

CULTIVO DE CÉLULAS Y TEJIDOS VEGETALES: FUENTE DE ALIMENTOS PARA EL FUTURO

Dr. Graciano Calva Calva

Investigador responsable del laboratorio de Ingeniería Metabólica del Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional, México.

gcalva@cinvestav.mx

Dra. Josefina Pérez Vargas

Coordinadora de la Maestría en Ciencias en Ingeniería Bioquímica del Tecnológico de Estudios Superiores de Ecatepec, Estado de México, México.

djperezvargas@yahoo.com.mx

Resumen

La producción de alimentos en cantidad y calidad suficiente para la creciente población mundial es un importante reto para este siglo. La biotecnología vegetal ha demostrado ampliamente que la generación de plantas transgénicas destinadas a la producción de alimentos y compuestos biológicamente activos es la alternativa más viable. Sin embargo, el desconocimiento de los aspectos básicos de esta biotecnología y de la bioquímica vegetal ha provocado incertidumbre y desacuerdo entre la comunidad sobre las consecuencias de la liberación y el uso de plantas transgénicas como fuente de alimentos. Con la finalidad de dar luz al conocimiento de la biotecnología vegetal y uso de alimentos transgénicos, en este trabajo se dan a conocer los aspectos técnicos básicos de esta biotecnología. Se ilustra la metodología para establecer un cultivo de células vegetales poniendo de manifiesto la importancia de seleccionar adecuadamente las condiciones fisicoquímicas y nutricionales, no sólo para obtener un desarrollo celular y producción de biomasa adecuado, sino para que la mayor parte de ellas exprese su capacidad de biosíntesis de sustancias económicamente importantes, tal y como sucede en las plantas encontradas en la naturaleza.

Palabras clave: Totipotencia, Explante, Callo, Auxinas, Citocininas.

Plant cell and tissue culture: source of foods for the future **Abstract**

Production of food in quantity and quality enough for the increasing world population is an important challenge for this century. Plant biotechnology has widely proved that generation of transgenic plants producing food and biologically active compounds is the most viable alternative. However, ignorance of basic aspects about this biotechnology and plant biochemistry has led the community to disagree on the consequences of releasing and use of transgenic plants as food resource. With the aim of lighting the knowledge of plant biotechnology and use of transgenic food, in this work the basic aspects of this biotechnology are summarized. The methodology to establish plant cell and tissue cultures is illustrated. The importance of properly selecting the physicochemical and nutritional conditions is discussed, to obtain not only adequate cellular development and biomass production, but also most cells expressing their biosynthetic capacity for economically important substances, as it happens in nature.

Keywords: Totipotency, Explant, Callus culture, Auxins, Cytokinins.

Introducción

Dado el incremento en la población mundial, actualmente de 6 mil 477 millones de habitantes y estimada en 8 mil y 9 mil 300 millones para los años 2025 y 2050 respectivamente (PRB 2005), la producción de alimentos es un importante reto para este siglo (Vasil 1998). El vencerlo dependerá de la capacidad para mejorar el rendimiento y productividad de los cultivos agrícolas y desarrollar variedades mejoradas de plantas que proporcionen alimentos de mejor calidad y productos naturales a más bajos costos.

En México, por ejemplo, a una tasa anual de crecimiento poblacional de 1.9 por ciento, se proyecta una población de 140 millones de habitantes para el 2050, lo que representa un incremento del 30 por ciento en la demanda de alimentos con respecto a las necesidades actuales (PRB 2005). En este sentido, la biotecnología vegetal comienza a tener un profundo impacto y tiende a convertirse en una estrategia tecnológica en la denominada agricultura global (Hein 1998, Stafford *et al.* 1986). Las herramientas de la biotecnología vegetal han demostrado ampliamente su potencial en la comprensión de muchos aspectos bioquímicos básicos de las plantas (Niggeweb *et al.* 2004, Rea 2005) y ha dado lugar a la generación de alimentos (Khush 2001) y productos transgénicos como anticuerpos, antígenos y proteínas (Calva *et al.* 2002, Hellwig *et al.* 2004).

Durante la denominada Revolución Verde, por ejemplo, usando técnicas tradicionales de autopolinización y polinización cruzada fue posible seleccionar especies vegetales de alta productividad, mejor crecimiento, valor nutricional, producción de semillas y frutos de mejor calidad que las variedades silvestres y con las cuales se revertió la deficiencia de alimentos que se presentó antes de los años sesenta del siglo pasado (Vasil 1998). No obstante, muchas de las variedades vegetales cultivadas a gran escala obtenidas por la Revolución Verde están cerca de sus límites biológicos y físicos de productividad, por lo que es difícil incrementar más su productividad por técnicas tradicionales de mejoramiento.

La biotecnología vegetal que usa ingeniería genética y biología molecular para introducir genes foráneos a las plantas es una alternativa viable para seguir incrementando su productividad.

Sin embargo, aunque las plantas transgénicas representan la alternativa más viable para satisfacer las necesidades de alimentos para las generaciones futuras, el desconocimiento de los aspectos básicos de la biotecnología y bioquímica vegetal ha provocado incertidumbre, polémicas y desacuerdo entre la población general sobre las consecuencias de la liberación y uso de plantas transgénicas (Khush 2001, Taverne 2005). Esta actitud promovida por grupos activistas pone en riesgo el éxito de la biotecnología no sólo en la producción de alimentos sino también en las aplicaciones en el área de la salud cuando el destino de las plantas transgénicas es la producción de sustancias biológicamente activas como vacunas, proteínas, antígenos y anticuerpos. Esperando reducir ese desconocimiento, en este trabajo se dan a conocer los aspectos básicos del cultivo de células vegetales, centro dogmático de las técnicas de biotecnología vegetal.

Cultivo de células vegetales

La célula vegetal es totipotente

El cultivo de células y tejidos vegetales se refiere al conjunto de técnicas usadas para crecer células, tejidos u órganos vegetales *in vitro*, bajo condiciones asépticas, controladas y libres de microorganismos (Street 1977, Calva y Ríos 1999). Se basa en el principio de totipotencia, que indica que cualquier célula vegetal contiene una copia íntegra del material genético de la planta a la que pertenece sin importar su función o posición en ella, y por lo tanto tiene el potencial para regenerar una nueva planta completa (Ferl y Paul 2000).

El proceso involucrado en la transformación de una célula a una planta u órgano, en ese entonces lo llamaron diferenciación celular, pero actualmente se denomina organogénesis.

En la Tabla 1 se indican los principales sucesos ocurridos durante la evolución de las técnicas de cultivo de células vegetales. En un principio los investigadores sugerían que las células en las plantas se diferenciaban al retener sólo aquella parte del genoma necesario para el tipo celular del órgano al que estaban destinadas. Se pensaba que debía haber factores externos que provocaban que las células cambiaran tomando gran diversidad de formas y funciones. Al inicio no se sabía si los cambios sufridos por la diferenciación eran permanentes e irreversibles o si sólo eran características temporales para que las células se adaptasen a necesidades funcionales del organismo en general y del órgano en particular.

Sin embargo, en experimentos realizados por Vochting en 1878 sobre la polaridad celular, se observó que células de tallos eran capaces de rediferenciarse y formar raíces y brotes, lo que demostró que la diferenciación no era permanente sino que estaba dada por la posición relativa de la célula en la planta (Bhojwani y Razdan 1983, Ferl y Paul 2000). Ahora se sabe que la diferenciación celular está regulada por la expresión genética y que no implica la pérdida de material genético (Ferl y Paul 2000).

En investigaciones desarrolladas sobre el tema de diferenciación celular, Gottlieb Haberlandt en 1898 aisló células y tejidos de plantas superiores y las colocó en soluciones nutritivas para su crecimiento y estudio, dando origen de esta manera a la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales. Así, Haberlandt fue el pionero en el cultivo *in vitro* de células vegetales completamente diferenciadas, habiendo reportado sus estudios y resultados en 1902, según lo indican Krikorian y Berquam (1969). Haberlandt propuso que era posible cultivar juntas células vegetativas libres y túbulos de polen adicionando soluciones nutrientes suplementadas con extractos de ápices vegetativos o con fluidos de sacos embrionarios. Es por ello que ahora se considera a Haberlandt como el padre de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales, la cual se ha convertido en el dogma central de la Biotecnología Vegetal.

Dos descubrimientos favorecieron la biotecnología vegetal

Después de Haberlandt, no fue sino hasta los años 30's que White en Estados Unidos y Gautheret en Francia, demostraron de forma definitiva la posibilidad de cultivar células vegetales *in vitro*. En ese tiempo hubo dos grandes descubrimientos que repercutieron de manera fundamental sobre el desarrollo de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales: primero, la identificación de las auxinas como reguladoras naturales del crecimiento vegetal, y segundo, el reconocimiento de la importancia de las vitaminas del complejo B en el crecimiento de las plantas.

En 1934, Gautheret cultivó células de *cambium* de algunas especies en una solución mineral con glucosa y cloruro de cisteína. Encontró que dichas células proliferaban por algunos meses y que adicionando vitaminas y ácido indolacético (AIA) se estimulaba considerablemente su crecimiento. Más tarde, en 1939 White reportó el establecimiento de cultivos similares pero a partir de tejidos tumorales de un híbrido de *Nicotiana glauca* X *N. langsdorffii*. Estos investigadores junto con Nobecourt, quien reportó en ese mismo año el establecimiento de un cultivo similar a partir de zanahoria, son los tres investigadores considerados los pioneros de la técnica del cultivo de células y tejidos vegetales (Bhojwani y Razdan 1983, Street 1977). Los medios de cultivo (Tabla 2) y métodos utilizados en la actualidad son por lo general modificaciones de los establecidos por ellos en 1939.

El éxito depende del explante

El procedimiento general (Figura 1) consiste en inocular un medio de cultivo gelificado (generalmente con agar, Gelrite o Phytigel®) con un fragmento de tejido u órgano vegetal, llamado explante, previamente tratado para eliminar todo organismo que se encuentre en su superficie (desinfestación).

El cultivo se incuba bajo condiciones ambientales de luz, temperatura y humedad controladas, que junto con las fisicoquímicas y nutricionales conducen el desarrollo del explante hacia la formación de una masa celular amorfa denominada callo, o hacia la diferenciación en un tejido organizado que producirá órganos o embriones. Los callos obtenidos mediante este procedimiento pueden subcultivarse para su mantenimiento y propagación o inducir su diferenciación para formar órganos (organogénesis), embriones (embriogénesis) o pasarse a un medio de cultivo líquido para obtener células y pequeños agregados en suspensión.

Los cultivos se mantienen bajo las mismas condiciones físicas y fisicoquímicas usadas para la inducción de callos. Los cultivos de órganos se puede rediferenciar hasta plantas completas (micropropagación) que luego se transfieren a invernadero. La temperatura de los cultivos generalmente se controla entre 25 y 28 °C, el pH entre 5.2 y 6.5 y la luz de 0 a 12,000 lux (Calva y Ríos 1999, Seabrook 1980, Martin 1980, Yasuda et al 1972).

Tabla 1. Evolución del cultivo de células y tejidos vegetales

Año	Autor	Suceso
	Haberlandt	
	Reinert y Stewart	
	Tulecke y Nickell	
	Cocking	
1902	Constabel	Concepción de la técnica de cultivo de células
1958	Murashige y	Embriogénesis de zanahoria
1959	Skoog	Suspensiones en biorreactor
1960	Gamborg, Miller,	Cultivo de protoplastos
1961	Ojima	Enzimas extracelulares en callos
1962	Kurz	Medio MS
1968	Kao	Medio B5
1973	Withers y Kartha	Cultivo continuo en quimiostato
1974	Zenk	Hibridación somática
1975	Brodelius	Preservación criogénica
1977	Dell-Chilton et al	Producción en dos etapas
1979	Krens et al	Inmovilización celular
1982	Horsh et al	Cultivo de raíces transformadas (hairy roots)
1982	Mitsui	Transformación de células vegetales
1983	Petrochemical	Tabaco transgénico
1983	Co.	Shikonina (Producción comercial)
1984	Redenbaugh	Semillas sintéticas
1985	Tabata y Fujita	Cultivos de células a gran escala
1986	Eilert y Constabel	Elicitación de alcaloides
1989	Giles	Producción de sanguinarina
1991	Genetech	Producción de aceite de canola
1993	Genetech	Tomate (jitomate) transgénico

Recopilada de Krikorian y Berquam 1969, Bhojwani y Razdan 1983, Street 1977, Calva y Ríos 1999, Ferl y Paul 2000.

Las plantas jóvenes o en desarrollo con tejidos meristemáticos y crecimiento vegetativo vigoroso son la mejor fuente de explantes. Aunque en una misma planta se puede encontrar tanto crecimiento juvenil como adulto, el primero se caracteriza por ser activo y por la ausencia de estructuras reproductoras, mientras que el adulto es más lento y presenta estructuras sexuales para la reproducción de la planta. Además, las plantas adultas pueden haber acumulado mayor cantidad de microorganismos en sus tejidos y contener menos células meristemáticas, necesarias para establecer los cultivos *in vitro* (Calva y Ríos 1999, Seabrook 1980, Street 1977).

La desinfección del tejido a usar como fuente de explantes se realiza con agentes desinfectantes como hipoclorito de sodio o calcio y cloruro mercurioso. La penetración del agente desinfectante en superficies rugosas o vellosas del tejido vegetal se puede incrementar con la adición de agentes tensoactivos como el Tween 20 (Webster 1966).

Tabla 2. Componentes de medios de cultivo para células y tejidos vegetales

	MS1	SH2	B53	White4
	CONCENTRATION			
Macronutrientes	MM	mM	mM	mM
NH ₄ NO ₃	20.6	25.0	---	---
KNO ₃	18.8	1.4	25.0	0.8
CaCl ₂ .2H ₂ O	3.0	1.6	1.0	---
Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	---	---	---	1.3
MgSO ₄ .7H ₂ O	1.5	---	1.0	3.0
Na ₂ SO ₄	---	---	---	1.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	---	---	1.0	---
KH ₂ PO ₄	1.25	1.25	---	---
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	---	---	1.1	0.1
NH ₄ H ₂ PO ₄	---	2.6	---	---
Micronutrientes	μM	μM	μM	μM
KI	5.0	6.0	4.5	4.5
KCl	---	---	---	871.9
H ₃ BO ₃	100.0	80.0	48.5	24.3
MnSO ₄ .4H ₂ O	100.0	---	---	22.4
MnSO ₄ .H ₂ O	---	60	59.2	---
ZnSO ₄ .7H ₂ O	30.0	3.5	7.0	10.4
NaMoO ₄ .2H ₂ O	1.0	0.4	1.0	---
MoO ₃	---	---	---	0.0
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.1	0.8	0.1	0.0
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.1	---	0.1	---
Na ₂ EDTA	100.0	55.0	---	---
FeSO ₄ .7H ₂ O	100.0	55.0	---	---
Fe ₂ (SO ₄) ₃	---	---	---	6.3
Comp orgánicos	μM	μM	μM	μM
Myo-Inositol	550.0	5500.0	555.1	---
Acido Nicotínico	4.6	40.6	8.1	0.4
Piridoxina HCl	2.4	2.4	4.9	0.0
Tiamina HCl	0.3	14.8	29.6	0.0
Glicina	26.6	---	---	40.0

1Murashige y Skoog 1962; 2Shenk y Hildebrandt 1972; 3Gamborg, Miller y Ojima 1968; 4White 1963.

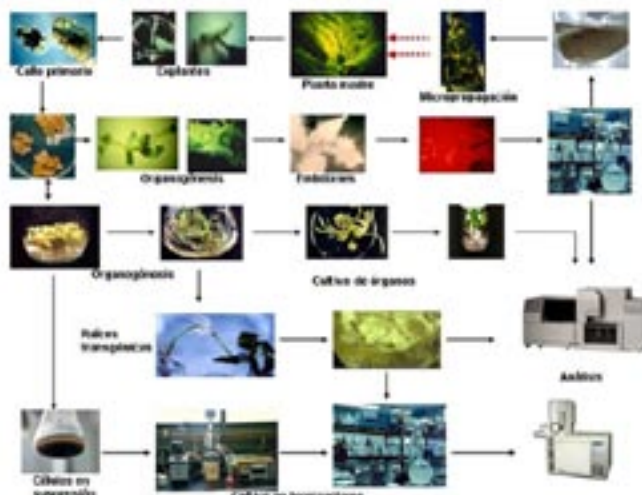


Figura 1. Procedimiento general de la técnica de cultivo de células y tejidos vegetales. Los tejidos meristemáticos y de crecimiento vigoroso de plantas jóvenes silvestres o crecidas *in vitro* son la mejor fuente de explantes para iniciar los cultivos. Las fotografías representan ejemplos de cultivos de células en suspensión de *Capsicum* spp., la embriogénesis de *Vanilla planifolia*, y de raíces transformadas de *Capsicum* spp y *Trigonella foenumgraecum* desarrollados en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV (Calva y Ríos 1999, Peraza *et al.* 2001, Martínez *et al.* 2004).

En las plantas silvestres, el tejido calloso se forma en respuesta a daños mecánicos sufridos por influencia del medio ambiente o por invasión de tejidos por ciertos microorganismos (Figura 2). Sin embargo, en cultivos *in vitro*, el tejido calloso se induce mediante la influencia de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal o fitohormonas adicionadas al medio de cultivo (Yeoman 1970, Tempé y Schell 1985, Crozier *et al.* 2000).

El éxito en la inducción y establecimiento de cultivos de callos, y en consecuencia la subsiguiente regeneración a tejidos y plantas, son función de la calidad del explante usado, que a su vez depende de la planta madre o del tejido del que se inició el cultivo. De cualquier forma, para el inicio de los cultivos se prefieren utilizar tejidos que contengan células meristemáticas. Estas se diferencian rápidamente en respuesta a estímulos organogénéticos como variación en el tipo y concentración de sustancias reguladoras del crecimiento vegetal. Las células meristemáticas se distinguen de otras células por su tamaño relativamente pequeño, citoplasma denso, forma isodiamétrica, pared celular fina, mínima vacuolación y un gran núcleo (Doerner 2000). En los cultivos *in vitro*, este tipo de células se encuentran en la periferia de los callos o en las suspensiones como masas o nódulos de tejidos preembriónicos, lo que produce una gran variabilidad en la expresión genética entre la población celular de esos cultivos. También es necesaria la presencia de este tipo de células para poder regenerar una planta a partir de un cultivo *in vitro*.

La variabilidad genética entre y dentro de los cultivos se refleja primero en la morfología de los callos y posteriormente en los cultivos en suspensión o sistemas de cultivo con los que se trabaje. Algunos autores (Wareing y Al Chalabi 1985, Petiard y Bariaud 1985) opinan que este fenómeno puede ser consecuencia de la alta frecuencia de división celular que tiene lugar en los cultivos *in vitro*. Otros indican que también pueden ser causadas por alteraciones o cambios de factores epigenéticos originados por la forma en que se establecen los cultivos. Así, hay estudios donde se observa que callos establecidos a partir de diferentes órganos pero de una misma planta varían en apariencia y presentan características únicas (Petiard y Bariaud 1985, Holden *et al.* 1988). Pero más aún, callos procedentes de un mismo explante también difieren en su morfología y características intrínsecas como color, friabilidad, dureza, tamaño, grado de diferenciación

y producción de metabolitos (Lindsey y Yeoman 1983, Bhom 1982, Calva y Ríos 1999). Respecto a esto último se ha observado que cuando los cultivos se inician de tejidos que naturalmente presentan la mayor producción de determinados metabolitos, se obtienen cultivos que dan mejores rendimientos respecto a otros provenientes de órganos o tejidos que no producen o lo hacen en muy bajas cantidades (Lindsey y Yeoman 1983).

No obstante, hay reportes que demuestran que cualquier cultivo *in vitro* puede alcanzar producciones tan altas o más de un determinado compuesto respecto a las que presenta una planta desarrollada en condiciones silvestres, sin importar de qué parte de la planta se haya establecido el cultivo (Petiard y Bariaud 1985). Así, las condiciones fisicoquímicas y nutricionales actúan sobre los cultivos para orientar la expresión genética de las células a diversos grados de diferenciación que proporciona a los cultivos características propias y únicas, aún cuando éstos provengan de una misma planta y todavía más, de un mismo explante.

Expresión genética: función del medio de cultivo

De lo anterior, queda claro que es importante encontrar condiciones de cultivo no sólo para que las células crezcan y se dividan rápidamente sino también para que la mayor parte de ellas expresen su capacidad de rediferenciación y biosíntesis para una o varias sustancias de interés. En varios de los estudios sobre cultivos de células y tejidos vegetales esto se ha tratado de resolver variando los componentes de los medios de cultivo (Martin 1980, Yasuda *et al* 1972, Calva y Ríos 1999) y las condiciones físicas y fisicoquímicas de los procesos (Fowler 1982, Rhodes *et al* 1987), aprovechando las ventajas que ofrece la rápida respuesta de las células *in vitro* ante pequeños cambios en su medio ambiente con respecto a las plantas crecidas por métodos tradicionales.

Los primeros medios utilizados en cultivo de células y tejidos vegetales fueron semisintéticos. Frecuentemente contenían extractos o complejos orgánicos como agua de coco, hidrolizado de caseína y extracto de levadura. Actualmente, la mayoría de los medios son de composición conocida (Tabla 2), estando constituidos básicamente por cinco grupos de ingredientes: nutrientes inorgánicos, fuente de carbono, fuente de nitrógeno, vitaminas y reguladores del crecimiento que *in vivo* son sintetizados por una parte u órgano de la planta para luego ser transportados a otros órganos donde se metabolizan y/o acumulan (Seabrook 1980, Yasuda *et al* 1972). Las fuentes de nitrógeno más comunes son el nitrato y amonio, pero también se han utilizado urea, hidrolizado de caseína, extracto de levadura y aminoácidos, entre otros. La fuente de carbono más empleada es la sacarosa o glucosa y en menor grado la maltosa, galactosa, almidón y melaza. Los micronutrientes, generalmente adicionados al medio de cultivo en forma de sales, son utilizados por las células como cofactores enzimáticos, como el molibdeno para la nitrato reductasa y el magnesio para algunas cinasas (Murashige y Skoog 1962, Shenk y Hildebrandt 1972).

Las fitohormonas y sus inhibidores son sustancias producidas por las plantas y regulan su respuesta a estímulos ambientales como luz, temperatura y humedad, ayudando de esta manera a regular y coordinar los procesos esenciales para el desarrollo normal de las plantas (Wain 1980, Doerner 2000, Crozier *et al* 2000). Este tipo de sustancias se pueden dividir principalmente en auxinas, giberelinas, citocininas, ácido abscísico, etileno, brasinoesteroides, poliaminas, ácido jasmónico y el ácido salicílico.

Las auxinas y giberelinas promueven el alargamiento celular pero inhiben la diferenciación, mientras que las citocininas estimulan la división mediante la cual se producen nuevas células y pueden también evitar el envejecimiento celular.

El etileno estimula la maduración principalmente de frutos, el ácido abscísico inhibe la acción de las auxinas, giberelinas y citocininas operando como sistema de defensa natural contra efectos de estrés fisiológicos. Las más usadas en cultivos de células vegetales son las auxinas y citocininas. De las auxinas, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) es la más usada para la inducción y mantenimiento de tejido calloso debido a que suprime severamente la organogénesis. De las citocininas, la más activa es la 2-indolaminopurina (2iP); sin embargo, las más utilizadas en cultivo de células vegetales son la bencilaminopurina (BAP) y la cinetina (Cin), una citocinina sintética afectada por la luz en el rango de longitud de onda de 300-800nm (Aitchison et al 1977, Street 1969 y 1977, Crozier et al 2000).

Aplicaciones

Organogénesis y micropropagación

Las principales aplicaciones de la técnica de cultivo de células, tejidos y órganos vegetales son en los campos de micropropagación, obtención de plantas libres de patógenos, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, biosíntesis de metabolitos e investigación básica en áreas como la genética, fisiología y bioquímica (Fowler 1987, Carpita y McCann 2000).

En micropropagación, la embriogénesis y la organogénesis (Figura 2) pueden usarse para obtener clones somáticos y regenerar plantas completas con características uniformes y así establecer cultivares de plantas valiosas, libres de microorganismos y difíciles de obtener por métodos de cultivo tradicionales.

Los cultivos *in vitro* también pueden almacenarse por largos períodos de tiempo mediante alguno de los métodos de conservación utilizados para microorganismos como es la refrigeración y criopreservación. Esta es una forma de eliminar los problemas de espacio físico, exceso de mano de obra, contaminación de los cultivos y los efectos de la erosión genética.

Entre las principales ventajas del cultivo de células y tejidos vegetales en la investigación básica, micropropagación y producción de compuestos con actividad biológica como metabolitos secundarios, proteínas y productos transgénicos, destaca el hecho de que permiten realizar estudios en un tiempo mucho menor y bajo condiciones más controladas que con plantas cultivadas por métodos tradicionales (Twyman 2003).

Si los cultivos *in vitro* se incuban o someten a condiciones de estrés fisiológico, pueden expresar características de adaptación y resistencia que en condiciones naturales nunca manifestaron, creciendo selectivamente sólo aquellas células capaces de adaptarse a sus nuevas condiciones. Esta variación genética también se puede inducir por técnicas de mutación, ingeniería genética, fusión de protoplastos y transformación genética por inclusión de DNA foráneo de manera similar a las aplicadas comúnmente en microorganismos (Yeoman et al 1980, Rhodes et al 1987, Crozier et al 2000). En este último caso se obtienen cultivos o plantas transgénicas en donde el DNA foráneo debe integrarse al genoma vegetal para garantizar una expresión estable en su progenie.

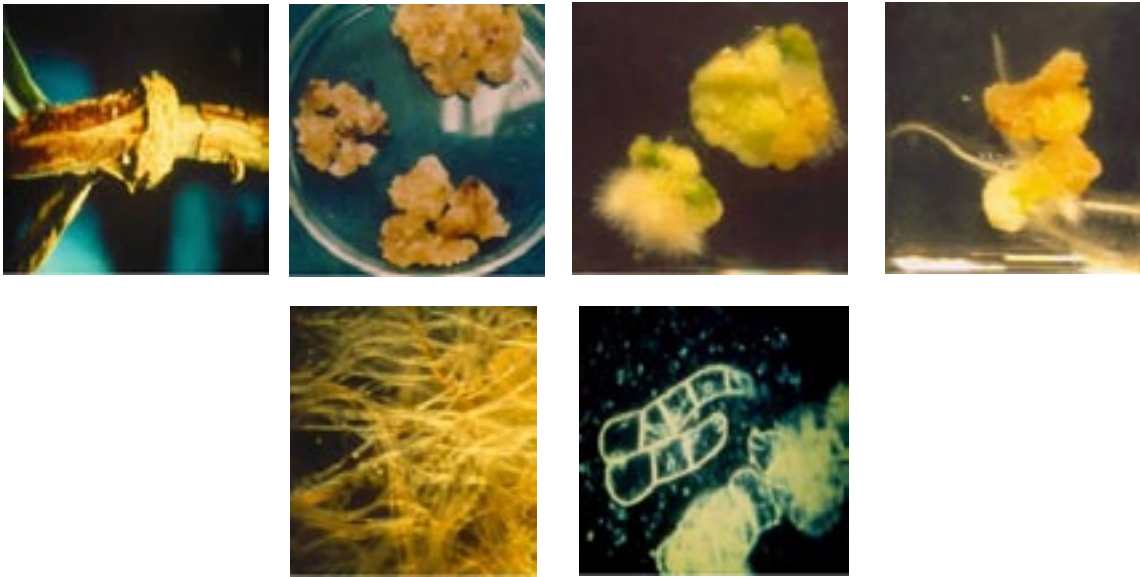


Figura 2. Agalla de la corona o tumor inducido por infección con *Agrobacterium tumefaciens* en un planta de tabaco (A); callos embriogénicos (B), brotes (C), e inducción de raíces (D), de *Vanilla planifolia*; cultivos de raíces transformadas de *Trigonella foenumgraecum* (E); y células en suspensión de *Capsicum* crecidas en biorreactores (F) y desarrollados en el Departamento de Biotecnología y Bioingeniería del CINVESTAV (Calva y Ríos 1999, Peraza et al 2001, Martínez et al 2004).

Plantas transgénicas

Las plantas transgénicas o genéticamente modificadas se generan a partir de células vegetales a las que previamente se les introduce genes modificados o extraídos de otras especies como microorganismos, animales, u otras especies vegetales completamente diferentes y genéticamente incompatibles (Casey 1992, Hammond-Kosack y Jones 2000).

La introducción de estos genes, denominados transgenes, no sería posible usando los métodos de hibridación o cruza usada durante la revolución verde (Vasil 1998, Khush 2001). Estos genes foráneos pueden proporcionar a la planta características y capacidades nuevas, por ejemplo mayor y más rápido crecimiento, rendimiento, productividad, mejores frutos y semillas, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a calor, frío, sequía y salinidad (Niggeweb et al 2004, Davulury et al 2005).

Los métodos más comunes para la transformación de plantas son el uso de bacterias del suelo y la biobalística o bombardeo de tejidos vegetales con partículas cubiertas con el DNA foráneo. El método bacteriano usa *Agrobacterium tumefaciens* o *Agrobacterium rhizogenes* (Park y Facchini 2000). Con el primero se obtiene un tumor celular o callo transgénico, conocido como agalla de cuello o agalla de la corona (Figura 2), mientras que con el segundo el producto es la inducción de raíces aéreas pilosas (hairy roots). En cualquier caso el tejido con el DNA foráneo puede rediferenciarse hasta generar plantas transgénicas con propiedades genéticas, bioquímicas y morfológicas diferentes a la planta madre.

Las plantas transgénicas pueden destinarse a la producción de frutas y semillas mejoradas o como fuente directa de alimento tanto humano como animal. También pueden ser usadas para la obtención de compuestos naturales de importancia farmacéutica e industrial como fármacos, sabores y aromas, o usarse como biorreactores para la producción de nuevas biomoléculas como proteínas, antígenos y anticuerpos (Calva *et al* 2002, Calva y Pérez 2004, Ma *et al* 2005).

Alimentos transgénicos versus medicamentos transgénicos

A diferencia de las plantas transgénicas destinadas a la producción de fármacos y medicamentos transgénicos por la Biotecnología Farmacéutica Vegetal (Calva y Pérez 2004, Ma *et al* 2005), las diseñadas para la producción de alimentos transgénicos por la Biotecnología Agrícola no han sido bien aceptadas por parte de la población, bien representada por grupos ambientalistas y antigenetistas (Rea 2005, Taverne 2005).

La actitud polémica y de desacuerdo expresada por esos grupos sobre la liberación y uso de plantas genéticamente modificadas parece disminuir, y a veces desaparecer, cuando el propósito es la producción de compuestos transgénicos para el tratamiento de enfermedades como cáncer cervical, linfoma, caries dentales, diarreas, deficiencias vitamínicas y vacunas antivirales, entre otras (Calva *et al* 2002, Ma *et al* 2005).

El potencial de las plantas para la producción de fármacos y medicamentos transgénicos a base de proteínas fue reconocido desde que Sijmons *et al* (1990) reportaron la formación de albúmina humana por plantas transgénicas de tabaco y papa transformadas con un gen quimérico de albúmina humana. Desde entonces, más de un centenar de proteínas con potencial terapéutico, tanto de origen humano, animal, bacteriano o de otras plantas, han sido producidas en diversas variedades de plantas transgénicas (Twyman *et al* 2003, Ma *et al* 2005).

No obstante, a pesar de las ventajas que ofrecen los sistemas vegetales o sus cultivos *in vitro* con respecto a los modelos bacterianos y de células animales, como son los niveles de producción, el procesamiento postraduccional, seguridad y control del producto transgénico, los rendimientos, procesos de recuperación y productividad volumétrica aún no son económicamente rentables para su comercialización (Ma *et al* 2005, Twyman *et al* 2005). Sin embargo, esta biotecnología denominada Agricultura Molecular (Molecular Farming), está próxima a competir con varios modelos bacterianos y de células animales usados actualmente para la producción de proteínas transgénicas. El reto actual es mejorar los rendimientos y disminuir los costos de recuperación del producto mediante el uso de nuevos promotores, mejoramiento de la estabilidad de la proteína y disminución de los costos de recuperación.

Paradójicamente, las plantas transgénicas destinadas a consumirse como alimentos o como fuentes de frutas y semillas mejoradas, que tanta controversia e incertidumbre entre la población han provocado, son las que han inundado el mercado mundial desde 1996 en que en Estados Unidos se permitió su comercialización a gran escala (Khush 2001, Taverne 2005).

Dentro de las plantas transgénicas cultivadas a gran escala para ser usadas como directamente como alimentos transgénicos o productos alimentarios destaca el arroz, maíz, trigo, caña de azúcar, soya, algodón, canola, papa, zanahoria, chícharo, jitomate, brócoli, uva, durazno, fresa y sandía (APHIS USDA 2005).

Conclusiones

Sin embargo, aunque las plantas transgénicas representan la alternativa más viable para satisfacer las necesidades de alimentos para las generaciones futuras, estas son menos aceptadas por la población general (Taverne 2005).

Una razón es la presencia de nuevas funciones enzimáticas y bioquímicas, cambios metabólicos inesperados que pueden ocurrir como consecuencia del rearrreglo o pérdida de DNA cromosomal durante el proceso de transformación (Wilson et al 2005). La mayoría de las plantas transgénicas contiene genes que producen compuestos para la resistencia a un herbicida o algún insecto específico, lo que puede finalmente inducir resistencia en otras variedades de plantas y los insectos específicos. Aunque en la mayoría de las ocasiones los efectos de estos cambios no son fenotípicamente evidentes, se ha reportado que a nivel metabólico pueden alterar rutas del metabolismo que conlleven a la biosíntesis de compuestos potencialmente tóxicos o tejidos que producen alimentos con menor valor nutricional que la planta silvestre (Schubert 2005). Para reducir la posibilidad de estos efectos inesperados se ha propuesto que se incorporen protocolos de regulación que demandan estudios sobre el perfil metabólico, pruebas de mutágenos, análisis molecular de los sitios de inserción del DNA foráneo y análisis nutricionales con animales, entre otros.

Otra razón expresada contra la liberación de plantas transgénicas es que estas variedades pueden liberar polen a su entorno y así combinarse con otras variedades por polinización cruzada; este riesgo es particularmente cierto para plantas como maíz y azúcar de caña (Aliberta et al 2005). Además, como ocurrió durante la Revolución Verde, la adopción no planeada de estos cultivos pueden desplazar y finalmente extinguir las variedades usadas tradicionalmente y probablemente también las silvestres (Frisvold y Condon 1998, Uzogara 2000). Es evidente que los cultivos de plantas transgénicas poseen riesgos potenciales para los cultivos tradicionales y el ecosistema, especialmente en sitios donde la agricultura es desarrollada sin control de calidad estricto.

En conclusión, aunque las plantas transgénicas prometen ser la fuente de alimentos y compuestos farmacológicamente activos para el futuro, su liberación y uso debe ser rigurosamente reglamentado y considerar estrictamente los riesgos expresados tanto por científicos como por activistas antigénéticos.

Bibliografía

AITCHISON P. A., MACLEOD A. J., YEOMAN M. M. (1977). Growth patterns in tissue (callus) cultures. En: Street H. E. (Ed.) Plant tissue and cell culture. Blackwell Sci. Publ., Oxford., England. pp. 267-306.

ALIBERTA B., SELLIERA H., SOUVRE A. (2005). A combined method to study gene flow from cultivated sugar beet to ruderal beets in the glasshouse and open field. *European Journal of Agronomy* 23(2): 195-208.

APHIS USDA. Animal and Plant Health Inspection Service. United States Department of Agriculture (2005). Disponible en Internet: <http://www.aphis.usda.gov/brs/status.html>

BHOJWANI S. S., RAZDAN M. K. (1983). Plant tissue culture: Theory and practice. En: Development in Crop Science V. 5. Elsevier Sci., Publ., Co. New York, U.S.A. pp. 1-10.

BHOM H. (1982). The inability of plant cell cultures to produce secondary substances. *Plant Tissue Culture. Proc., 5th. Int. Cong. Plant Tissue and Cell Culture*, pp. 325- 328.

CALVA C. G., RIOS L. E. (1999). Cultivo de callos y acumulación de metabolitos secundarios. En: Rodríguez V. R., Calva C. G., Ramos R. E. G., Salazar M. A. (Eds.) Aspectos aplicados de la biotecnología. pp 267-301.

CALVA C. G., ESPARZA G. F., PÉREZ V. J., MARTÍNEZ J. V. M., SILVA C. S., SÁNCHEZ L. C. (2002). Plantas como biorreactores para la producción de biomoléculas y remoción de xenobióticos. *Avance y Perspectiva* 21: 307-312.

CALVA CALVA G., PÉREZ VARGAS J., PALMA CRUZ F. (2004). Células Vegetales: biorreactores para diseñar y producir biomoléculas y remover compuestos tóxicos. *Tecnocultura* 3(8): 9-13

CARPITA N., MCCANN M. (2000). The cell wall. En: BUCHANAN B., GRUISSEM W., JONES R. (Eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 52-108.

CROZIER A., KAMIYA Y., BISHOP G., YOKOTA T., (2000). Biosynthesis of hormones and elicitors molecules. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 850-929.

CASEY R. 1992. Regulation of gene expression during development. En: Dennis D. T., Turpin D. H. (Eds.) *Plant physiology, biochemistry and molecular biology*. Longman Scientific and Technical. Essex, England. pp. 16-27.

DOERNER P. (2000). Cell division regulation. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 528-567.

DAVULURI G. R., TUINEN A. V., FRASER P. D., MANFREDONIA A., NEWMAN R., BURGESS D., BRUMMELL D. A., KING S. R., PALYS J., UHLIG J., BRAMLEY P. M., PENNINGHS H. M. J., BOWLER C. Fruit-specific RNAi-mediated suppression of DET1 enhances carotenoid and flavonoid content in tomatoes. *Nature Biotechnology* 23(7): 890-895.

FERL, R., PAUL A. L. (2000). Genome organization and expression. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (eds.) *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. USA: American Society of Plant Physiologists, pp. 312-357.

FOWLER M. W. (1982). The large scale cultivation of plant cells. *Progr. Ind. Microb.* 16: 207-229.

FOWLER M. W. (1987). Products from plant cells. En: Bu'lock J., Kristiansen B. (Eds.) *Basic Biotechnology*. Academic Press, M., London, England. pp. 525-544.

FRISVOLD G. B., CONDON P. T. (1998). The convention on biological diversity and agriculture: Implications and unresolved debates. *World Development* 26(4): 551-570.

GAMBORG O. L., MILLER R. A., OJIMA K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp. Cell. Res.* 50:151-158.

HAMMOND-KOSACK K., JONES J. D. G. (2000). Response to plant pathogens. En: Buchanan B., Gruissem W., Jones R. (Eds.) *Biochemistry and molecular biology of plants*. American Society of Plant Physiologists. Rockville, Maryland. USA. pp 1102-1156.

HEIN M. 1998. Plant biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 9: 187-188.

HELLWIG S., DROSSARD J., TWYMAN R. M., FISHER R. (2004). Plant cell cultures for the production of

recombinant proteins. *Nature Biotechnology* 22(11): 1415-1422.

HOLDEN P. R., AITKEN M., LINDSEY K., YEOMAN M. M. (1988). Variability and stability of cell cultures of *Capsicum frutescens*. En: Morris P., Scragg A., Stafford A., Yeoman M. M. (Eds.) Secondary metabolism in plant cell cultures. Cambridge Un. Press., England. pp. 237-243.

KRIKORIAN A. D., BERQUAM D. L. (1969). Plant cell and tissue culture: The role of Haberlandt. *Bot. Rev.* 35(1):59-88.

KHUSH G. S. (2001). Green revolution: the way forward. *Nature Reviews* 22: 815-822.

LINDSEY K., YEOMAN M. M. (1983). The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *J. Exp. Bot.* 34(145):1055-1065.

MA J. K-C., BARROS E., BOCK RALPH, CHRISTOU P., DALE P. J., DIX P. J., FISCHER R., IRWIN J., MAHONEY R., PEZZOTTI M., SCHILLBERG S., SPARROW P., STOGER E., TWYMAN R. M. (2005). Molecular farming for new drugs and vaccines. Current perspectives on the production of pharmaceuticals in transgenic plants. *EMBO reports* 6(7): 593-599.

MARTIN S. M. (1980). Mass culture systems for plant cell suspensions. En: Staba E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press. Inc. Boca Raton. Florida., U.S.A. pp. 149-166.

MARTÍNEZ-JUÁREZ, V. M.; OCHOA-ALEJO N., ARIZA-CASTOLO A., LOZOYA-GLORIA E., ESPARZA-GARCÍA F. J., VILLARREAL-ORTEGA M. L., CALVA-CALVA G. (2004). Specific synthesis of 5, 5'-Dicapsaicin by cell suspension cultures of *Capsicum annum* var. *annuum* (Chili jalapeño chigol) and their soluble and NaCl-extracted cell wall protein fractions. *J. Agr. Food Chem.* 52:972-979.

MURASHIGE T., SKOOG F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15(3):473-497.

NIGGEWEB R., MICHAEL A. J., MARTIN C. (2004). Engineering plants with increased levels of the antioxidant chlorogenic acid. *Nature Biotechnology* 22(6): 746-754.

PARK S., Y FACCHINI P. J. (2000). Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation of opium poppy, *Papaver somniferum* L., and California poppy, *Eschscholzia californica* Cham., root cultures. *J. Exp. Bot.* 51(347): 1005-1016.

PRB Population Reference Bureau (2005). Disponible en Internet: <http://www.prb.org/datafind/datafinder6.htm>

PERAZA-LUNA F., RODRÍGUEZ-MENDIOLA M., ARIAS-CASTRO C., BESSIERE J. M., CALVA-CALVA G. (2001). Sotolone production by hairy roots cultures of *Trigonella foenum-graecum* in airlift with mesh bioreactors. *J. Agr. Food Chem.* 49: 6012-6019.

PETIARD V., BARIAUD FONTANEL A. (1985). El cultivo de células vegetales. *Mundo Científico.* 7(71): 730-736.

REA P. A. (2005). A farewell to bacterial ARMs? *Nature Biotechnology* 23(9): 1085-1087.

RHODES M. J. C., ROBINS R. J., PARR A. J., HAMILL J. (1987). Secondary product formation in plant cell cultures. *J. Appl. Bacteriol. Symp. Suppl.* 105S-114S.

SEABROOK J. E. A. (1980). Laboratory culture. En: Staba, E. J. (Ed.) Plant tissue culture as a source of biochemicals. C.R.C. Press, Inc, Boca Raton, Florida, U.S.A. pp 1-20

SHENK R. A., HILDEBRANDT (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous plant cell cultures. *Can. J. Bot.* 50:199-204.

SIJMONS P.C., DEKKER B.M., SCHRAMMEIJER B., VERWOERD T.C., VAN DEN ELZEN P.J., HOEKEMA A. (1990). Production of correctly processed human serum albumin in transgenic plants. *Biotechnology (N Y)*. 8(3):217-21.

STAFFORD A., P. MORRIS, M. W. FOWLER (1986). Plant cell biotechnology: a perspective. *Enzyme Microb. Technol.* 8(10):578-587.

STREET H. E. (1969). The induction of cell division in plant cell suspension cultures. En: Colloq. Int. C.N.R.S. (Ed.) Les cultures de tissus de plants. Paris., France. pp. 177-93

STREET H. E. (1977). Cell (suspension) cultures techniques. En: Street H. E. (Ed). Plant tissue and cell culture. Blackwell Scientific Publishing., Oxford., England. pp. 61-102.

SCHUBERT D. (2005). *Nature Biotechnology*. 23: (7) 786-787.

TAVERNE D. (2005). The new fundamentalism. *Nature Biotechnology* 23(4): 415-416.

TEMPÉ J., SCHELL J. (1985). La manipulación de las plantas. *Mundo Científico* 7(71):792-801.

TWYMAN R. M., STOGER E., SCHILLBERG S., CHRISTOU P., FISCHER R. (2003). Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology* 21(12): 570-578.

TWYMAN R. M., SCHILLBERG S., FISCHER R. (2005). Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opinion on Emerging Drugs* 10(1): 185-218.

UZOGARA S. G. (2000). The impact of genetic modification of human foods in the 21st century: A review. *Biotechnology Advances* 18: 179-206.

VASIL I. K. (1998). Biotechnology and food security for the 21st century: A real-world perspective. *Nature Biotechnology* 16: 399-400.

WAIN R. L. (1980). El control químico del crecimiento de las plantas. En: Ondarza N. R. (Ed.) Los reguladores de las plantas y los insectos. CONACyT, México. Pp. 13 27

WAREING P. F., AL CHALABI T. (1985). Determination in plant cells. *Biol. Plant.* 27(4-5): 241-248.

WEBSTER J. M. (1966). Production of oat callus and its susceptibility to a plant parasitic nematode. *Nature* 212(5069):1472.

WHITE P. R. (1963) The cultivation of animal and plant cells, 2nd ed. Ronald Press, New York pp 30-44.

Wilson A., Latham J., Steinbrecher R. (2005). Regulatory regimes for transgenic crops. *Nature Biotechnology* 23 (7): 785.

YASUDA S., K. SATOH T., ISHII, FURUYA T. (1972). Studies on the cultural conditions of plant cell suspension

culture. En: Terui G. (Ed.) *Ferment. Technol. Today. Proc. Int. Ferm. Symp. 4th. Soc. Ferm. Tech. Kyoto, Japan.* pp 697-703.

YEOMAN M. M. (1970). Early development in callus cultures. *Int. Rev. Cytol.* 29: 383-409.

YEOMAN M. M., MIEDZIBRODSKA M. B., LINDSEY K., MCLAUCHLAN W. R. (1980). The synthetic potential of cultured plant cells. En: Sala F, Parisi B., Cella R., Cifferri O. (Eds.) *Plant cell cultures: Results and perspectives.* Elsevier/North Holland Biomedical. Press. Amsterdam. pp. 327-343.