequats per a introduir el gen en la cèl·lula vegetal (és un esdeveniment cel·lular!), 2) disposar de marcadors de selecció que permeten seleccionar sols aquelles cèl·lules que siguen transformades, i 3) disposar de procediments que permeten regenerar plantes a partir d'una o d'unes quantes cèl·lules. No menys important és saber quin/s gen/s volem introduir en la planta.

5.4. SORTIDES QUE PROPORCIONA LA BIOLOGIA MOLECULAR ALS PROBLEMES «CLÀSSICS»

En comparació amb els mètodes clàssics, els mètodes de la biologia molecular són ràpids i requereixen poc espai. El cribratge (*screening*) té lloc normalment en l'àmbit cel·lular on hom pot tenir milions de cèl·lules —cadascuna d'elles és una planta potencialment— en un flascó d'1 litre. Treballant amb la planta completa, hom pot obtenir unes 3 o 4 generacions com a màxim a l'any. Treballant amb bacteris en gens de plantes, l'investigador té noves cèl·lules cada mitja hora.

Els mètodes emprats per l'enginyeria genètica són molt específics: els milloradors clàssics barregen milers de gens quan fan els encreuaments sexuals, en canvi els biòlegs moleculars transfereixen gens únics o en tot cas, sols uns quants. D'altra banda, l'enginyeria genètica posa tota la font de variabilitat genètica a l'abast. L'engi-

nyeria genètica permet, en principi, introduir en les plantes qualsevol gen de qualsevol organisme. Els avantatges d'aquests tres punts es veuen il·lustrats en el següent exemple: imagineu que busqueu un gen que oposi resistència a un pesticida. És molt més fàcil afegir unes quantes gotes de pesticida a milions de bacteris i prendre els gens de resistència dels pocs bacteris que sobreviuen al tractament, que fer el mateix amb milions de plantes.

5.5. *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*: EL PRIMER ENGINYER GENÈTIC DE PLANTES

Durant milions d'anys un bacteri del sòl —*Agrobacterium tumefaciens*— ha estat introduint en la planta hoste informació genètica codificada per ell, per al propi benefici, és a dir, ha estat fent enginyeria genètica molt abans que l'home existira.

El procés desenvolupat pel bacteri és molt complicat i ve a dirnos que és el resultat de milions d'anys de coevolució amb la planta hoste. La transformació genètica que fa l'*Agrobacterium* és un fenomen de transferència de DNA entre regnes. Després de molts estudis sembla que la seqüència d'esdeveniments és la següent: quan algunes cèl·lules de la planta resulten ferides, secreten uns tipus de compostos fenòlics (acetosiringoma, etc.; alguns hom sap que són per tancar la ferida), els quals són reconeguts per receptors específics de la membrana del bacteri. Aquest reconeixement implica una quimiotaxi positiva cap a la cèl·lula vegetal i l'activació d'un seguit de gens del bacteri que estan en la regió *vir* del plasmidi Ti (inductor de tumors). Sis dels gens *vir* (*vir A, B, C, D, E, G*) estan implicats en la producció d'una còpia del DNA que es transfeireix a la cèl·lula vegetal (anomenada T-DNA) i que té gens que induïxen la formació de tumors en la planta. La producció del T-DNA s'inicia amb el reconeixement d'unes seqüències de 25 pb, que estan repetides a cada extrem del DNA transferit, per una endonucleasa (una proteïna que talla el DNA) específica codificada per un gen *vir* i que produeix talls entre la 3a i 4a base de la cadena de baix dels extrems de 25 pb. Després de produir-se els talls es poden detectar T-DNA d'una sola cadena en l'*Agrobacterium*. Els fils (brins) del T-DNA són separats o produïts concomitantment amb el reemplaçament de la fibra de baix i es forma un complex amb proteïnes específiques (*vir*). Finalment el bri del T-DNA és trans-

ferit a la cèl·lula recipient on és integrat al genoma de la planta. Així doncs, podem definir tres etapes: 1) reconeixement de la cèl·lula vegetal, recipient i inducció en el bacteri de la resposta de virulència, 2) formació del bri del T-DNA, i 3) producció del complex de transferència del T-DNA. En totes tres etapes els gens específics del bacteri i les proteïnes corresponents tenen un paper decisiu en el procés de transferència.

El grup de Patricia Zambriski al Departament de Biologia Molecular de Plantes de la Universitat de Califòrnia a Berkeley ha proposat que el mecanisme de transferència del T-DNA combina en un de sol dos mecanismes de transferència de DNA, és a dir, el de la conjugació bacteriana i el de la infecció viral. Així doncs, l'*Agrobacterium* hauria adaptat components dels mecanismes habituals que els bacteris utilitzen perquè els plasmidis es conjuguin entre ells per poder transferir DNA a la planta. Encara més, ha incorporat característiques de la infecció viral, com són penetrar en la membrana nuclear i finalment integrar-se en el genoma de l'hoste. Quin és l'interès de l'*Agrobacterium* en introduir un tros del seu DNA en la cèl·lula vegetal? Per tal de contestar aquesta pregunta cal saber que el fenomen de transformació ocasiona uns tumors en la planta que s'anomenen *tumors de l'agalla en corona*. Aquest teixit neoplàstic pot créixer en cultiu en absència d'hormones i produeix uns compostos anomenats *opines*. Diversos grups, estudiant la bioquímica i la genètica molecular d'aquesta interacció, han pogut determinar que això es deu al producte de la informació genètica transferida pel bacteri a la planta. És a dir, el T-DNA té els gens que codifiquen la informació per a la síntesi d'hormones —la qual cosa provoca la formació del teixit neoplàstic— i la síntesi d'opines —que són específicament catabolitzades pel bacteri, i es crea així un nínxol ecològic per a ell.

Un exemple dels gens que dirigeixen la síntesi d'hormones són els de la síntesi d'auxines i citoquinines, que estan localitzats en la regió del T-DNA que és transferit a la planta durant la transformació. Aquests gens són actius sols en el teixit vegetal transformat i l'excés en la producció d'hormones és el responsable de la formació del tumor. Són els gens *iaaH* i *iaaM*. L'IAA es sintetitza en un procés de dues etapes en el tumor. El producte del gen *iaaM*, el triptòfan monoxigenasa, converteix el triptòfan en indol-3-acetamida (IAAM). Aquest intermediari és després convertit en IAA per la indolactemaida hidrolasa (el producte del gen *iaaH*). El gen *ipt* en

canvi està implicat en la biosíntesi de citoquinines i el seu producte gènic, la isopentenil transferasa (*ipt*), condensa l'isopentenilpirofosfat i l'AMP per tal de produir isopentenilAMP (iPMP). L'iPMP és ràpidament convertit en la planta en un seguit de citoquinines biològicament actives. Hi ha altres gens dintre del T-DNA menys coneguts però que també alteren la morfologia de la planta i que segurament contribueixen a la formació del tumor.

5.6. L'HOME DESPRÈN DE L'AGROBACTERIUM EL DISSENY DE VECTORS PER A LA TRANSFORMACIÓ GENÈTICA DE PLANTES

Els genètics i biòlegs moleculars han definit quins són els elements necessaris suficients perquè es done la transferència del T-DNA i han propiciat així el naixement de l'enginyeria genètica de plantes. Els primers resultats en aquest sentit van ser presentats al Winter Symposium de Genètica Molecular de Plantes i Animals el 1983, és a dir, fa ara 10 anys. En aquesta reunió investigadors dirigits per Marc van Montagu i Jeff Schell de la Universitat de Gent a Bèlgica i Rob Fraley de la Monsanto Co. (St. Louis, Missouri), varen presentar independentment els resultats de «desarmar» el plasmidi Ti de l'*Agrobacterium*. «Desarmar» vol dir eliminar del T-DNA aquells gens que són responsables de la síntesi d'hormones i que són els que causen el creixement neoplàstic, al temps que deixen intacta la resta del mecanisme de transferència del T-DNA. Després substituïren els gens que causaven els tumors per altres que volien introduir en la planta. Com que havien estat eliminats els gens tumorals, aquests grups pogueren regenerar plantes transgèniques (amb un gen aliè) completes, però d'altra banda normals i fèrtils.

Posteriorment aquests dos grups i el de Mary Dell Chilton de la Universitat de Washington a St. Louis (Missouri), també simultàniament aconseguiren introduir un gen de resistència a antibiòtics d'un bacteri i el col·locaren sota el control de regions reguladores aïllades dels gens del T-DNA de l'*Agrobacterium*. Açò va permetre obtenir cèl·lules i després plantes de tabac resistents a l'antibiòtic kanamicina. Aquests dos resultats han estat clau per poder introduir gens aliens en plantes, ja que vol dir no sols que el DNA aliè transportat per vectors «desarmats» és incorporat establement

en el patrimoni genètic de la planta, sinó que a més, el gen pot ser expressat com un gen més de la planta, i quan es tracta d'un gen de resistència a un antibiòtic pot utilitzar-se com a marcador de selecció. La utilització d'un marcador de selecció permet aïllar de la resta de cèl·lules no transformades aquella que ha rebut el T-DNA. Actualment hom disposa d'una bateria de marcadors de selecció: normalment són gens que inactiven antibiòtics o herbicides, ambdues substàncies tòxiques per a la cèl·lula no transformada.

Avui en dia existeixen, als laboratoris de tot arreu del món, diversos sistemes de transformació mitjançats per l'*Agrobacterium*, tots ells utilitzen plasmidis desarmats i un marcador de selecció, a més del gen que hom vol introduir en la planta. Aquests sistemes han permès la transformació d'un gran nombre de dicotiledònies i fan possible la biotecnologia de plantes. Així, si bé els primers treballs es centraven en el tabac, la petúnia i la tomata, durant els darrers 10 anys la llista s'ha ampliat fins a la vora de 40 cultius.

5.7. TRANSFORMACIÓ DE MONOCOTS: TRENCAR LA BARRERA AMB LA PISTOLA DE GENS

Tot i que la transformació genètica mitjançada per l'*Agrobacterium* resulta bastant eficaç en un gran nombre de dicotiledònies, no ha estat possible utilitzar-la amb èxit en els cultius dels cereals més importants, com són la dacsà, l'arròs i el blat. Si bé no es sap quina és la raó per la qual açò ocorre, sí ha estat possible trobar un procés alternatiu. L'impediment principal a l'entrada del DNA és la paret i la membrana cel·lular i nuclear, que a més, en la interacció amb l'*Agrobacterium* té un paper molt important. L'equip de John Sanford al Departament d'Horticultura de la Universitat de Cornell, desenvolupà un sistema: la pistola de partícules (*particle gun*), que ha demostrat que pot ser utilitzada com a mecanisme universal de transport de substàncies dins de qualsevol cèl·lula viva. Aquests autors dissenyaren i construïren un aparell que permet accelerar xicotetes partícules de tungstè (o d'or) des d'1 fins a 4 μm de diàmetre a velocitats de l'ordre de 50.000 m/s. Les partícules així accelerades podien travessar la paret i les membranes i entrar dintre de les cèl·lules de manera no letal, fins i tot cents i/o milers de partícules per cèl·lula! Posteriorment, el mètode es va aplicar per introduir DNA dintre de les cèl·lules (coprecipitant primerament el DNA

amb les partícules de tungstè o d'or). En un nombre variable aquest DNA era transcrit i traduït, i amb poca eficàcia incorporat al genoma. Utilitzant aquest procediment i marcadors de selecció sobre teixits meristemàtics (i fins i tot no meristemàtics), diversos grups aconseguiren transformar i regenerar plantes completes d'arròs (1988), dacsa (1990) i blat (1992). D'aquesta manera els 4 cultius més importants són ja susceptibles de transformació genètica!

Disposem així del mètode, però quin lloc ocupa verdaderament l'enginyeria genètica dintre de la millora vegetal? Com hem dit abans l'enginyeria genètica de plantes és una tecnologia que té tan sols 10 anys, mentre que el procés al qual s'incorpora, la millora genètica, té més de 10.000 anys. En qualsevol cas hi ha un llarg camí per recórrer des del descobriment al laboratori de biotecnologia fins al temps en què es puga arregar el producte al camp. Sembla bastant clar que l'enginyeria genètica no reemplaçarà la millora genètica clàssica, sinó que serà una branca i una ajuda important. Després de tot cada planta que siga obtinguda per enginyeria genètica haurà de ser assajada sota condicions de camp abans de ser posada en circulació.

L'objectiu del biòleg molecular de plantes es trobar i inserir gens beneficiosos —obtinguts de qualsevol organisme— dintre del patrimoni genètic de les plantes cultivades per tal de millorar-les. Açò implica 3 etapes crítiques:

1. Obtenir el gen aliè i integrar-lo establement en el cromosoma d'una cèl·lula de la planta cultivada que hom vol millorar.
2. Fer que aquesta cèl·lula transformada regenere, en un sistema de cultiu de teixits, una planta sana i fèrtil, que tinga el gen en totes les seues cèl·lules.
3. Fer que s'expressi el gen aliè en el moment i lloc que interese i que l'expressió del gen tinga el caràcter desitjat —per exemple la resistència a una malaltia.

5.8. LÍNIES DE MILLORA EN ELS CULTIUS

Quines són les línies fonamentals de millora que els milloristes intenten introduir en els cultius? Tradicionalment han estat les orientades a incrementar la producció: cercar i introduir gens que oposen resistència a alguna malaltia (5-15 % de pèrdues per aquest factor), resistència a pestes (milers de milions de kg de pesticides

químics són utilitzats anualment), resistència a pesticides i herbicides (aquests també poden matar o debilitar certs cultius), capacitat de fixar nitrogen (milions de Tm de fertilitzant nitrogenat són utilitzats anualment), tolerància a l'estrès (sequera, gelades, salinitat, materials tòxics: provoquen fins al 80 % de les pèrdues anuals). Òbviament l'interès de l'enginyeria genètica està també orientada en aquestes direccions. Tanmateix com que no hi ha restriccions quant a l'origen dels gens que es poden introduir en plantes es plantegen importants qüestions de natura ètica i social. A continuació repassem breument el que s'ha fet fins ara i cap on van orientades les investigacions.

5.8.1. *Millores agronòmiques*

Les primeres plantes desenvolupades amb una orientació pràctica de millora han estat dirigides cap a prosperar el seu comportament agronòmic. El fet de ser un tret que depèn d'un sol gen i que el mercat d'herbicides siga de 6 bilions de \$ ha provocat que desenvolupar plantes resistents als herbicides fóra un dels primers objectius. *Crear cultius tolerants a certs herbicides* és una manera de col·locar el millor herbicida respecte d'altres en el món competitiu dels fabricants d'herbicides. A més, fer cultius resistents a certs herbicides es pot vendre como una manera de controlar millor les males herbes, ja que permetria utilitzar herbicides d'ampli espectre, baixa toxicitat i ràpida biodegradació.

S'han desenvolupat distints tipus de resistència. En alguns casos la resistència es deu a una mutació en la proteïna amb la qual interaccionava l'herbicida, o bé a un augment en la concentració d'aquella, de manera que es fa necessària una major quantitat d'herbicida per a ser-li nociu. En altres casos la resistència es deu a l'existència d'un enzim que catalitza la inactivació de l'herbicida per conjugació a una altra molècula o perquè el converteix en una substància metabolitzable per a la planta. Així s'ha introduït en plantes transgèniques el gen que codifica, per a l'EPSP sintasa, l'enzim de la ruta d'aminoàcids aromàtics, que és específicament inhibït per l'herbicida glifosfat, que es la raó del seu efecte herbicida. El gen s'ha col·locat sota el control d'unes regions reguladores que fan que el gen s'expressi fortament en tots els teixits i així aquestes plantes mostren resistència al glifosfat. S'han emprat estratègies

semblants per obtenir plantes de canyella i de soja tolerants a l'herbicida RoundUp (inhibidor de l'EPSP sintasa). També introduint gens mutants (aquells que la proteïna que produeixen és insensible a l'herbicida) d'acetolactat sintasa (ALS), la diana dels herbicides basats en la sulfonilurea (com el Glean, etc.), s'han obtingut plantes de cotó i canyella resistents per aquest procediment. L'estratègia alternativa d'inactivació de l'herbicida per modificació covalent (p. e. acetilació o nitrilació) ha estat també emprada en canyella, soja, cotó i dacsa, i s'han incorporat els gens bacterians específics sota el control de regions reguladores de plantes.

5.8.2. Resistència a insectes

L'objectiu fonamental és reduir l'ús d'insecticides químics. No és cap secret que un dels factors que més ha contribuït a l'èxit de l'agricultura moderna ha estat la utilització d'una àmplia varietat d'insecticides per tal de controlar el dany produït pels insectes. Aquest dany hom el calcula encara entre el 4 % per a la soja i el 20 % per a les creïlles, i fins i tot superior per a altres cultius. L'enginyeria genètica de plantes proporciona unes noves estratègies per al control dels insectes. En un cas s'ha introduït en plantes transgèniques un gen del bacteri *Bacillus thuringiensis* que codifica la informació per a una proteïna insecticida anomenada toxina Bt. Aquesta toxina ha estat utilitzada durant desenes d'anys als EUA, per bé que fins ara s'aplicava per fumigació sobre les plantes. Es tracta d'una proteïna tòxica, molt específica, per a certs lepidòpters, dípters i coleòpters, ja que sols sota les condicions particulars dels estòmacs d'aquests insectes és processada i, interaccionant amb receptors específics, inhibeix llurs bombes iòniques. S'ha demostrat al laboratori i també en experiments de camp, que les plantes transgèniques portadores del gen per a la toxina Bt són resistents al dany que altrament provoquen les larves. Com que les proteïnes insecticides són tan específiques en la seua interacció, s'han dissenyat diverses proteïnes Bt amb diferents especificitats, que poden utilitzar-se soles o en combinació, per disminuir la possibilitat d'emergència de les resistències naturals en la població d'insectes. L'empresa Monsanto (i altres) ha fet ja proves de camp, en més de 200 emplaçaments arreu del món, amb tomateres transformades amb aquests gens i ha comprovat la seua efectivitat.

Una altra aproximació molt menys utilitzada, ha estat aprofitar els efectes tòxics dels inhibidors de proteases sobre el procés digestiu dels insectes. Els inhibidors de proteases es troben presents en moltes llavors i hom suposa que tenen un paper de protecció enfront de l'atac de diversos devoradors. Aquests inhibidors no són tan específics i per això són els responsables de les males digestions quan s'ingereixen fesols o cigrons poc cuits. Les plantes transgèniques que expressen a les seues fulles un inhibidor de proteases de diversos orígens (proteïnes d'uns 80 aa) manifesten resistència enfront de diversos insectes que causen danys importants com són *Heliothis virescens* i altres erugues. S'han aconseguit així plantes transgèniques de tabac (*Nicotiana tabacum*), tomata (*Lycopersicon esculentum*), cotó (*Gossypium* sp.) i dacsa, que ja han passat els processos de laboratori i d'experimentació en el camp. El cotó serà segurament el primer cultiu comercialitzable (tal vegada l'any vinent) que continga una resistència pròpia als insectes, a causa de la introducció del gen *Bt* per enginyeria genètica.

5.8.3. Resistència a malalties

La transferència de gens ha estat àmpliament utilitzada per incrementar la resistència dels cultius a malalties i pestes. El principal progrés en aquest aspecte ha estat, sobretot, la resistència als virus. Una de les aproximacions desenvolupada per l'equip de Roger Beachy, llavors a la Universitat de Washington (St. Louis, Missouri) i ara a l'Scripps Research Institute (La Jolla, Califòrnia) consisteix a obtenir plantes transgèniques que expressen la proteïna de la coberta del virus. Aquests autors demostraren que això conferia resistència enfront de la posterior inoculació del virus. Aquesta aproximació ha estat aplicada a una varietat de combinacions virus/cultiu. S'ha aplicat a un ventall de cultius —alfals (*Medicago sativa*), tabac, creïlla, meló i arròs— amb diversos virus —el del mosaic de l'alfals, el del mosaic del cogombre (*Cucumis sativus*), l'X i Y de la creïlla (*Solanum tuberosum*), de l'enrotllament de la fulla de la creïlla, etc. Si bé hom no coneix amb certesa quin és el mecanisme d'actuació, se suposa que deu ésser que les càpsides preformades segresten les partícules infectives de RNA, i impedeixen així la infecció. Altres aproximacions impliquen l'ús de tècniques de RNA antisentit en què s'introdueix el cDNA que codifica

la proteïna de la coberta en orientació inversa, de manera que la planta transgènica sintetitza una molècula de RNA complementària al missatger de la proteïna de la coberta. Se suposa que quan l'RNA (+) del virus entra en la planta és bloquejat per l'RNA antisentit. Així s'han aconseguit efectes sobre les malalties virals, si bé no són tan bons com els assolits amb la sobreexpressió de la proteïna de la coberta.

Els virus no són, però, els únics patògens contra els quals hom està introduint mecanismes de protecció en plantes. Així s'han obtingut plantes de tabac resistents al *Pseudomonas syringae*, introduint un gen procedent de microorganismes, que desintoxica la toxina produïda pel patògen. En un altre exemple, la simptomatologia que produeix el fong *Alternaria longipes* en el tabac disminueix en severitat si les plantes tenen un gen del bacteri *Serratia marcescens*, que codifica una quitinasa (enzim que degrada la quitina de la paret del fong). L'empresa DNAP, Cinnminson (Nova Jersey), ha realitzat de manera reeixida experiments de camp, com aquest descrit per a tabac, en creïlles, ensisams i tomateres.

5.9. MILLORES EN LA COMPOSICIÓ DELS ALIMENTS

En general cal dir que una aplicació racional de la biotecnologia agrícola per tal d'obtenir productes amb millors característiques nutricionals, sabor, durabilitat, etc., passa per tenir un millor coneixement del processos fisiològics i bioquímics implicats. No obstant això, ja s'han obtingut els primers resultats que anticipen tot un ventall d'infinites possibilitats. Tot seguit descriurem algunes de les aplicacions més importants.

5.9.1. Millora en la composició dels àcids grassos i dels carbohidrats

Els investigadors de Calgene (Davies, Califòrnia) han fet progressos significatius en la modificació de la composició dels àcids grassos de les plantes. Açò ho han fet mitjançant la introducció de noves activitats enzimàtiques o la reducció dels nivells d'enzims clau en la ruta de biosíntesi dels àcids grassos. La composició d'àcids grassos ha estat modificada per a la colza (*Brassica napus*). Utilitzant aproximacions semblants s'ha aconseguit modificar la com-

posició dels carbohidrats. Així, amb l'expressió d'un gen mutant d'*E. coli*, codificat per a l'ADP glucosapirofosforilasa, en la creïlla, s'aconseguí incrementar el nivell de midó en els tubèrculs. També s'aconseguí alterar la composició dels sucres amb la sobreexpressió de l'enzim bacterià ciclodextrinaglucosiltransferasa.

Els progressos per intentar modificar la composició d'aa de les proteïnes de reserva no s'ha aconseguit. Això es deu fonamentalment al fet que l'interès està en l'alteració de les proteïnes de reserva dels cereals per incrementar els nivells de certs aa dels quals són deficitaris. Dos han estat els problemes fonamentals: sembla molt difícil alterar la composició dels aminoàcids de les proteïnes de reserva sense alterar les característiques que fan que es puguin acumular en els cossos proteics dels grans, i segon però no menys important, fins fa poc hom no disposava de cap manera per a introduir material genètic en els cereals.

5.9.2. *Obtenció de tomates amb millors característiques comercials: major duració postcollita, millors característiques durant el procés industrial i millor sabor i textura*

El cas més popularitzat de modificació de plantes per enginyeria genètica ha estat tal vegada el de la tomata. Fonamentalment els experiments han estat dirigits a modificar el procés d'ablaniment per tal d'allargar la durada del fruit i fer fruits més sòlids i amb millor capacitat per a suportar el transport.

Evidències fisiològiques i bioquímiques anteriors apuntaven al fet que la poligalacturonasa, l'enzim que degrada les pectines —component de la paret cel·lular dels fruits, que hom suposava bàsic en la resistència del fruit— seria un bon candidat. El gen va ser aïllat de la tomata per DellaPenna al laboratori d'Alan Bennett a Davies (Califòrnia), quan els procediments de transformació de la tomata ja estaven a l'abast. Investigadors dirigits per Don Grierson (Nottingham, Gran Bretanya), de les ICI Seeds (Anglaterra) i de Calgene Inc. (EUA), utilitzant construccions gèniques antisentit, transformaren diferents cultius de tomata en construccions que contenien promotors virals (constitutius) i el cDNA de la polindogalacturonasa en orientació inversa. La tecnologia *antisense* va ser molt eficaç per a bloquejar l'acumulació de poliendogalacturo-

nasa, però no va ser capaç de reduir ni la solubilització de pectines ni l'ablaniment inicial del fruit. D'aquest i altres experiments, sembla emergir la idea que la PG no era l'única responsable de l'ablaniment del fruit, però sí tenia un paper en etapes posteriors de l'ablaniment que limitaven la vida d'emmagatzemament del fruit. No obstant això, el fruit va adquirir unes qualitats molt positives, com una menor susceptibilitat a les malalties i el fruit que anava a ser utilitzat en la indústria podia aguantar més en la mata. Com a conseqüència hi ha ara un major interès amb altres enzims que hom pensa que poden ser, junt amb la PG, els que porten a terme el procés d'ablaniment del fruit. L'atenció també es va dirigir més amunt del devesall del procés que inicia la maduració. Se sap des de fa bastant temps que en el procés de maduració de la tomata té un paper molt important el regulador del creixement vegetal etilè. Fa ja 10 anys San Fa Yang, a la Universitat de Davies (Califòrnia), va descriure quina era la ruta biosintètica d'aquest regulador, coneguda actualment com *cicle Yang*. La regulació de la ruta sembla ser en l'àmbit del precursor ACC (l'àcid aminopropancarboxílic) a través de l'enzim ACC sintasa. L'ACC és convertit en etilè mitjançant l'activitat EFE (enzim formador d'etilè). L'objectiu fonamental dels distints grups ha estat bloquejar la síntesi d'etilè i així la maduració actuant sobre l'ACC sintasa per mitjà de tècniques d'enginyeria genètica. El gen per a l'ACC sintasa va ser primer aïllat per Sako Teologis (Plant Gene Center) i posteriorment introduït en plantes amb orientació antisentit. Les plantes transgèniques produïen molt menys etilè que les normals i el fruit mostrava una reducció significativa en la maduració (veg. la fig. 2). Al mateix temps Hamilton al laboratori de Don Grierson aconseguia plantes transgèniques en les quals havia introduït un gen antisentit de funció desconeguda. El gen havia estat aïllat perquè s'expressava aviat durant la maduració del fruit i amb la tecnologia *antisense* es podria esbrinar quin paper tenia durant la maduració. El gen va resultar que codificava la informació per a l'enzim EFE i que a més a més les plantes que tenien bloquejada aquesta activitat tenien fruits que canviaven de color naturalment, però que encara que es mantien en la planta per períodes de setmanes no es passaven de madurs ni es mustiaven (marcién). Un avantatge de la tecnologia genètica és que fa possible regenerar un ventall de transformacions on la síntesi d'etilè és inhibida en diferent extensió. A més, utilitzant promotors específics d'òrgans que estiguen regulats durant el

desenvolupament de la planta, és possible inhibir la producció d'etilè i els seus efectes, en parts i moments específics de la planta.

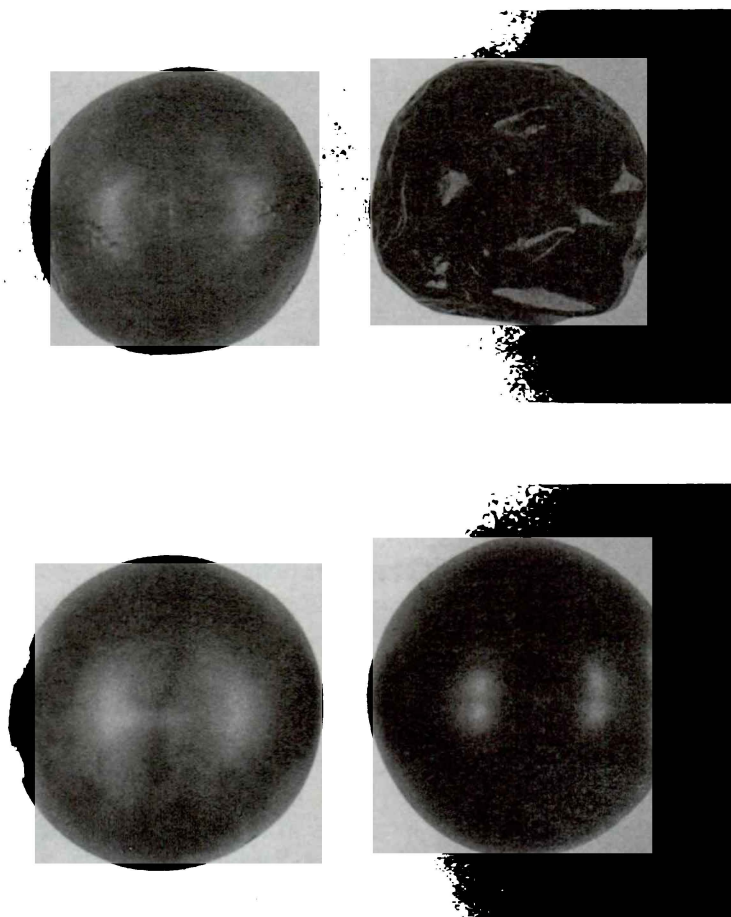


FIGURA 2. Obtenció de tomates transgènics amb millors propietats. Una manera d'obtenir plantes i fruits amb noves propietats és bloquejar la síntesi d'alguns dels productes gènics que són activats durant el procés de maduració. En aquest cas el gen E8 de funció desconeguda va ser introduït en plantes de tomata transgènica amb orientació contrària a la que produeix el producte gènec funcional. Com a conseqüència les tomates no tenen la proteïna corresponent, E8, i mostren una alteració en la maduració. A l'esquerra la tomata normal; a la dreta la tomata transgènica amb el gen E8 bloquejat, de la mateixa edat i fons genètic, on es mostra el retard en la maduració.

Com a exemple de modificació del sabor mencionarem el de la producció de proteïnes dolces en plantes transgèniques. La monel·lina i la taumatina són dues proteïnes dolces ben caracteritzades que es troben en les plantes africanes *Dioscoreophyllum cumminsii* (Diels) i *Thaumatococcus danielli* (Benth). Totes dues donen un sabor dolç que és aproximadament 100.000 vegades més fort que el sucre (en una base molar). Lola Peñarrubia i altres al laboratori de Bob Fischer a la Universitat de Califòrnia a Berkeley, col·locaren el gen que codifica la informació per a les dues cadenes polipeptídiques de la monel·lina sota les regions reguladores dels promotors constitutius i específics dels fruits en maduració i els varen transferir a la tomata i a l'encisam. L'expressió d'aquests gens en les plantes transgèniques resultà en l'acumulació de la proteïna dolça monel·lina en els fruits i les fulles respectivament. Aquesta és una estratègia alternativa per a incrementar el gust i la qualitat dels fruits i vegetals.

5.10. ALTRES APLICACIONS PRESENTS I FUTURES

L'agricultura moderna depèn en gran mesura d'un nombre relativament xicotet d'espècies que han estat seleccionades per respondre bé a les pràctiques mecanitzades a gran escala. Aquests cultius són utilitzats primàriament per produir farina, sucre, oli, proteïnes, fibra i menjar d'animals.

Hi ha, d'altra banda, una creixent demanda d'una sèrie de compostos, moltes vegades en quantitats molt petites, que normalment s'obtenen de plantes difícils de cultivar i que sols es troben als països del Tercer Món. Exemples:

a) Producció d'olis industrials

Una qüestió important per a la producció a gran escala d'olis per a una utilització industrial és que les plantes que les produeixen no són fàcilment domesticables. L'enginyeria genètica es presenta com una alternativa, ja que hauria de ser possible, després d'identificar el gens dels enzims responsables de les modificacions específiques dels àcids grassos, introduir-los en les espècies fàcilment cultivables i així modificar el component lipídic emmagatzemat d'aquesta espècie. Per exemple, no hi ha cap cultiu que proporcione àcids grassos de cadena curta com el làuric, que són

utilitzats en grans quantitats com a detergents. Aquests compostos s'obtenen fonamentalment del coco i la palma, i són collits a mà. Un dels objectius d'algunes empreses és introduir el tret «làuric» en un cultiu de zona temperada, i incorporar-hi els gens d'una planta del gènere *Cuphea*, que sí acumula àcids grassos de cadena curta.

b) Producció de metabòlits secundaris

Ha estat estimat que les plantes sintetitzen més de 100.000 metabòlits secundaris, dels quals almenys 15.000 han estat caracteritzats. Sols el 1980 els americans gastaren 8 bilions de \$ en medicaments derivats de plantes superiors. Les plantes contenen per exemple piretrines, rotenoides i alcaloides, que són utilitzats com a precursors en la fabricació de pesticides. La demanda mundial de flors de *Pyrethrum* és de 25.000 Tm a l'any i hom calcula que uns 150 milions de flors són collits diàriament a Kenya, Tanzània i Equador. Hauria de ser possible produir alguns d'aquests compostos, primer clonant els gens rellevants per a la biosíntesi del compost i després introduint-los en les espècies escaients. En la petúnia, per exemple, ha estat possible modificar el color de les flors simplement bloquejant un gen de la ruta de la biosíntesi dels compostos acolorits.

En conclusió vivim un moment molt important quant a l'enginyeria genètica, ja que ara és un instrument poderós —que està començant a donar els primers fruits— per a incorporar qualsevol gen de qualsevol organisme que hom pugui pensar que suposa una millora de la planta cultivada.

Però com hom pot desprendre sobretot dels dos apartats anteriors hi ha fortes implicacions ètiques i de dret sobre el germoplasma que no estan en absolut clares.

És ètic patentar un ésser viu modificat per tècniques d'enginyeria genètica? Com podrien si no les empreses salvaguardar les inversions fetes? Atès que la major part de germoplasma es troba als països del Tercer Món, mentre que la tecnologia que permet la seua utilització biotecnològica està en mans de multinacionals i potències industrials, quin dret tenen aquells països sobre les plantes modificades o sobre els gens originals? Una vegada es faci innecessària la planta original del país del Tercer Món, perquè el gen que produïa la substància d'interès ara es pot obtenir per transformació en una planta que creix bé en un clima temperat, què passarà amb les economies d'aquells països?

5.11. REPERCUSSIONS I IMPACTE SOCIAL

La denúncia dels perills de l'ús del DNA recombinat i la consegüent preocupació pública naixeren en la conferència d'Asilomar (1975, EUA) i posteriorment els clamors creixeren ràpidament durant els anys 80. En països com Alemanya la tecnologia gènica ha trobat una forta resistència en organitzacions i fins i tot en partits polítics com Die Grünen (Els Verds).

Amb l'excepció de França, Itàlia i l'Estat espanyol, tota la resta d'estats europeus tenen una o més organitzacions que s'oposen activament a algunes de les aplicacions de la biotecnologia en general i de l'enginyeria genètica de plantes en particular.

Aquestes organitzacions tenen, segons afirmen, com a objectiu principal «guiar la biotecnologia en direccions que siguin sostenibles des del punt de vista mediambiental, siguin responsables socialment i que salvaguarden l'interès públic» (Genetics Forum, Gran Bretanya). Afirmen algunes d'aquestes organitzacions que atesa la sobreproducció d'aliments a les CE i la demanda creixent de protecció mediambiental, no sols necessitem plantes que produeixen un 3 % més, ja que això requereix un 20 % més de fertilitzants i herbicides (P. Henricksen, Greenpeace, Dinamarca). Moltes d'aquestes organitzacions, com NOAH, s'oposen al fet que hom pugui patentar animals i plantes en general i que la transferència i les patents de gens al Tercer Món no s'esdevinga sense compensacions econòmiques. En tot cas, plantegen la necessitat d'establir si patentar potència o no la innovació tecnològica.

Per aconseguir aquests objectius, aquestes organitzacions segueixen diferents estratègies com el retard o el filibusterisme (*filibustering*), amb les quals han aconseguit diversos èxits. Un altra estratègia utilitzada es la circulació de campanyes d'informació/mal·informació, com quan el microbiòleg Jakob Segal afirmà que el virus VIH va ser construït conscientment a un laboratori de la CIA i alliberat accidentalment al medi ambient.

De tant en tant, grups com el Vurige Virus (Virus Ardent) usen mètodes dràstics per expressar la seua repulsa per l'enginyeria genètica de plantes, com quan l'agost de 1992 destruïren un camp de proves on hi havia dacs modificada per enginyeria genètica, que pertanyia a l'empresa VanDerHave (Rotterdam). Accions directes com aquestes són minoritàries entre les organitzacions europees i poden ser fins i tot contraproduents: així quan el grup autoanome-

nat The Very Angry Potatoes va destruir les plantacions experimentals de creilles a Holanda, farà 2 anys, el que es va aconseguir fou que la indústria tinguera arguments per a no donar a conèixer la localització dels camps on s'assajaven les plantes modificades.

Com siga els aires en molts dels activistes d'aquestes organitzacions semblen estar canviant i molts dels que inicialment denunciaven tota la tecnologia gènica com un perill incontrolable, ara semblen trobar que substàncies com la insulina recombinant i mètodes de diagnosi fonamentats en el DNA recombinant són més o menys acceptables. Ara els activistes, en comptes d'enfrontar-se a la tecnologia de gens globalment, es concentren en assumptes més específics com el Projecte del Genoma Humà, l'etiquetatge dels aliments, etc. NOAH per exemple es qüestiona la necessitat de manipular genèticament els aliments alhora que vol que siga obligatori l'etiquetatge de tot material alterat mitjançant tècniques d'enginyeria genètica. Recentment als EUA s'ha aprovat que no és obligatori posar a l'etiqueta dels productes alimentaris si aquests han estat alterats genèticament.

Finalment sols comentar el possible impacte per als països del Tercer Món. Resulta interessant que regions com l'Amèrica del Nord i Austràlia són totalment dependents de fonts externes quant a recursos genètics per a la major part dels cultius agrícoles. Segons Klopenburg i Klienman, les regions de l'Amèrica Llatina i Àsia del centre-oest donen compte del 65 % dels recursos genètics mundials dels cultius més importants. L'Amèrica Llatina ha donat al món la dacsa, la creïlla i la creïlla dolça, mentre que Àsia del centre-oest ha afegit el blat i l'ordi. L'Àfrica contribueix amb el 4 %, mentre que la Mediterrània i les regions eurosiberianes afegeixen 1,4 i 2,9 % respectivament. Les regions xinesa i japonesa contribueixen amb el 12,9 %, la Indo-xina, 7,5 %. Les regions més pobres del món com a grup donen compte del 95,7 % dels recursos genètics mundials. Aquesta distribució desigual dels recursos genètics i de la producció global d'aliments ha conduït a un ampli debat sobre el control dels recursos genètics. Precisament els països que podríem anomenar «pobres genèticament» són els que dominen la producció mundial d'aliments i l'èxit de la producció agrícola depèn molt de la capacitat científica i tecnològica per a incrementar la producció amb la utilització dels recursos genètics a l'abast. No és d'estranyar que malgrat ser genèticament pobres, els països industrialitzats dominen el món de la productivitat agrícola. Per tant el debat sobre els

recursos genètics té sentit tan sols en el context de polítiques d'estratègies científiques i de desenvolupament més àmplies.

El president dels EUA Thomas Jefferson va dir una vegada que el servei més gran que un home pot donar a un país és afegir una planta útil per a cultivar-la. Aquesta frase subratlla la importància dels recursos genètics en l'evolució econòmica i cultural, si bé la història econòmica sovint fa molt d'èmfasi en el desenvolupament tecnològic i ignora el paper del material genètic en el canvi econòmic. L'enginyeria genètica de plantes amalgama els recursos genètics i la tecnologia i, si bé posa importants qüestions sobre la taula, ens deixa entreveure un futur excitant per a l'agricultura i la indústria derivada dels productes agrícoles.

TAULA I

Plantes transformables per tècniques d'enginyeria genètica

Cultius d'interès que són susceptibles de transformació genètica

<i>cultius bàsics</i>		<i>oleaginoses i d'altres</i>	<i>ornamentals</i>	<i>lleyosos</i>
tomata <i>Lycopersicon esculentum</i>	coliflor <i>Brassica oleracea</i>	gira-sol <i>Helianthus annuus</i>	petúnia <i>Petunia hybrida</i>	pomera <i>Pyrus malus</i>
creïlla <i>Solanum tuberosum</i>	col <i>Brassica oleracea</i>	colza <i>Brassica napus</i>	rosa <i>Rosa sp.</i>	raïm <i>Vitis vinifera</i>
batata <i>Ipomoea batatas</i>	rave <i>Raphanus sativus</i>	canyella <i>Cinnamomum zeylandicum</i>	crisantem <i>Chrysanthemum sp.</i>	xop <i>Populus sp.</i>
soja <i>Glycine max</i>	api <i>Apium graveolens</i>	lli <i>Linum usitatissimum</i>	clavell <i>Dianthus sp.</i>	nouer <i>Juglans regia</i>
dacsa <i>Zea mays</i>	remolatxa <i>Beta vulgaris var. rapa</i>	cotó <i>Gossypium sp.</i>	meravella <i>Ipomoea sp.</i>	om <i>Ulmus minor</i>
arròs <i>Oryza sativa</i>	cogombre <i>Cucumis sativus</i>			perera <i>Pyrus communis</i>
sègol <i>Secale cereale</i>	meló <i>Cucumis melo</i>			papaia <i>Carica papaya</i>
blat <i>Triticum sp.</i>	maduixa <i>Fragaria vesca</i>			kiwi <i>Actinidia chinensis</i>
ensisam <i>Lactuca sativa</i>	nabiu <i>Vaccinium sp.</i>			
pèsol <i>Pisum sativum</i> <i>ssp. hortense</i>	albergina <i>Solanum melongena</i>			
safanòria <i>Daucus carota</i> , <i>ssp. sativus</i>	espàrrec <i>Asparagus officinalis</i>			