



CBYS027800

AVANCE Y PERSPECTIVA

Órgano de difusión del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del I.P.N.

Volumen 16
Enero-febrero de 1997
México ISSN 0185-1411
\$ 15 pesos

XV Aniversario
de la Unidad Irapuato:
genética y biotecnología
de plantas

DEPARTAMENTO DE FISICA

CENTRO DE INVESTIGACION
Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL IPN
(CINVESTAV-IPN)

PROGRAMAS DE POSGRADO

MAESTRIA

DOCTORADO

POSDOCTORADO

FISICA-MATEMATICA Y RELATIVIDAD
FISICA DEL ESTADO SOLIDO
FISICA DE PARTICULAS Y ALTAS ENERGIAS
FISICA ESTADISTICA
FISICA NUCLEAR

BECAS

● **Nacionales:**

Becas para todos los estudiantes admitidos a la maestría y al doctorado (inclusive a los no titulados)

● **Latinoamericanos:**

Informarse en las embajadas de México
sobre el plan de becas Cuauhtémoc del CONACYT

Próximo examen de admisión:

Maestría: 3 y 4 de marzo; 2 y 3 de junio de 1997

Doctorado: Inscripciones abiertas todo el año

Cursos propedéuticos: marzo-junio y junio-agosto de 1997

Departamento de Física, CINVESTAV-IPN

Apdo. Postal 14-740, 07000 México, D.F.

Tels. y Fax: (52-5) 747 7096 (52-5) 747 7097

e-mail: admission@fis.cinvestav.mx

<http://www.fis.cinvestav.mx>



Centro de Investigación
y de Estudios Avanzados del IPN
CINVESTAV

DIRECTOR GENERAL
Adolfo Martínez Palomo
SECRETARIO ACADÉMICO
Manuel Méndez Nonell
SECRETARIO DE PLANEACIÓN
Luis Alfonso Torres
SECRETARIO DE RECURSOS
HUMANOS Y MATERIALES
Leonardo Contreras Gómez

AVANCE Y PERSPECTIVA

DIRECTOR EDITORIAL
Enrique Campesino Romeo
EDITORA ASOCIADA
Gloria Novoa de Vitagliano
COORDINACIÓN EDITORIAL
Martha Aldape de Navarro
DISEÑO Y CUIDADO DE LA EDICIÓN
Rosario Morales Álvarez
APOYO
Sección de Fotografía
del CINVESTAV
CAPTURA
Pilar Moreno
María Gabriela Reyna López
Josefina Miranda López

CONSEJO EDITORIAL

Jesús Alarcón
MATEMÁTICA EDUCATIVA
René Asomoza
INGENIERÍA ELÉCTRICA
Marcelino Cerejido
FISIOLOGÍA
Eugenio Frixione
BIOLOGÍA CELULAR
Jesús González
LAB. DE QUERÉTARO
Luis G. Gorostiza
MATEMÁTICAS
Luis Herrera Estrella
UNIDAD IRAPUATO
María de Ibarrola
INVESTIGACIONES EDUCATIVAS
Eusebio Juaristi
QUÍMICA
Miguel Ángel Pérez Angón
FÍSICA
Juan Carlos Seijo
UNIDAD MÉRIDA
Gabino Torres Vega
FÍSICA

AVANCE Y PERSPECTIVA

BIBLIOTECA
ÁREA BIOLÓGICA
CINVESTAV

XV ANIVERSARIO DE LA UNIDAD IRAPUATO

SUMARIO

Volumen 16

Enero-febrero de 1997

- 3 *Presentación*
Victor M. Villalobos
- 7 *Microorganismos en la agricultura*
Juan Pablo Martínez Soriano, George Vandermark y Víctor Olalde Portugal
- 15 *Los insectos en la biotecnología*
Jorge E. Ibarra y Manuel Vázquez Arista
- 21 *Virus de plantas: ¿terribles patógenos o interesantes modelos de estudio?*
Rafael Rivera Bustamante y Laura Silva Rosales
- 27 *Biología molecular de hongos de importancia agronomía*
Ana María Bailey Moreno, Alfredo Herrera Estrella y José Ruiz Herrera
- 37 *Estudios de la regulación de la expresión genética en bacterias de interés agrónómico*
Ariel Álvarez Morales, Rodolfo Marsch Moreno y Gabriela Olmedo Álvarez
- 43 *Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales: el chile como sistema modelo*
Neftalí Ochoa Alejo y Edmundo Lozoya Gloria
- 53 *Uso de marcadores moleculares en la agronomía*
Azucena Mendoza-Herrera y June Simpson
- 59 *La genética y fisiología molecular en el estudio de las plantas*
Plinio Guzmán y Miguel A. Gómez Lim
- 67 *Transformación genética de plantas*
Luis Herrera Estrella, Alba Jofre y Garfias, Gerardo Argüello y June Simpson
- 75 *Dos aproximaciones a la bioquímica de las plantas*
Alejandro Blanco Labra, Luis E. González de la Vara y Silvia E. Valdés Rodríguez
- 81 *Productos naturales*
Mercedes G. López y Jorge Molina

Portada: Larva de la palomilla dorso de diamante, *Plutella xylostella*, una de las principales plagas de las hortalizas del Bajío.
Foto: Jorge E. Ibarra y Manuel Vázquez Arista, Unidad Irapuato, Cinvestav.

Avance y Perspectiva, órgano de difusión del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, CINVESTAV, es una publicación bimestral. El número correspondiente a enero-febrero de 1997, volumen 16, se terminó de imprimir en noviembre de 1997. El tiraje consta de 8,000 ejemplares. *Editor responsable:* Enrique Campesino Romeo. Oficinas: Av. IPN No. 2508 esq. Cza. Ticomán Apdo. Postal 14-740, 07000, México, D.F. Certificados de licitud de título No. 1728 y de contenido No. 1001 otorgados por la comisión Calificadora de Publicaciones y Revistas Ilustradas de la Secretaría de Gobernación reserva de título No. 577-85 otorgado por la Dirección General del Derecho de Autor de la Secretaría de Educación Pública. Publicación periódica: Registro No. 01603-89, características 220221122, otorgado por el Servicio Postal Mexicano. *Negativos, impresión y encuadernación:* Litográfica HERFAR, S.A. de C.V. Dr. García Diego 45-H, Col. Doctores, México, D.F. *Avance y Perspectiva* publica artículos de divulgación y notas sobre avances científicos y tecnológicos. Los artículos firmados son responsabilidad de los autores. Las instrucciones para los autores que deseen enviar contribuciones para su publicación aparecen en el número enero-febrero de 1997, Vol. 16, pag. 74. Se autoriza la reproducción parcial o total del material publicado en *Avance y Perspectiva*, siempre que se cite la fuente. *Avance y Perspectiva* se distribuye en forma gratuita a los miembros de la comunidad del CINVESTAV y a las instituciones de educación superior. Suscripción personal por un año: \$ 90 pesos.



El Colegio Nacional

Colección de textos

Rubén Bonifaz • Olmecas, esencia y fundación
Carlos Chávez • Hacia una nueva música
Leopoldo García-Colín • Contaminación atmosférica
Antonio Gómez Robledo • Dante Alighieri
Miguel León-Portilla • Raíces indígenas, presencia hispánica
Marcos Mazari • Problemas de la Cuenca de México
Ruy Pérez Tamayo • Burke y Hare y otras historias
Octavio Paz • Blanco
Beatriz de la Fuente • Arte prehispánico funerario
Alfonso Reyes • Animalia

Colección de Obras

José Adem
Salvador Elizondo
Enrique González Martínez
Jesús Kumate
Manuel Martínez Báez
Adolfo Martínez Palomo
Marcos Moshinsky
Ezequiel Ordóñez
Arturo Ronsenblueth
Pablo Rudomín
Gabriel Zaid

**ofrece los títulos de sus miembros
e invita a visitar su Biblioteca**

Luis González Obregón núm. 23,
Centro Histórico,
Tel 789 43 30 Fax. 702 17 79
E-mail: col.nal@mail.internet.com.mx.

La Unidad Irapuato, quince años de liderazgo en la biotecnología e ingeniería genética de plantas y microorganismos

Víctor M. Villalobos

Retrospectiva

Desde sus inicios, la Unidad Irapuato del Cinvestav tuvo como propósitos principales la investigación científica orientada al estudio y mejoramiento de las plantas y la formación de recursos humanos del más alto nivel en sus áreas de competencia. Han pasado quince años desde la creación de la Unidad y se estima pertinente hacer un análisis de su evolución durante esta importante etapa de su existencia.

Orígenes

Diferentes personas influyeron en forma definitiva para que se creara la Unidad en el centro del Bajío Guajuatense. Sin embargo en un análisis resumido se hace mención sólo a aquéllas que influyeron decisivamente en su creación sin pretender con ello ignorar los importantes aportes de tantas personas que ayudaron y continúan haciéndolo para sustentar lo que ahora es la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas.

Tres personalidades del Cinvestav, que ocuparon en su momento posiciones estratégicas, merecen mención especial: el Dr. Manuel Ortega Ortega, el Dr. Héctor Nava Jaimes y el Dr. Alejandro Blanco Labra. Por su visión y entusiasmo en este importante proyecto, recientemente las autoridades y el personal de la Unidad Irapuato les hicieron un merecido reconocimiento. Igualmente se reconoce la importante aportación del

El Dr. Víctor M. Villalobos es director de la Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas del Cinvestav en Irapuato, Gto.



Lic. Enrique Velasco Ibarra, gobernador constitucional del Estado de Guanajuato, quien tomó la decisión de donar el predio y autorizó el financiamiento para construir las instalaciones que ahora disfrutamos. Los gobernadores Lic. Agustín Téllez Cruces e Ing. Carlos Medina Plascencia, en sus respectivas gestiones, favorecieron en forma decisiva a la Unidad. Es digno de resaltarse el apoyo del Sr. Vicente Fox Quesada, quien actualmente está financiando la construcción de un nuevo edificio de laboratorios. De igual forma, los fundadores de la Unidad¹ merecen también nuestro reconocimiento por haber creído en este proyecto.

Objetivos y prioridades

Como ya se indicó fueron dos los objetivos que se le asignaron a la Unidad Irapuato recién formada; uno, el de hacer investigación de frontera para el mejoramiento de los cultivos agrícolas, y el otro, la formación de recursos humanos al más alto nivel, por medio

de su programa de posgrado (ver más adelante). Sin lugar a dudas, el primer objetivo de la Unidad influyó para su establecimiento en la ciudad de Irapuato, por estar localizada en el centro del Bajío, una de las zonas agrícolas más importantes del país. De esta forma, el primer grupo de científicos incorporados a la Unidad inició sus actividades de investigación en 1981, en una casa habitación de la ciudad de Irapuato, aceptando el reto de aportar nuevas herramientas tecnológicas a la mejora de las plantas cultivadas.

La creación de esta Unidad generó muchas expectativas en el sector agrícola por dos razones principales: la primera, por contar en el país con un centro de investigación del más alto nivel, empleando las biotecnologías emergentes; y la segunda, por tener la oportunidad de evaluar, en un escenario real, los promisorios aportes que las nuevas herramientas biotecnológicas podrían hacer al sector agrícola. Esta última razón influyó de alguna manera en las orientaciones que la nueva Unidad debería dar a sus investigaciones y, en consecuencia, determinó el perfil de los científicos mexicanos o extranjeros que deberían contratarse. De esta forma, se crean los primeros laboratorios orientados a microbiología del suelo, cultivo de tejidos vegetales, tecnología de alimentos, fitoquímica y almacenamiento de granos y semillas.

El traslado a las instalaciones definitivas se realizó durante 1986, y se inicia con esto la segunda etapa de la Unidad, orientada a la consolidación de sus líneas de investigación. Como se indicó, esta acción fue posible gracias al generoso aporte del Gobierno del Estado de Guanajuato que financió la construcción de 4000 m² de edificios destinados principalmente a laboratorios, aulas, auditorio y áreas administrativa y de mantenimiento. Durante esta época se consolidaron nuestros dos departamentos: el Departamento de Biotecnología y Bioquímica y el Departamento de Ingeniería Genética de Plantas. Asimismo, durante esta etapa se definieron con más precisión las líneas de investigación que prevalecen hasta la fecha, destacando biotecnología de alimentos, bioinsecticidas, química de productos naturales, mecanismos de defensa de plantas, membranas y bioenergética, fitopatología molecular, transformación genética, cultivo de tejidos vegetales, química de proteínas y ácidos nucleicos, biología molecular de compuestos naturales de plantas, biología molecular del proceso de maduración de

frutos, marcadores moleculares, diferenciación celular en hongos, bioquímica ecológica, ecología microbiana, microbiología molecular y regulación de la expresión genética en plantas y microorganismos².

Programa de posgrado

En el año de 1983 se crea el programa de Maestría y en 1987 el de Doctorado, en la especialidad de Biotecnología de Plantas. No obstante el corto tiempo de existencia de ambos programas, a la fecha la Unidad ha graduado 42 maestros y 21 doctores en ciencias. El programa está incluido en el Padrón de Programas de Posgrado de Excelencia para Ciencia y Tecnología del Conacyt. Otro dato importante relativo a las actividades académicas es que hasta el mes de octubre de 1996 se cuenta con un total de 109 alumnos inscritos, 10 de ellos extranjeros, de los cuales 83 están en el programa doctoral y 26 en el programa de maestría. En la actualidad, el número de profesores de la Unidad Irapuato es de 34, por lo que en proporción un profesor atiende a tres estudiantes, uno de maestría y dos de doctorado.

Investigación

Ya se ha señalado que la investigación se orientó desde sus inicios a la mejora de las especies vegetales cultivadas. Sin embargo, recientemente se han incluido otras nuevas áreas de investigación relativas al estudio de los microorganismos, principalmente a los hongos y a los organismos benéficos como los entomopatógenos. Una de las formas de medir el aporte científico de los investigadores de la Unidad es a través de sus publicaciones. El total de artículos científicos publicados en revistas de prestigio internacional durante sus quince años de existencia hasta octubre de 1996 es de 280. Estas contribuciones son sólo una muestra de los adelantos científicos logrados por los investigadores de la Unidad Irapuato en las diferentes disciplinas y áreas científicas³.

Situación actual

La Unidad Irapuato está en lo que pudiera considerarse su tercera etapa, lo que ha permitido, en forma más determinante, facilitar la transferencia de los resultados de la investigación a los potenciales usuarios. Si bien esta actitud se da por diferentes razones, una de

ellas es la tendencia actual del sector privado a participar en el financiamiento de la investigación científica. También hay que tomar en cuenta que después de quince años de investigación, hoy se pueden destacar algunos proyectos exitosos en el contexto de la transferencia de tecnología.

Aunado a lo anterior, existe la voluntad y la convicción de los investigadores de la Unidad en hacer llegar el resultado o el producto de sus investigaciones a los usuarios potenciales. Es claro que la decisión anterior no va en detrimento de la investigación menos aplicada o investigación básica, que es considerada como esencial para el adelanto de la ciencia en el país y fundamental para el programa de posgrado de la Unidad.

Perspectivas

La Unidad Irapuato se prepara cada vez mejor para continuar ocupando el liderazgo nacional en la biotecnología e ingeniería genética de las plantas y de los microorganismos. Asimismo, comienza a perfilarse como la institución, a nivel latinoamericano, con el más sólido programa de posgrado en estas áreas.

Los investigadores de la Unidad Irapuato estamos conscientes de la gran oportunidad que se nos presenta en los años por venir y que las limitaciones económicas y las restricciones presupuestales pueden convertirse en claras oportunidades para el desarrollo de nuestras investigaciones y de la superación profesional de nuestros estudiantes y egresados. El optimismo aquí expresado se fundamenta en una clara determinación de realizar nuestro trabajo en forma coordinada y complementaria con las otras instituciones de investigación tanto nacionales como internacionales. De igual manera, vemos como una clara oportunidad la de trabajar directamente con las organizaciones de agricultores, dependencias del sector y agroindustriales que se acercan cada vez con mayor frecuencia a nuestras instalaciones y a nuestro personal, para solicitar apoyo científico y asesoría en las áreas de nuestra especialidad. Esta situación ha traído como consecuencia diferentes aportes de recursos económicos para el financiamiento de nuestras investigaciones. Si bien estos apoyos se empiezan a dar en forma modesta, son sin duda actitudes muy significativas, sobre todo si consideramos que el sector agrícola es hoy por hoy el más descapitalizado, además de que

la actividad agrícola ha sido muy poco accesible a las innovaciones tecnológicas. Tal situación comienza a cambiar gradualmente en el entorno de la Unidad Irapuato y el gremio agronómico comienza a participar en forma más decisiva en la aplicación de las herramientas tecnológicas. Por todo lo anterior, se considera que la Unidad Irapuato jugará un papel preponderante en el puente que deberá de construirse entre los generadores de las nuevas biotecnologías y los usuarios potenciales.

La actitud crítica y de autoanálisis de nuestra comunidad científica, nos ha permitido pronosticar cual será el futuro de nuestra Unidad para los próximos quince años. El resultado de estas reflexiones coinciden en la necesidad de hacer una evaluación profunda de nuestras potencialidades y limitaciones para que de esta forma podamos enfrentar eficientemente las responsabilidades que queremos asumir y los retos que implican ocupar un lugar protagónico en estas áreas científicas tan dinámicas y competitivas como son las biotecnológicas.

Consideraciones finales

No obstante que la Unidad Irapuato del Cinvestav cuenta con sólo quince años de actividad, los resultados obtenidos a la fecha justifican ampliamente su razón de ser y retribuyen con sus aportaciones científicas y académicas la confianza que en ella depositaron un número importante de funcionarios, investigadores, agencias donantes, productores y la sociedad mexicana en general.

Los logros obtenidos permiten ver con optimismo el futuro de la Unidad Irapuato, orientada a consolidarse como la institución líder en sus área de competencia. Los logros cosechados a la fecha no pueden ser un mérito exclusivo de toda la comunidad que constituye la Unidad, sino más bien es el de todos los que han formado parte de un proceso armónico entre las instancias y departamentos del Cinvestav, sus autoridades y las demás instituciones nacionales y extranjeras que comparten con nosotros trabajo y reconocimientos. La investigación al más alto nivel seguirá siendo el objetivo de nuestros esfuerzos y la capacitación de científicos jóvenes con una mentalidad crítica, deberá ser la meta de los próximos años⁴.



Notas

1. Dr. Alejandro Blanco Labra, Dr. Octavio Paredes López, Dr. Jorge Molina Torres, Dra. Doralinda Guzmán Ortiz, Dr. Juan José Peña Cabriales, M.C. Silvia Valdés Rodríguez, M. C. Manuel Vázquez Arista, C.P. Carolina Abascal y Sánchez y Sr. J. Refugio Vázquez Pérez.
2. La Unidad Irapuato, edición especial elaborada por la Secretaría Académica, (Cinvestav, 1989), 31 pp.
3. A. Alvarez Morales, *Avance y Perspectiva*, **15**, 151, (1996).
4. Discurso del Dr. Manuel Ortega Ortega. Ceremonia del XV aniversario de la fundación de la Unidad Irapuato. Irapuato, Gto., octubre 18, 1996.

Microorganismos en la agricultura

Juan Pablo Martínez Soriano, George Vandermark, Victor Olalde Portugal.

Introducción

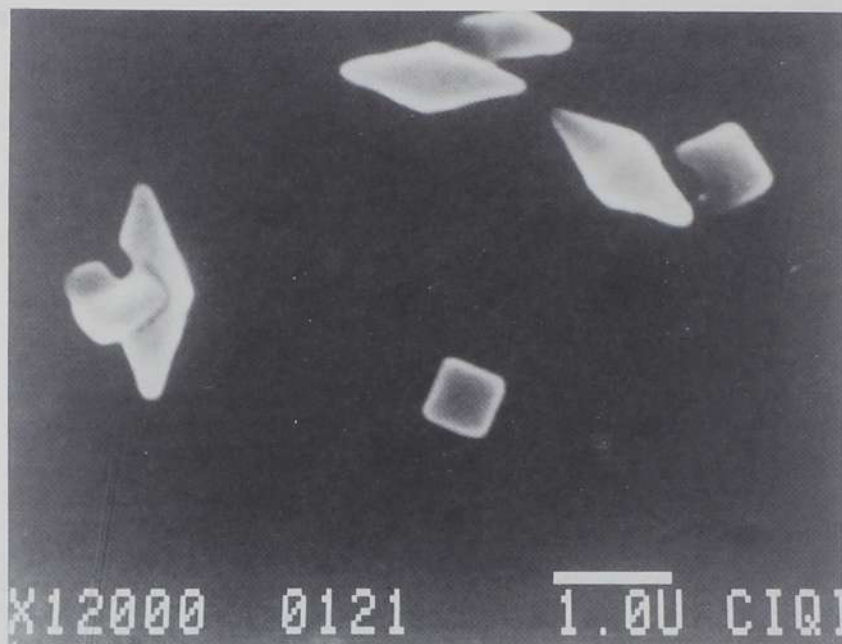
Los microorganismos realizan una serie de funciones que repercuten en la productividad y el mantenimiento del agroecosistema. Las funciones que más se perciben son aquellas que afectan directamente a las plantas. Las plantas se pueden ver dañadas o beneficiadas por su asociación con los microorganismos.

Desde el punto de vista benéfico los microorganismos pueden incrementar el desarrollo y la productividad de las plantas. Estos incrementos pueden deberse, entre otras causas, a la absorción de nutrientes, el control de los enemigos naturales, la disponibilidad de algunos elementos del suelo que normalmente se encuentran de manera insoluble, la mejora de las relaciones hídricas, un aumento en la tolerancia a condiciones adversas, etc.

Los microorganismos pueden reducir el desarrollo y la productividad de las plantas, y en muchas de las ocasiones pueden matarlas. En este sentido, las acciones microbianas pueden ser debidas a la competencia por nutrientes indispensables que se encuentran como limitantes en el suelo, la generación de enfermedades, la eliminación de los organismos antagónicos de los fitopatógenos, o bien a la insolubilidad de algunos elementos.

En el Estado de Guanajuato se presentan condiciones que hacen favorable el estudio de las relaciones

Los autores son investigadores del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato del Cinvestav.



planta-microorganismo debido a que se siembran aproximadamente 63 diferentes cultivos, así como a las condiciones de clima, fertilidad y manejo. Con estas condiciones la gama de relaciones planta-microorganismo que se presenta en el Estado hace difícil la decisión de qué problemas abordar, pero motiva al intelecto a desarrollar un sinnúmero de posibilidades de investigación.

Con esto en mente, en la Unidad Irapuato desde la fecha de su creación se han estudiado las relaciones de las plantas con los microorganismos. En la actualidad, existen tres laboratorios en el Departamento de Biotecnología y Bioquímica en donde se trabaja con microorganismos y que se describen a continuación.

Patología molecular y genética

En este laboratorio las líneas de investigación están dirigidas a atacar problemas agropecuarios de importancia nacional, como lo son amarillamiento letal del cocotero, virosis (Tristeza y *exocortis*) de los cítricos viroides de papa, aflatoxinas en maíz y brucelosis. En estos casos, la Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural ha promovido campañas nacionales de erradicación.

Virosis en cítricos

Las devastaciones que el virus de la Tristeza de los cítricos ha ocasionado en el mundo (solamente en Brasil fueron exterminados 40 millones de árboles) sin duda alguna han provocado enorme preocupación en la citricultura mexicana. Nuestro laboratorio ha obtenido apoyos del CONACyT que nos han permitido instrumentar técnicas de detección y muestreo masivo que produzcan resultados eficientes y rápidos y que en un futuro próximo podrán ser utilizadas para el estudio epidemiológico de las diferentes razas del patógeno y para monitorear el movimiento y dispersión de vectores virulíferos. Otro inconveniente que puede ser salvado por medio de las técnicas de biología molecular es la producción de antisueros para la prueba de ELISA que sólo pueden ser obtenidos multiplicando masivamente el virus en el invernadero (lo que es altamente riesgoso para la citricultura) o importarlo constantemente; la producción de antisueros "recombinantes" es objeto de investigación en este laboratorio.

Otros patógenos que resultarán de extrema importancia en caso de que los portainjertos tengan que ser reemplazados por el advenimiento de la Tristeza son los viroides de los que sobresale el causante de la *exo-*

cortis. El uso de técnicas como electroforesis y PCR (en implementación) permiten el monitoreo de los árboles donadores de yemas y certificados "libres de virosis" y los valiosos bancos de germoplasma.

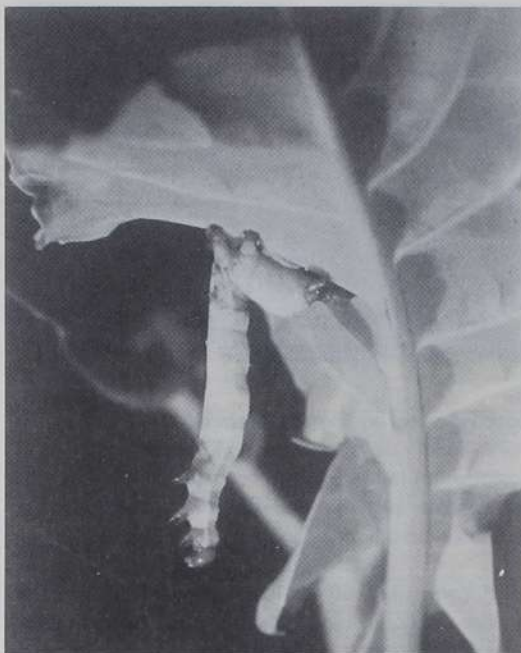
Amarillamiento letal del cocotero

Este patógeno ha destruido las plantaciones de cocotero de la península de Yucatán y avanza continuamente hacia el resto del país. El patógeno no puede ser cultivado *in vitro*, ni existen antisueros que permitan el establecimiento de la técnica ELISA. Nuestro laboratorio ha logrado recientemente la instrumentación de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) que permitirá el monitoreo de la enfermedad y la diseminación del patógeno en malezas alternantes y en vectores alados. Esta investigación apoyará los estudios de mejoramiento genético emprendidos por el CICY y el INIFAP y las campañas nacionales de erradicación.

Inhibición molecular de la biosíntesis de aflatoxinas

Las aflatoxinas son metabolitos altamente tóxicos producidos por hongos imperfectos *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus*. Estos metabolitos son los carcinogénicos más potentes producidos en forma natural; existe, además, una incidencia alta de estos compuestos en alimentos para ganado y consumo humano en todo el mundo. En México la contaminación de aflatoxinas en maíz ha superado las 20 ppb, durante 1989, rebasando así lo permitido por la FDA-USA para el libre comercio de granos.

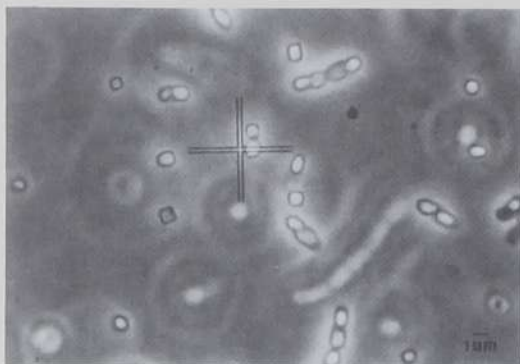
En el cultivo de maíz, el manejo de las prácticas agronómicas tiene un potencial limitado para reducir los niveles de aflatoxinas en el campo; la detoxificación y la remoción absorbida de aflatoxinas de los alimentos contaminados tienen limitaciones prácticas por las restricciones en el uso de estos alimentos. Por lo anterior, mediante técnicas de biología molecular se investigan estrategias de control para la eliminación de la contaminación precosecha mediante la interrupción de la biosíntesis de aflatoxinas. Esta investigación de reciente inicio está enfocada en la integración y caracterización biológica y molecular de un cepario de *Aspergillus spp* representativo de las zonas productoras de maíz de



México, así como la manipulación de los genes reguladores de la ruta biosintética de aflatoxinas para su expresión y regulación en bacterias y levaduras.¹⁻⁴

Control biológico de hongos fitopatógenos

Este laboratorio se dedica al control de hongos fitopatógenos. Tiene dos líneas principales de estudio, la primera es el aislamiento y caracterización de los genes responsables de la producción de un compuesto antifúngico de *Pseudomonas corrugata*. Esta investigación surgió de un proyecto destinado a identificar bacterias del suelo que fueran capaces de controlar la enfermedad producida por *Botrytis cinerea*, que es el agente causal de la enfermedad del moho gris en frutos, ornamentales y vegetales. *B. cinerea* se controla en gran medida mediante la aplicación de fungicidas químicos, pero el uso de estos compuestos genera muchos efectos deletéreos. Estos inconvenientes incluyen el desarrollo de aislados patogénicos con resistencia a diferentes fungicidas, eficacia limitada de los fungicidas, toxicidad a organismos no involucrados, riesgos potenciales para la salud de los que aplican el compuesto debido tanto a la toxicidad o uso in-



adecuado de equipo de protección y la poca disponibilidad que tienen los agricultores debido a su costo, sobre todo en países en desarrollo. Todas estas desventajas sugieren que debe ser encontrado un método alternativo de control de *B. cinerea*.

P. corrugata 5.40 fue identificada en un escrutinio *in vitro* de 1211 aislados bacterianos por su habilidad para inhibir varios parámetros de crecimiento de *B. cinerea*. *P. corrugata* 5.40 inhibió significativamente el crecimiento de *B. cinerea* en diferentes medios de cultivo y, lo que es más importante, inhibió casi completamente la germinación de conidias de *B. cinerea*. Las conidias, como se sabe, sirven como esporas infecciosas en la repetición del ciclo de infección durante el proceso de cultivo, y cualquier control debe inhibir exitosamente la germinación de conidias. *P. corrugata* 5.40 también ha sido probada en su habilidad para controlar la enfermedad del moho gris en fresas cultivadas bajo condiciones de invernadero. El aislado bacteriano controló la enfermedad en dos de tres cosechas de fresas con similar eficacia que *Iprodione*, el fungicida más usado comercialmente en el control de esta enfermedad.

Existen tres posibles aplicaciones en el uso de una bacteria antifúngica en el control de enfermedades de plantas: (1) puede ser directamente aplicada como agente en campo en el control de la enfermedad; (2) el compuesto antifúngico producido por la bacteria puede ser extraído y aplicado en el campo para el control de la enfermedad; (3) los genes responsables de la producción del compuesto antifúngico pueden ser aislados y usados para desarrollar plantas transgénicas que sean resistentes a hongos debido a la producción de un compuesto bacteriano antifúngico.

El uso de agentes bacterianos para aplicaciones en campo es difícil debido a los problemas relacionados con las complejas interacciones ambientales asociadas a las condiciones de campo, tales como la colonización bacteriana pobre en las partes de la planta involucradas debido a competencia, sensibilidad a la luz ultravioleta u otras condiciones adversas de crecimiento. Existe otro problema: la incapacidad para producir el compuesto antifúngico tanto en suficiente cantidad como en el tiempo correcto durante el ciclo de la enfermedad. La revisión de la literatura sugiere que el uso de genes clonados en la producción de plantas transgénicas con resistencia a hongos no ha sido del todo exitosa dado que no existen casos conocidos con niveles aceptables de resistencia. Esto se debe probablemente al complejo control genético de la producción de estos metabolitos antifúngicos. Por estas razones, tal vez la manera más adecuada para explotar exitosamente las ventajas del control biológico en una cepa bacteriana podría ser aislando directamente el compuesto antifúngico para uso directo en campo.

El aislamiento de metabolitos antifúngicos de cultivos bacterianos sería más efectivo si la bacteria pudiera ser modificada para producir cantidades mayores del compuesto. Esto ya se realizó en *Pseudomonas* sp. mediante la identificación de genes responsables de la producción de un compuesto antifúngico y la posterior modificación de la expresión de estos genes, que dio como resultado una mayor producción del compuesto. Este laboratorio está enfocado al aislamiento de los genes de *P. corrugata* 5.40 que son responsables de la producción de un metabolito antifúngico. Este metabolito ha demostrado la habilidad para inhibir el crecimiento de diversos géneros de hongos fitopatógenos, incluyendo *B. cinerea*, *Macrophomina phaseolina*, *Fusarium solani* y *Alternaria solani*.

Algunas mutantes del tipo silvestre de *P. corrugata* 5.40 fueron obtenidas usando transposones Tn5 (elementos transferibles de DNA), los cuales se insertan al azar en el cromosoma bacteriano e inactivan los genes bacterianos localizados en el sitio de inserción. Dentro de estas mutantes fueron identificadas algunas que no pudieron inhibir más el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*. También fue construida una biblioteca de cósmidos del tipo silvestre de *P. corrugata* 5.40. De esta biblioteca se han identificado tres diferentes clones de cósmidos que restablecen el fenotipo de inhibición del crecimiento en una mutante Tn5, que es incapaz de in-

hibir el crecimiento de *B. cinerea*. Estos tres cósmidos contienen insertos genómicos de *P. corrugata* 5.40 que son de alrededor de 25 kilobases de longitud. Actualmente, el laboratorio está realizando los análisis de delección de los cósmidos complementarios con el fin de definir dominios genómicos más discretos que sean responsables del fenotipo antifúngico. Estas regiones de menor tamaño de DNA serán posteriormente secuenciadas y analizadas para determinar la función de los genes aislados. El objetivo final será la posibilidad de modificar la expresión de los genes con el fin de tener una cepa de *P. corrugata* 5.40 que pueda producir mayores cantidades del compuesto antifúngico.

La otra línea de investigación que se realiza en este laboratorio se dedica al análisis genético de la resistencia en sorgo contra el hongo *M. phaseolina*. Alrededor de 1,700,000 ha de sorgo (*Sorghum bicolor* (L.) Moench) son cultivadas anualmente en México, principalmente en los Estados de Tamaulipas, Guanajuato, Jalisco, Michoacán y Sinaloa. El sorgo es un cultivo especialmente importante en México porque puede ser cultivado en suelos marginados que no podrían ser utilizados para la siembra de maíz. Las pérdidas anuales en la producción de sorgo debidas a la pudrición carbonosa del tallo causada por *M. phaseolina* se han estimado entre un 20 a 30% en el Estado de Tamaulipas. Ocho líneas mejoradas de sorgo obtenidas en el INIFAP-Río Bravo, Tam., han sido probadas en su resistencia contra *M. phaseolina*. La tabla 1 muestra que dos de las líneas mexicanas, BAR-B y LRB-210 son tan resistentes como la línea control resistente, SC-599-11E. Se han llevado a cabo cruces dialélicas de 10 líneas y se realizarán ensayos tanto de invernadero como de campo de las 10 líneas parentales y 45 familias F1 para determinar los niveles de resistencia a *M. phaseolina*. Los datos obtenidos serán utilizados para calcular la habilidad combinatoria general (GCA) y la habilidad combinatoria específica (SCA) de las líneas parentales con el fin de realizar la correcta selección de los padres en un programa de mejoramiento. Las poblaciones F2 serán utilizadas para el mapeo por ligamiento de los loci relacionados con el carácter cuantitativo de la resistencia a la enfermedad. *M. phaseolina* causa grandes pérdidas cuando las plantas sufren de estrés hídrico durante la maduración del grano, y es posible que este programa de mejoramiento en la resistencia a la enfermedad en sorgo pueda también resultar en mayores rendimientos bajo condiciones de sequía.^{5,8}

Tabla 1. Comparación de medias del tamaño de lesión de líneas de sorgo mejoradas en la resistencia a la pudrición carbonosa de tallo.

Línea de sorgo	Media de la lesión en tallo* (mm)
SC-599-11E (control)	26.1 a
BAR-B	29.2 ab
LRB-210	31.2 abc
LRB-216	36.9 bcd
LRB-104A	39.5 cd
BAR-A	44.3 de
LRB-63	50.0 ef
LRB-119A	53.4 f
LRB-119B	64.2 g
BTX-623 (control)	65.9 g

Nivel de significancia = 0.05, DMS = 8.5

*Media de 5 plantas/línea, con tres repeticiones

Bioquímica ecológica

En este laboratorio se trabajan dos líneas de investigación que se relacionan con la salud de los vegetales: micorrizas y control biológico. En el caso de las micorrizas se estudian en particular las asociaciones de hongos endomicorrízicos denominados arbusculares y las raíces de plantas de interés económico o ecológico. En especial se realizan ensayos donde se evalúan los efectos benéficos que estos hongos ocasionan en las plantas. Los vegetales micorrizados observan un incremento en su desarrollo y productividad; esto se explica por un aumento en la incorporación de fósforo u otros nutrimentos, estimulación de la fotosíntesis, mejorando las relaciones hídricas, aumentando el vigor de las plantas, o mejorando la capacidad de sobrevivir al momento del transplante.

Diferentes vegetales se manejan en el laboratorio: maíz, chile, papa, mezquite, pastos, tomate, jitomate, nopal y fresa. De manera general, se ha observado que la micorriza estimula la tasa fotosintética, el vigor, la producción de fruto y acorta el ciclo vegetativo. Asimismo, se ha encontrado que las plantas menos manipuladas por la técnica tradicional de fitomejoramiento responden mejor a la inoculación con estos hongos. Desde el punto de vista ecológico estos hongos parecen ser fundamentales para la persistencia de

especies no cultivadas en ambientes poco perturbados por el hombre y resultan básicas en el establecimiento de vegetales dominantes en ambientes extremos, como los áridos, semiáridos y en aquellos donde el fósforo está poco disponible.

Por otra parte, se han llevado a cabo estudios para tratar de comprender el papel de la micoriza en los procesos de aclimatización de plantas producidas *in vitro*. Las plantas producidas por cultivo de tejidos al ser transplantadas al suelo, tienen que adaptarse a su nueva condición fisiológica (cambio de metabolismo heterotrófico a autotrófico), además los estomas no son funcionales cuando se desarrollan por cultivo *in vitro*. Los resultados indican que las micorizas mejoran la adaptación de las plantas durante el proceso de aclimatización.

En cuanto a la segunda línea de investigación, la denominada control biológico, se manejan principalmente bacterias antagonistas de hongos fitopatógenos que tienen como hábitat el suelo. Se manejan dos cultivos principalmente como modelo de estudio, papa y ajo. En el caso de la papa se maneja un control integral de las enfermedades más importantes en este cultivo, la costra negra de la papa, marchitez y tizón tardío cuyos agentes etiológicos son *Rhizoctonia solani*, *Fusarium sp* y *Phytophthora infestans*, respectivamente. Se han aislado bacterias nativas antagonistas de estos patógenos, de ellas se trata de caracterizar los mecanismos de acción que utilizan para inhibir a los hongos y se desarrollan trabajos de su comportamiento en suelo para tratar de ser más eficientes en el control de la enfermedad. Los datos obtenidos a la fecha nos han llevado a realizar investigaciones del comportamiento ecológico de los fitopatógenos. De estos estudios hemos podido demostrar que existe una compleja población de hongos fitopatógenos, con comportamientos diferentes a químicos y bacterias antagonistas, lo que hace que en muchas ocasiones fallen los tratamientos de control. A través de técnicas moleculares se desarrollan estudios más precisos de este comportamiento ecológico, lo que está generando que la taxonomía de estos hongos y su diagnóstico sean más atinados y por lo tanto sea más eficaz la medida de control que se tiene que aplicar.

Los proyectos que se realizan en este laboratorio en general están vinculados con los sectores productivos, como la Asociación de Paperos, los productores de ajo,

fresa, tomate, jitomate, tuna y nopal, con los fitomejoradores de maíz y chile. En cuanto al mezquite, se tiene un convenio con el estado de Guanajuato y los viveristas para inocular y estudiar la relación con los hongos micorrízicos. También se tiene colaboración con la Universidad de Texas A&M, Universidad de Alaska, Horticulture Research International, Departamento de Agricultura de Canadá, la Universidad de Auburn, el Departamento de Física del Cinvestav, la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, el INIFAP y otras instituciones nacionales.⁹

Proyectos de colaboración

Recientemente, y a través de colaboración con la Universidad de Maryland y el INIFAP, fue posible el descubrimiento de un nuevo viroide en papas silvestres originarias de México. Este hallazgo es de gran relevancia debido a las implicaciones evolutivas sobre el origen aún oscuro de los viroides, los patógenos más pequeños descritos hasta la actualidad.

Estudios realizados en colaboración con el Centro de Investigación Biomédica del Noreste-IMSS, la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL y el INIFAP han demostrado que es posible detectar, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) a todas las biovariedades de las especies del género *Brucella*. El diseño de iniciadores y la implementación de la técnica han sido totalmente diseñados en nuestro laboratorio y han permitido que se vislumbre un enorme paso, debido a la sensibilidad y especificidad logradas, para una posible implementación de esta técnica en el diagnóstico de la brucelosis humana y animal. Debido a que la prueba permite la identificación taxonómica hasta nivel de biovariedad en algunas especies, la tecnología discernida podría ser incorporada exitosamente a estudios evolutivos y taxonómicos del género *Brucella* y grupos afines.



Notas

1. J.P. Martínez-Soriano, I.H. Almeyda-León, J. Piña-Razo, M.A. Rocha-Peña y K.F. Byerly-Murphy, *Rev. Mex. Fitopatol.* **12**, 75 (1994).
2. D.S. Leal-Klevezas, A. López-Merino y J.P. Martínez-Soriano, *Arch. Med. Res.* **26**, 263 (1995).

3. D.S. Leal-Klevezas, I.O. Martínez-Vázquez, A. López-Merino y J.P. Martínez-Soriano, *J. Clin. Microbiol.* **33**, 3087 (1995).
4. J.P. Martínez-Soriano, J. Galindo-Alonso, C.J.M. Maroon, I. Yucel, D.R. Smith y T.O. Diener, *Proc. Nat. Acad. Sci.* **93**, 9397 (1996).
5. G.J. Vandemark, *Phytopathology* **85**, 1117 (1995) (Abst.).
6. A.H. Williams, R.J.I. Aguirre, H.R. Rodríguez y M.J.H. Torres, en resúmenes del 11o. Cong. Genética y XV Cong. Nal. de Fitogenética (Monterrey, N.L., México, 1994) p. 494.
7. G.J. Vandemark, M.J. Alvarado-Balleza y R. Hernández-Martínez, resumen en XXVII Congreso Nacional de Microbiología (1996).
8. D.S. Falconer, *Introduction to Quantitative Genetics*. (Longman, 1981).
9. J.A. Balderas-López, S.A. Tomás, H. Vargas, V. Olalde-Portugal, R. Baquero, I. Delgadillo, J.M. Yáñez-Limón, J.J. Alvarado-Gil, J. Frías-Hernández, L. Sheinvar, C. Falconi, M.D. Silva y L.C.M. Miranda, *Forest Product J.* **46**, 84 (1996).
10. D. Acosta-Avalos, J.J. Alvarado-Gil, H. Vargas, J. Frías-Hernández, V. Olalde-Portugal y L.C. de Moura-Miranda, *Plant Sci.*, en prensa.
11. G. Virgen-Calleros, M. Salazar-Godoy, V. Olalde-Portugal, L. Aguilera-Gómez, R. Hernández-Delgadillo, en *Advances in Biological Control of Plant Diseases*, Ed. T. Wenhua, R.J. Cook, A. Rovira (China Agricultural Univ. Press, Beijing 1996).
12. F.T. Davies, Jr., L. Phavaphutanon, S.E. Svenson, S.A. Duray, J.C. Cole, V. Olalde-Portugal, C.E. Meier y S.H. Bo, *Tree Physiology*, en prensa.
13. L. Aguilera-Gómez y V. Olalde-Portugal, enviado a *Rev. Mex. Fitopatol.*
14. J.A. Balderas-López, G. Gutiérrez-Juárez, J.J. Alvarado-Gil, J. Frías-Hernández, V. Olalde-Portugal, L.C.M. Miranda, M.D. Silva, I. Delgadillo y H. Vargas, *Rev. Sci. Instrum.* **67**, 1 (1996).
15. V. Olalde-Portugal y L.I. Aguilera-Gómez, XXVI Congreso de la Ciencia del Suelo (1996).
16. G.L. Basurto-Cadena, V. Olalde-Portugal, M. Vázquez-Arista, G. Virgen-Calleros y E. Hinojosa-Rebollar, en *Harvest and post harvest technologies for fresh fruits and vegetables*, Proc. (Guanajuato, 1995).
17. V. Olalde-Portugal, J. Frías H., L.I. Aguilera G. y Ma. de J. Alvarado B., *Terra* **12**, 323 (1994).
18. Ma. de J. Alvarado B., L.I. Aguilera G., J. Frías H. y V. Olalde-Portugal, *Terra* **12**, 445 (1994).

Comité de Organización

Prof. Jordi Aguila • CNM-UAB, España
Prof. Etienne Bourdeaud'hui • IMEC, Bélgica
Prof. Antonio García • CM-UA, Colombia
Prof. Antonio Leal • INESC, Portugal
Prof. Carlos I. Z. Mammama • CTI, Brasil
Dra. M. Teresa Osés • CNM, España
Prof. Antonio A. Quijano • CeTAD-UNLP, Argentina
Dr. Joaquín Remolina • CINVESTAV, México
Dr. Lorenzo Lija Salas • CINVESTAV, México

Comité de Organización Local

Dr. José Antonio Moreno Cadena
Dr. Pablo Rogelio Hernández
Dr. José Madrid
Dr. Arturo Escobosa
Dr. Sergio Chapa
Dr. Manuel Guzmán Rentería
M. en C. Ernesto Suaste
Dr. Francisco Valdés P.

Comité de Programa

Dr. Rafael Bautista • Colombia
Prof. Alberto Bilotti • Argentina
Prof. Paul Jaspers • Bélgica
Prof. Wilhelmus Van Noije • Brasil
Dr. José Luis Huertas • España
Ing. Jorge Suárez Díaz • México
Prof. René Asomoza Palacio • México
Prof. Luis Vidigal • Portugal

Organismos Financiadores

IBERCHIP, CYTED, CONACYT, IPN,
CINVESTAV, ONCYTs

Los objetivos que persigue la celebración del II Workshop de IBERCHIP son los siguientes:

- Mantener un foro de discusión de todo tipo de actividades ligadas a la microelectrónica.
- Presentar las actividades desarrolladas destacando los resultados que se hayan alcanzado en el último periodo.
- Informar del estado actual y perspectivas de futuro individuales y conjuntas de los participantes.
- Planear, informar y difundir las actividades futuras que se prevén en cuanto a ofertas de servicios.
- Fomentar e incentivar la utilización de la microelectrónica en el ámbito industrial, fundamentalmente en la pequeña y mediana empresa.
- Puesta al día en aquellos temas industriales, científicos o académicos que se consideren de especial interés.
- Exposición de las iniciativas y resultados obtenidos en distintos países, colectivos profesionales, proyectos concretos o grupos de trabajo específicos para aprovechar la experiencia extraída de cada una de ellas.

Mayores informes:

tel (525) 747 7000 ext. 3705

fax: (525) 747 7080

e-mail: iberchip@mvax1.red.cinvestav.mx

19 - 21 Febrero 1997 • CINVESTAV • México, D.F.

Tercer Workshop **IBERCHIP**

Los insectos en la biotecnología

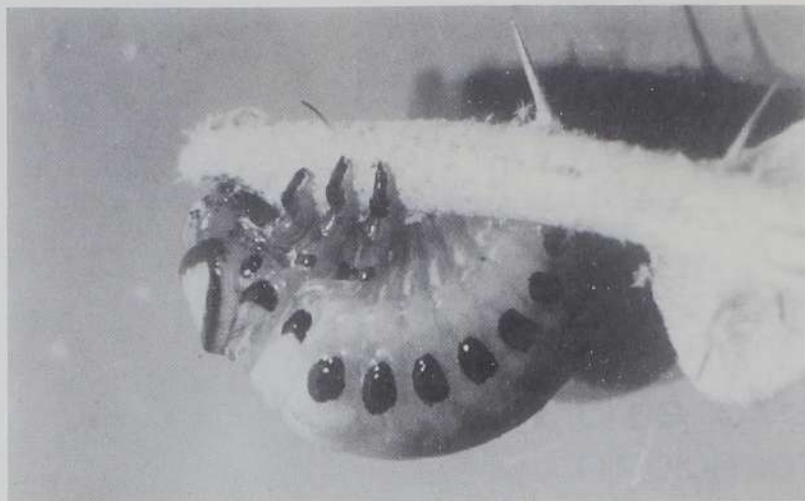
Jorge E. Ibarra y Manuel Vázquez Arista

A mediados de los años 30 se desencadenó una revolución agrícola sin precedentes con el descubrimiento de compuestos químicos altamente tóxicos a las plagas insectiles: los insecticidas sintéticos. Aunque su desarrollo industrial debió contenerse hasta la posguerra, su uso se extendió rápidamente debido a su alta efectividad, confiabilidad, facilidad de manejo, economía y amplia disponibilidad. Su efecto sobre la agricultura extensiva fue tan espectacular que los plaguicidas sintéticos pronto se convirtieron en agentes indispensables en la producción de alimentos.

Los efectos de una solución tan simplista (unifactorial) a los complejos problemas de la interacción planta-insecto no se avizoraron sino hasta más de 20 años después, cuando la "panacea del siglo" dejó ver sus limitaciones (y amenazas). La presencia de insecticidas en una gran cantidad de alimentos, en el agua potable, en la lluvia, en el mar, en las nieves polares, en el plancton, en la leche materna, en la sangre de los niños neonatos, etc., nos indica que sus efectos tóxicos están presentes en toda la biósfera.

La solución a este problema no es sencilla. La población mundial continúa su crecimiento geométrico y, si bien las leyes regulatorias sobre el desarrollo y uso de insecticidas sintéticos se han hecho más estrictas, existe la necesidad infranqueable de producir cada vez más alimentos. En este sentido, se calcula que en los próximos 40 años deberá producirse la misma canti-

Los autores son investigadores del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato del Cinvestav.



Larva de la catarinita *Leptinotarsa texana*, modelo para los estudios toxicológicos con el patotipo III de *Bacillus thuringiensis*.

dad de alimentos que los producidos desde el surgimiento de la agricultura hasta la fecha. Desafortunadamente, en la realidad actual es imposible hacer frente a este reto sin el uso de los insecticidas químicos. Esto nos exhorta a la búsqueda de nuevas alternativas.

Es en este punto donde la biotecnología ofrece un cúmulo de agentes (potenciales y reales) para el control de insectos plaga. En los últimos años, la industria y las agencias gubernamentales han enfatizado su interés por el uso de microorganismos causantes de enfermedades infecciosas en los insectos o entomopatógenos los cuales, al producirse masivamente y formularse, reciben el nombre de bioinsecticidas. Estos agentes patógenos se pueden utilizar de la misma forma como se encuentran en la naturaleza, o bien después de haber sido manipulados genéticamente para mejorar su capacidad insecticida. Los bioinsecticidas muestran potencialidad para reemplazar (o al menos complementar) los tratamientos con insecticidas químicos.

El laboratorio de bioinsecticidas

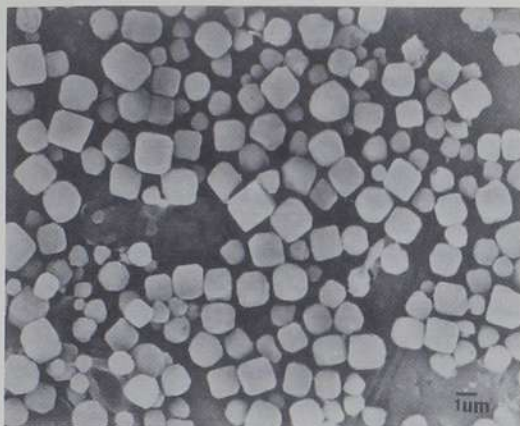
El Laboratorio de Bioinsecticidas de la Unidad Irapuato inició sus actividades en enero de 1989, y su creación obedeció a la necesidad de cubrir una área entomológica, dentro del contexto biotecnológico de la unidad. La combinación de la entomología, la micro-

biología y la biología molecular en el desarrollo de nuevas alternativas para el control de plagas ha permitido crear una área nueva de estudio, integración poco usual por la disimilitud entre estas disciplinas. Desde su inicio, las líneas de investigación de este laboratorio han tratado de equilibrar la investigación básica y la aplicada, interpretando a la primera como el fundamento de la segunda. Estas líneas se han enfocado hacia el estudio y desarrollo de microorganismos que causan enfermedades infecciosas a las plagas insectiles, incluyendo desde el estudio del efecto de genes quiméricos en la expresión y cristalización de proteínas bacterianas con capacidad insecticida, hasta pruebas de efectividad insecticida en el campo de cepas nativas de baculovirus.

Si bien durante su corta historia este laboratorio ha abordado temas relacionados con hongos, protozoarios y, últimamente, nemátodos, las principales líneas de investigación enfocan su atención hacia dos grupos de entomopatógenos: bacterias y virus.

Bacterias entomopatógenas

Dentro del primer grupo se ha dado énfasis a dos especies: *Bacillus thuringiensis* y *B. sphaericus*. La primera especie es ampliamente conocida por su actividad contra diversas especies de lepidópteros (mariposas y palomillas), dípteros (principalmente mosquitos y je-



Cuerpos de occlusión (poliedros) de una mezcla de cepas nativas de virus de poliedrosis nuclear, altamente patógenas al falso gusano medidor de la col, *Trichoplusia ni*.

jenes), y coleópteros (principalmente catarinitas); y existen en el mercado mundial (incluyendo el nacional) una gran variedad de productos comerciales a base de esta bacteria. La segunda especie presenta su efecto insecticida sólo contra mosquitos y los productos comerciales a base de esta bacteria son de reciente aparición. Desde 1989 el laboratorio se dio a la tarea de aislar cepas nativas de ambas especies bacterianas, y en la actualidad cuenta con una colección de cerca de 600 cepas de la primera y 200 de la segunda. Estas cepas han sido sometidas a selección por su actividad insecticida contra especies tan importantes como la palomilla dorso de diamante, el gusano de cuerno del tabaco, el falso medidor de la col; plagas del maíz, como los gusanos elotero y cogollero y dos barrenadores; tres especies de mosquitos vectores de enfermedades al hombre, la broca del café, diversas moscas de la fruta (tefrítidos) y domésticas (múscidos), etc.

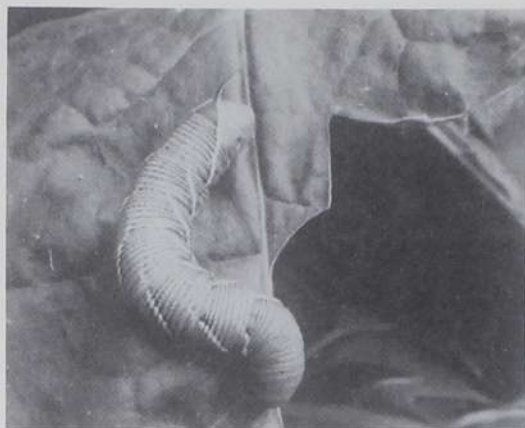
Actualmente se continúa con la selección de estas cepas, pero ahora buscando hospederos atípicos, es decir, insectos que por sus características biológicas no están sujetos a la acción de la bacteria en condiciones naturales, como son los insectos chupadores de savia y/o que presentan condiciones digestivas inadecuadas para efectuar la disolución y activación de los cristales insecticidas. Para tal efecto se ha enfocado la atención a algunas cepas atípicas de esta bacteria, las cuales forman inclusiones cristalinas con morfología y constitución muy diferentes a las conocidas, y que han sido

descubiertas en el transcurso del programa de aislamiento. Tanto las cepas seleccionadas por su alta capacidad insecticida como las atípicas, han sido sujetas a una minuciosa caracterización, tanto para establecer diferencias como semejanzas con cepas conocidas. Esta caracterización incluye diversos parámetros. El más determinante es el establecimiento de los niveles de toxicidad hacia una especie de insecto, a través de la estimación estadística de dosis y concentraciones letales medias. Además, se efectúa un estudio ultraestructural de los cristales insecticidas, a nivel de microscopía electrónica, tanto de transmisión como de barrido. También se determina la composición peptídica de los cristales, por patrones electroforéticos, así como la composición plasmídica de cada cepa en geles de agarosa. En caso de ser necesario, se incluyen análisis tipo *Western* para determinar la semejanza entre proteínas del cristal, así como análisis tipo *Southern* para establecer homologías entre genes que expresan dichas proteínas.

La caracterización de las cepas seleccionadas también ha incluido su serotipificación a nivel de antígenos flagelares, lo cual determina la subespecie a la que pertenece dicha cepa; asimismo, se ha logrado hacer un escrutinio completo de la colección, para seleccionar las cepas productoras de una toxina insecticida alterna no proteica (la beta-exotoxina), y cuantificar sus niveles de producción.

Los resultados de este cúmulo de caracterizaciones ha proporcionado información esencial en la identificación plena de estas cepas, algunas de las cuales han sido publicadas en revistas internacionales, debido a lo novedoso o inusual de muchas de las características encontradas. Ciertas cepas han mostrado propiedades tan singulares, que se han considerado como tipos totalmente nuevos. Más importante aún es el hecho de que se han encontrado cepas con mayor capacidad insecticida que las comercializadas, lo cual refleja su alto potencial para ser desarrolladas y utilizadas como bioinsecticidas.

Entre los estudios básicos realizados en el laboratorio sobre esta bacteria, se incluye la búsqueda de los factores relacionados con la escasa actividad de algunas proteínas del cristal, como alternativa para entender los mecanismos de acción de las proteínas activas. Con estos estudios se ha podido establecer la impor-



Larva de gusano de cuerno del tabaco, *Manduca sexta*, modelo para los estudios toxicológicos con el patotipo I de *Bacillus thuringiensis*.

tancia de la solubilidad del cristal, previa a la activación, y la importancia de pequeños cambios en la secuencia de los genes codificantes de las proteínas insecticidas, ambas sobre la actividad de los cristales. Asimismo, se ha logrado establecer la importancia de determinadas regiones de los genes codificantes de las proteínas insecticidas, en su expresión y cristalización, al elaborar construcciones genéticas quiméricas con fragmentos de genes poco relacionados. También se han estudiado las relaciones toxicológicas entre diversas proteínas de estas bacterias, al medir el efecto de mezclas, tanto *in vivo* (en el insecto completo) como *in vitro* (en cultivos de células). Los resultados de estos estudios han mostrado interacciones novedosas entre estas toxinas, al observar efectos inhibitorios entre ellas. Por otro lado, en la búsqueda de nuevas toxinas bacterianas, se están clonando genes que expresan proteínas cristalinas muy peculiares y, si bien no se ha encontrado actividad contra los diversos insectos probados, existe aún un cúmulo de especies por probar.

Virus entomopatógenos

Las investigaciones realizadas con virus en este laboratorio se limitan al grupo de los baculovirus, que es la familia de virus entomopatógenos más extensamente estudiada, es altamente específica hacia los artrópodos, y tiene un alto potencial como agente de control. Desde los inicios del laboratorio, se estableció un programa de aislamiento de cepas nativas de baculovirus

con patogenicidad hacia el falso medidor de la col, *Trichoplusia ni*, una de las plagas más importantes de las hortalizas de la región. Este programa redituó una serie de aislamientos que fueron sujetos a caracterización ultraestructural, genética, patogénica y bioquímica, de donde se concluyó que existían dos tipos básicos de virus de poliedrosis nuclear en la región, que atacaban a dicha plaga. Estas comparaciones se extendieron hacia cepas relacionadas patológicamente, de diferentes regiones del mundo, llegándose a detectar los inicios de divergencia filogenética entre las cepas. De estos trabajos preliminares se derivaron otros, tanto básicos como aplicados, de consecuencias muy interesantes. Uno de ellos probó que las cepas más virulentas podrían ser utilizadas como alternativa de control en el campo, para lo cual se requeriría del establecimiento de un centro de producción masiva. En los estudios básicos se descubrió una acción sinérgica entre las dos cepas tipo, fenómeno totalmente novedoso entre cepas de virus de poliedrosis nuclear. Además, estos resultados dieron pie a una línea nueva de investigación en el laboratorio: el mejoramiento de baculovirus por manipulación genética.

En la actualidad se están desarrollando en el Laboratorio de Bioinsecticidas virus de poliedrosis nuclear recombinantes, a los cuales se les están integrando genes de toxinas de diversos orígenes, con el objeto de incrementar la virulencia y disminuir el tiempo letal de las cepas silvestres. Asimismo, se realizan las mutaciones puntuales necesarias para cambiar la secuencia de aminoácidos de la poliedrina, proteína que embebe a los viriones, con el objeto de probar su efectividad en la resistencia a los factores ambientales. Estas investigaciones han requerido el establecimiento de técnicas especializadas, como el mantenimiento y cultivo de líneas celulares de insectos, y el desarrollo y utilización de vectores de expresión eucarióticos con el sistema de baculovirus. Estas técnicas marcan una primicia en el país.

Logros y perspectivas

Las perspectivas del laboratorio están encaminadas, tanto al apoyo para el desarrollo de bioinsecticidas a nivel comercial, por parte de la iniciativa privada, como al estudio básico de los microorganismos entomopatógenos. Se planea seguir desarrollando la ma-

nipulación genética de dichos microorganismos con el objeto de mejorarlos como agentes de biocontrol, y para comprender su biología y sus mecanismos de infección.

Pasada la fase de establecimiento del laboratorio, se comenzaron a ver los frutos de la producción científica. Hasta la fecha se han elaborado 13 tesis de licenciatura (nueve graduados) y siete de maestría. Tres tesis han sido distinguidas como la mejor tesis de su tipo: una de licenciatura por la Sociedad Mexicana de Control Biológico, una de maestría por la misma sociedad y otra de maestría por la Sociedad Mexicana de Entomología. Actualmente están adscritos al laboratorio un estudiante de licenciatura, otro de maestría y cinco de doctorado, además de un auxiliar y un técnico. Los resultados de las investigaciones han aparecido en revistas nacionales e internacionales y han sido presentados en ambos tipos de foros.

Fervientes creyentes del trabajo en colaboración, se ha interactuado estrechamente con diversas instituciones nacionales y extranjeras. Cabe destacar entre ellas a la University of California-Riverside, al Boyce Thompson Institute for Plant Research, University of Cambridge, Centro Internacional para el Mejoramiento del Maíz y el Trigo (CIMMYT), Colegio de Postgraduados en Agricultura, El Colegio de la Frontera Sur (ECOSUR), Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR-IPN), Escuela Nacional de Ciencias Biológicas (ENCB-IPN), Universidad de Querétaro, Instituto de Investigaciones en Biología Experimental (IIBE-U. de Gto.). Sus efectos han conducido a la obtención expedita y eficiente de resultados, y al mantenimiento de nexos con grupos líderes.

Desde su inicio en 1989, el Laboratorio de Bioinsecticidas ha contado con el apoyo económico de agencias nacionales e internacionales: World Health Organization, International Atomic Energy Agency, United Nations Development Programme, International Development Research Center (Canadá), United Nations Industrial Development Organization, entre las agencias internacionales, y de agencias nacionales como el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), y diversas compañías de nuestro país y del extranjero.



Figura 1. Corte transversal del intestino medio de la larva de *Prostephanus truncatus*. Note los microvilli (mv). Escala = 20 (μ m).

El laboratorio de post-cosecha de granos

En el medio rural de México y América Central el principal problema de los granos almacenados son los insectos, que provocan daños y pérdidas de consideración. Para el combate de estos insectos los agricultores usan normalmente productos químicos que, además de caros, son peligrosos para la salud y el medio ambiente.

Uno de los objetivos del Laboratorio de Post-cosecha de granos es estudiar el proceso digestivo de los insectos primarios de almacén, tanto de adultos como larvas, para establecer un método de control apropiado sin tener que usar los insecticidas tradicionales. Para conocer el proceso digestivo de los insectos, se hace necesario el uso de:

(a) Microscopía electrónica, para el conocimiento de la estructura externa e interna de los intestinos de los insectos. Por medio de esta técnica se ha podido comprobar que por ejemplo la larva de *Prostephanus truncatus*, un insecto primario para el maíz en el campo y en el almacén, carece de membrana peritrofica (figura 1), la cual sirve entre otras cosas

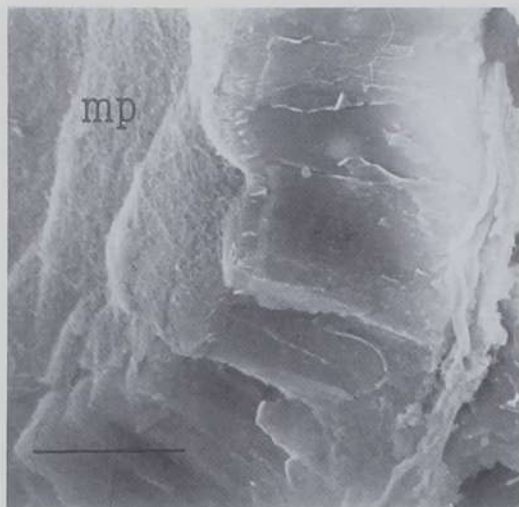


Figura 2. Corte transversal del intestino medio del adulto de *Prostephanus truncatus*. Note la membrana peritrofica (mp) cubriendo los microvilli. Escala = 20 (μ m).

como protección física y microbiana. Esta membrana una vez desarrollada en el estado pupal, es posible encontrarla en el estado adulto (figura 2). Con lo anterior, es posible llevar a cabo el control de este insecto usando inhibidores, que pueden ser de origen natural o bacteriano, para que interfieran en la síntesis de esta membrana periférica, que es de naturaleza quitinosa.

(b) Microbiología, para determinar la presencia de los microorganismos en los insectos. Esto nos lleva a conocer los microorganismos que sean patógenos para poder desarrollar bioinsecticidas y efectuar un control biológico, mientras que los microorganismos no-patógenos nos darán idea del papel fisiológico de éstos en los insectos, así como de su potencial como plagas de los productos agrícolas. Por ejemplo, la presencia de microorganismos celulolíticos, detectados por primera vez, en el tracto digestivo de *Prostephanus truncatus* nos sugiere que este insecto es capaz de mantener poblaciones altas de un ciclo de maíz a otro y de ser una plaga en potencia para cualquier material agrícola.

(c) Bioquímica, para dilucidar el pH de los intestinos y las enzimas involucradas en el metabolismo de los insectos. El conocimiento de estos aspectos bioquímicos nos lleva a percatarnos de las armas biológi-

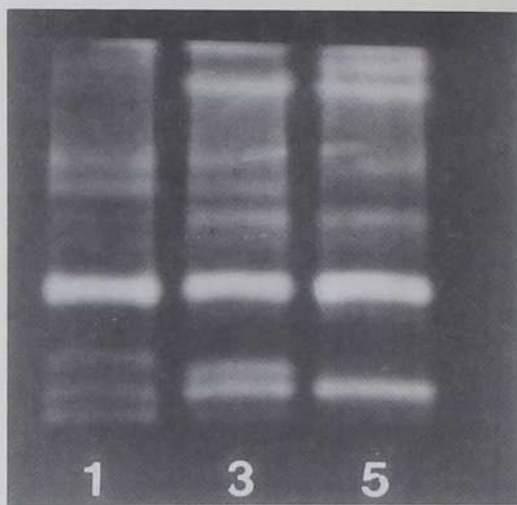


Figura 3. Zimograma con la actividad proteolítica del extracto crudo del intestino de la larva de *Prostephanus truncatus*. (1) *P. truncatus* de México. (3) *P. truncatus* de Togo y (5) *P. truncatus* de Tanzania.

cas con los que están equipados los insectos para el mejor aprovechamiento del alimento y de esta manera también saber el tipo de sustancias que pueden ser empleadas para inhibirlas y posteriormente desarrollar plantas transgénicas con la información específica para su autodefensa. Otro aspecto de interés es el de emplear herramientas bioquímicas con el objeto de clasificar taxonómicamente a los insectos. Por ejemplo, se ha determinado que las proteínas que presentan actividad proteolítica, detectada por zimogramas, es diferente en *Prostephanus truncatus* procedentes de México, Tanzania y Togo (figura 3). Estos insectos presentan características morfológicas similares, haciendo difícil la diferenciación entre ellos.

Los estudios antes mencionados nos llevarán a un mejor entendimiento de la competitividad de los insectos con el hombre por el alimento, así como combatirlos racionalmente elaborando un manejo integrado en el que intervengan, además de productos químicos, productos naturales y la autodefensa de la planta al proporcionarle la información genética necesaria. 

Virus de plantas: ¿terribles patógenos o interesantes modelos de estudio?

**Rafael Rivera Bustamante y
Laura Silva Rosales**

La agricultura está constantemente amenazada por diversas situaciones adversas tanto del tipo biótico: enfermedades y plagas; como abiótico: sequía, heladas, daños mecánicos (granizo, vientos), etc. En el caso de las enfermedades, sobresalen las ocasionadas por virus ya que una vez que una planta se infecta con un virus, no es posible curarla en términos prácticos. Según la definición actual de virus, "paquete de una o más moléculas de ARN o ADN de cadena doble o sencilla normalmente encapsidadas en cubiertas de proteínas o lipoproteínas, el cual es capaz de organizar su propia replicación dentro de una célula hospedera adecuada", su diversidad es bastante considerable. Tan solo en el caso de los virus fitopatógenos, el Comité Internacional de Taxonomía Viral reconoce 45 familias, de las cuales el 80-85% contiene ARN en su genoma y el resto contiene ADN. Desde el punto de vista fitopatológico, dos grupos han destacado por la importancia de los daños ocasionados en la agricultura, los geminivirus y los potyvirus.

En el estudio de los virus se pueden definir fácilmente dos vertientes importantes. Por un lado, el aspecto patogénico, es decir, su caracterización y detección, el diagnóstico de las enfermedades que producen, su epidemiología, su interacción con el organismo receptor y los síntomas que le inducen, etc. Por otro lado, en la historia de las ciencias biológicas también es fácil detectar el impacto que ha tenido el uso de los virus como modelos para estudiar conceptos más básicos. Recuérdense simplemente los trabajos

Los autores son investigadores del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav. En este artículo se utilizan los nombres de los virus en español y las abreviaturas oficiales aprobadas por el Comité Internacional de Taxonomía de Virus, debido a que en algunos casos existen varias traducciones.



genómicos, A y B) que infectan dicotiledóneas (jitomate, chile, tabaco, etc.) y son transmitidos por mosquita blanca (*Bemisia tabaci*).

Aunque hay antecedentes muy antiguos sobre el efecto de geminivirus, no fue sino hasta 1894 que se reportó un estudio sobre el mosaico de la yuca, enfermedad de importancia económica en África causada por el virus africano del mosaico de la yuca (ACMV). A principios del presente siglo se informó sobre los virus del estriado del maíz (MSV), y del enchinamiento apical del betabel (BCTV). Sin embargo la caracterización de algunos de estos virus se logró en la década de los años 70. Estos trabajos sirvieron para que se reconociera oficialmente a los geminivirus como grupo independiente en 1978.

En México, el primer reporte sobre geminivirus en 1978 describió una enfermedad en jitomate con enchinamiento de las hojas, cuyo patógeno fue denominado virus del chino del tomate (CdTV). Sin embargo a finales de la década de los 80, el número de enfermedades asociadas a geminivirus aumentó considerablemente y éstos se volvieron el problema fitopatológico número uno en la horticultura. Los cultivos de chile, jitomate, calabacita, tomatillo, etc. mostraron serios daños en casi todas las regiones del país.

Una de las enfermedades, el rizado amarillo del chile detectada en Tamaulipas, ha sido ampliamente estudiada en nuestro laboratorio. Dos geminivirus involucrados han sido aislados, clonados y caracterizados molecularmente. Uno de ellos fue denominado virus huasteco del chile (PHV) y fue el primer geminivirus caracterizado molecularmente en México.

Desafortunadamente, el número de virus aún sin caracterizar es bastante importante y su diseminación es cada vez más amplia. La diseminación de los geminivirus puede ser explicada por cambios recientes en las condiciones agronómicas, entre ellos: el incremento de las poblaciones de insectos-vectores, la introducción de un nuevo biotipo de mosquita blanca, la aparición de vectores con resistencia a insecticidas, cambios en el patrón de cultivos que favorecen la presencia de cultivos susceptibles durante todo el año e impiden que se rompa el ciclo del vector, etc. Sin embargo, una pregunta importante permanece sin ser contestada: ¿de dónde vienen estos nuevos gemi-

con bacteriófagos (virus de bacterias) que sirvieron para determinar la naturaleza del material genético, para establecer el concepto de ARN mensajero, etc. Más recientemente, algunos virus de animales (SV40, adenovirus, etc.) han sido muy importantes en estudios de regulación de la expresión génica, transducción de señales, etc. En el caso de virus fitopatógenos, la situación es muy similar. En este artículo, presentaremos las líneas de investigación que se están llevando a cabo en la Unidad Irapuato con geminivirus y potyvirus en los dos tipos de enfoque mencionados.

Los geminivirus

Los geminivirus son virus fitopatógenos cuyo genoma está constituido por una o dos moléculas de ADN de cadena sencilla (ADNcs). Su nombre deriva de la morfología de su partícula, ya que vista al microscopio electrónico semeja dos poliedros regulares idénticos unidos por uno de sus lados (geminus = gemelos). De acuerdo con el vector que los transmite, huésped que infectan y estructura genómica, se pueden clasificar en tres subgrupos bien definidos. Los modelos manejados en nuestro laboratorio pertenecen al subgrupo III que está formado por virus bipartitas (dos componentes

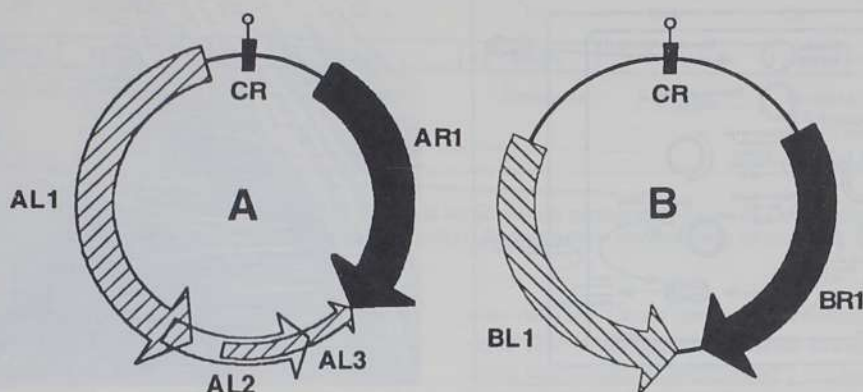


Figura 1. Mapa genómico del virus huasteco del chile. AR1 codifica para la proteína de la cápside. AL1 para Rep, proteína iniciadora de la replicación. AL2 proteína transactivadora de la transcripción. BL1 y BR1 proteínas del movimiento.

nivirus? Una posibilidad es que cada región tenga una población endémica de geminivirus principalmente restringidos a malezas, y sólo recientemente han encontrado las condiciones para invadir cultivos comerciales. La otra alternativa es la introducción interregional de geminivirus. Estudios en nuestro laboratorio sugieren que las dos opciones son posibles. Por un lado, se han caracterizado molecularmente varios geminivirus y se ha verificado que son geminivirus no presentes en ninguna otra área del mundo. No obstante, también se ha notado que algunos de estos geminivirus se han estado diseminando en diferentes áreas del país y en algunos casos reemplazan a las poblaciones locales. Por ejemplo, PHV fue primero detectado en Tamaulipas en cultivos de chile, mientras que en Sinaloa los cultivos de jitomate eran afectados por otros virus (chino del tomate). Recientemente hemos detectado a PHV en todas las regiones tomateras de Sinaloa como virus principal en infecciones mixtas. Esto sugiere que PHV se ha adaptado a este cultivo y ha ido desplazando o formando complejos con los virus previamente identificados en Sinaloa. Esto presenta a PHV como un modelo interesante de estudio tanto a nivel fitopatológico como a nivel molecular.

PHV como modelo en biología molecular

PHV es un geminivirus bipartita (componente A de 2631 bases, y el B de 2589) capaz de infectar chile, to-

mate y tabaco. Su organización genómica es similar a la de otros geminivirus bipartitas (figura 1). La comparación de secuencias génicas de PHV con los de otros geminivirus bipartitas sugiere que PHV puede ser un virus híbrido entre geminivirus del viejo y del nuevo mundo, es decir, algunas proteínas (proteína de la cápside) muestran elevada similitud a proteínas equivalentes de otros geminivirus reportados en América, mientras que otra proteína (Rep) muestra más similitud con las proteínas equivalentes de geminivirus de África y Europa.

Debido a las características de los geminivirus (genoma pequeño de ADN, replicación en el núcleo de la célula vegetal, etc.) hemos decidido utilizar a PHV como modelo para estudiar varios aspectos básicos, por ejemplo, la regulación de la expresión génica en plantas y el movimiento de los virus en las plantas infectadas.

Para estudios de regulación de la expresión se fusionaron los principales promotores virales al gen reportero *uidA* (β -glucuronidasa, GUS) y se obtuvieron plantas transgénicas de tabaco con dichas construcciones quiméricas. Siguiendo la expresión del gen reportero podemos detectar en qué tejidos se encuentran las condiciones apropiadas para que los genes virales se expresen. Por otro lado, podemos ver qué factores externos pueden afectar esa expresión, y finalmente, por medio de delecciones y mutaciones de los promotores podemos detectar qué regiones son importantes en cada caso.

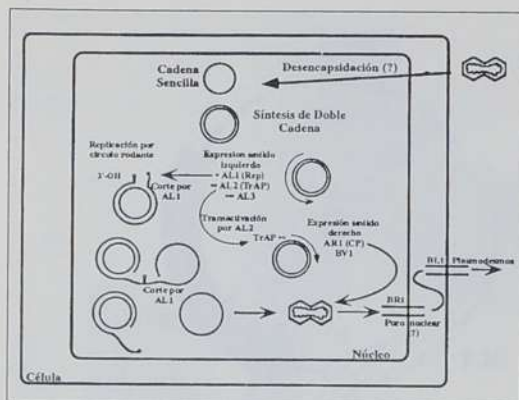


Figura 2. Diagrama del ciclo biológico de un geminivirus. La replicación se lleva a cabo en el núcleo de la célula huésped utilizando el mecanismo de círculo rodante.

Figura 3. Micrografía de partículas del virus del mosaico común del frijol (BCMV) observadas en microscopio electrónico de transmisión con tinción negativa. La longitud promedio de una partícula es de 700-900 nm.

Los resultados muestran que los genes del componente A (proteína de la cápside y Rep) se expresan principalmente en haces vasculares (floema). Asimismo, se encontró una expresión bastante fuerte en los tejidos meristemáticos de la planta. Por otro lado, los promotores de los genes del componente B (proteínas del movimiento) muestran una expresión en mesófilo y haces vasculares secundarios. Esto pudiera sugerir que ambos componentes tienen un origen distinto.

Estudios en otros laboratorios han demostrado que el promotor del gen de la proteína de la cápside puede ser activado por la proteína viral AL2 (TrAP). En el caso de PHV, por medio de análisis teórico-experimentales hemos delimitado el sitio de acción de AL2 al cual denominamos: Elemento Tardío Conservado (CLE, por sus siglas en inglés). Este elemento de ocho bases, GTGGTCCC, fue suficiente para conferir la capacidad de responder a la transactivación por AL2. Sin embargo, parece ser que esta secuencia pudiera tener traslapados otros elementos importantes en la expresión específica de tejido ya que plantas transgénicas que contienen el gen reportero GUS, y un promotor que incluye dos copias de elemento CLE, presentaron una expresión similar a la del promotor completo del cual proviene la secuencia.

Ensayos de mutagénesis han mostrado que el gen de la proteína de la cápside del PHV es dispensable, ya que diversas mutantes del virus en ese gen pueden aun infectar plantas de chile y producir síntomas similares a

los producidos por el virus silvestre, en tiempos igualmente similares. Sin embargo, plantas de tabaco infectadas con algunas de estas mutantes presentaron un retraso considerable en la aparición de síntomas. Estos y otros resultados relacionados sugieren que el PHV tiene dos formas de moverse: una como ácido nucleico sin encapsidarse (aunque probablemente en asociación con otras proteínas), y otra como partículas virales. Además sugieren que en algunas plantas ambos tipos de movimientos son importantes (tabaco) mientras que en otras, el segundo tipo no es requerido.

Los potyvirus

Los potyvirus son el grupo viral que más miembros tiene y por lo tanto son pocos los cultivos que escapan a su infección. Los potyvirus son partículas en forma de varilla flexible (figura 3) y tienen genomas de ARN en sentido positivo con un tamaño de aproximadamente 10,000 bases. El genoma tiene la particularidad de traducirse como una única y grande poliproteína. Esta lleva a cabo su propio procesamiento, por medio de varias proteinasas, para dar lugar a los diferentes componentes proteicos. Las proteinasas son parte de la poliproteína (figura 4). En este sentido, este tipo de virus se procesa en una forma muy semejante al virus de la poliomielitis que infecta a humanos.

Los potyvirus en México no han sido todavía muy estudiados y ésta es una de las razones por las cuales

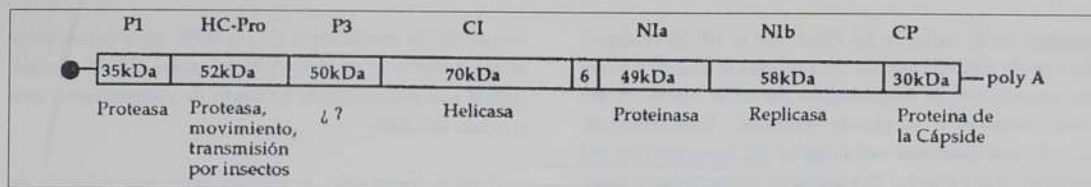


Figura 4. Esquema representando a la poliproteína resultante de la traducción del genoma de ARN del virus del jaspeado del tabaco (TEV). Los pesos moleculares de las proteínas están indicados en cada una de las cajas representando las proteínas. El nombre se indica en la parte superior y su función en la parte inferior.

queremos conocer más sobre su incidencia en diferentes cultivos. Por otro lado, el impacto que causan en varios de los cultivos hace necesario conocer más a fondo sus procesos de replicación e interacción con la planta huésped a fin de poder manipular genéticamente algunos de sus genes y conferir resistencia a los cultivos de interés que infectan.

Los potyvirus que hemos aislado son: el virus del jaspeado del tabaco (TEV) en plantas de tabaco y tomate; el virus del mosaico común del frijol (BCMV) y por último el virus de la mancha anular de la papaya (PRSV). Aun cuando estos tres virus pueden estar presentes en una misma región geográfica, los estragos que causan pueden ser diferentes. Por ejemplo: el BCMV tiene un mayor impacto económico en el centro del país, pero no en la parte norte.

En cuanto al PRSV, el aislado viral de Veracruz es mucho más severo que un aislado de Chiapas. Actualmente estamos en el proceso de extraer, purificar, clonar y secuenciar estos aislados. El propósito práctico de este proyecto, a mediano plazo, es el de obtener papayas transgénicas resistentes al virus de la mancha anular de la papaya. A largo plazo, se piensa en la posibilidad de utilizar el sistema PRSV-papaya y BCMV-frijol como modelos de estudio para entender procesos de la interacción patógeno-huésped; por ejemplo, transmisión del virus a través de semilla. El BCMV puede transmitirse por semilla hasta en un 40% mientras que el PRSV no es transmisible por esta vía.

Potyvirus como modelos de interacción planta-patógeno

Este tipo de estudios ha estado enfocado al sistema TEV-tabaco. Se ha generado un gran número de líneas transgénicas de tabaco que expresan genes no estructu-

rales del TEV. Como resultado del análisis de resistencia al TEV, se encontraron diferentes fenotipos: alta resistencia (inmunidad), susceptibilidad y recuperación (líneas inicialmente resistentes al virus que logran recuperarse de la infección después de un tiempo). Este último tipo de respuesta es la que nos ha llamado en particular la atención. Si bien no es la primera vez que la reportamos, anteriormente la habíamos observado únicamente en plantas transgénicas de tabaco que expresan formas completas del gen estructural de la proteína de la cápside del virus. En plantas transgénicas de tabaco obtenidas recientemente y que expresan genes no estructurales, este fenotipo de recuperación es muy frecuente. La interrogante inicial que nos hemos hecho respecto a este fenómeno de recuperación es: ¿por qué es necesario que el virus esté presente para desencadenar este tipo de respuesta? (recordemos que las plantas carecen de un sistema inmune que contrarreste a microorganismos causantes de enfermedades). Obtuvimos la primera parte de la respuesta haciendo una serie de comparaciones entre plantas recuperadas de la infección (plantas que han estado en contacto con el virus), y plantas que no han sido retadas o inoculadas con el TEV. Observamos que los niveles de transcrito (ARNm) derivado del transgen se ven fuertemente abatidos en aquellas plantas que ya se han recuperado de la infección. Es decir, como requisito para que haya una disminución tanto del mensajero derivado del transgen, como del ARN viral, es necesario que haya una adición de los ARNs provenientes de las dos fuentes, la viral y la transgénica. Esta respuesta quedó confirmada al observar que las velocidades de transcripción de los transgenes de las plantas no retadas y las recuperadas son las mismas.

Posteriormente nos preguntamos, ¿qué papel juega el ARN viral cuando infecta a la planta? Al adicionar el ARN viral es posible que los niveles de ARN mensajeros con una secuencia en particular, la del transgen derivada de la secuencia viral y la de una parte del

genoma viral, suban a tal nivel que la célula huésped detecte de alguna manera esos niveles elevados e inicie un mecanismo de degradación de estos ARNs en exceso haciendo a la planta resistente. Efectivamente, cuando comparamos velocidades de transcripción del transgen entre plantas transgénicas susceptibles y resistentes notamos que las plantas susceptibles tienen bajas velocidades de transcripción y, por lo tanto, la adición del ARN viral no es suficiente para sobrepasar los niveles máximos de ARN aceptados por la célula. En consecuencia el mecanismo de degradación de ARN en exceso no se dispara. Por otro lado, las plantas inmunes tienen elevadas velocidades de transcripción del transgen y, por lo tanto, los mecanismos de eliminación del ARN en exceso ya están encendidos antes de la entrada de ARN viral. Este tipo de mecanismo habla de una forma de regulación genética pos-transcripcional (a nivel de ARN mensajeros).

¿Que componentes estarían formando parte de ese mecanismo? Para que este tipo de respuesta se de en forma rápida (la recuperación es detectable visiblemente a los 10-25 días después de la inoculación viral), se requiere de información que esté previamente disponible en la célula. En este sentido, se ha detectado que hay una enzima en algunas plantas que es la ARN-polimerasa dependiente de ARN (RdRp) y que esta enzima aumenta su actividad considerablemente después de un ataque viral. Esta enzima tiene la particularidad de tomar como molde ARN y al copiarlo polimeriza pequeños ARNc que, una vez sintetizados, pueden permanecer unidos a la secuencia del molde o pueden disociarse y unirse a otros moldes. La consecuencia inmediata de la formación de estas dobles cadenas de ARN, es que actuarían como sustrato para RNAsas específicas de doble cadena. De esta manera, el virus entrante es utilizado como molde por la RdRp y rápidamente eliminado de la célula toda vez que el mecanismo de eliminación de ARN ya ha sido encendido. Este sistema de vigilancia de niveles de ARN está dirigido a secuencias particulares que se sobreexpresan y de aquí que las resistencias observadas al virus sean altamente específicas.

La especificidad de resistencia a los virus es tan alta que al retar la planta con otro tipo de potyvirus (virus Y de la papa), las plantas que ya tienen el sistema de decaimiento de ARN encendido no son resistentes a este nuevo virus que comparte una homología a nivel de

secuencia de nucleótidos de un 80%, sino únicamente al virus del cual se derivó el transgen (TEV). Actualmente nos encontramos tratando de comprobar si este modelo es válido.

Como conclusión, podemos decir que además de tener la posibilidad de diseñar estrategias de protección contra virus, utilizando técnicas de ingeniería genética, tenemos una serie de plantas resistentes a virus que nos abren la posibilidad de estudiar de manera más fina los procesos por los cuales estas plantas son resistentes a enfermedades virales. Además, nos facilita la disección fina de los mecanismos de regulación de genes a diferentes niveles dentro de la célula huésped.



Bibliografía

1. G.R. Argüello-Astorga, R.G. Guevara-González, L.R. Herrera-Estrella y R.F. Rivera-Bustamante, *Virology* **203**, 90 (1994).
2. W.G. Dougherty y J. Parks, *Current Opinion in Cell Biology* **7**, 399 (1995).
3. J.A. Garzón-Tiznado, I. Torres-Pacheco, J.T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella y R.F. Rivera-Bustamante, *Phytopathology* **83**, 514 (1993).
4. L. Herrera-Estrella, L. Silva-Rosales y R. Rivera-Bustamante, en *Plant Microbe Interactions*, G. Stacey y N. Keen, Ed. (Chapman & Hall, Nueva York, 1996).
5. J.A. Lindbo, L. Silva-Rosales, W.L. Proebsting y W.G. Dougherty, *The Plant Cell* **5**, 1749 (1993).
6. L. Silva-Rosales, S. Ruiz-Castro, R. Basurto-Rios, S. Swaney y W. Dougherty, "Proteinase viral gene confers resistance to TEV by an RNA mediated mechanism" (en preparación).
7. O.D. Téliz, A.G. Mora, A.D. Nieto, D. Gonsalves, E. García, L. Matheis y C. Avila, *Rev. Mex. Fitopat.* **9**, 64 (1994).
8. I. Torres-Pacheco, J.A. Garzón-Tiznado, L. Herrera-Estrella y R.F. Rivera-Bustamante, *J. Gen. Virol.* **74**, 2225 (1993).

Biología molecular de hongos de importancia agronómica

**Ana María Bailey Moreno, Alfredo Herrera
Estrella y José Ruiz Herrera**

Hongos y medio ambiente

Los hongos están agrupados en uno de los cinco reinos en los que se han dividido los organismos vivos. Se caracterizan por su tipo de nutrición, su estructura celular eucariótica, su incapacidad fotosintética y la composición química de su pared celular. La importancia de los hongos en la naturaleza difícilmente puede ser sobrevalorada. Dentro de las relaciones que establecen con el medio ambiente podemos señalar los siguientes aspectos:

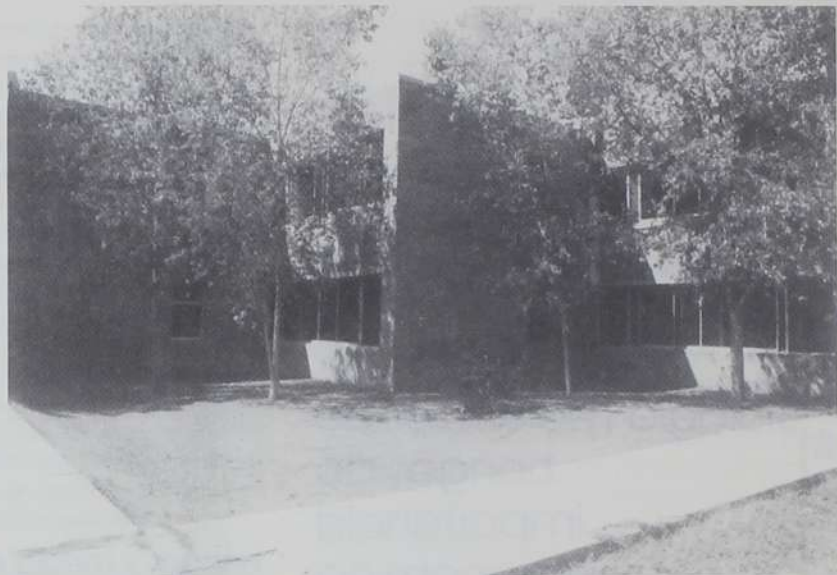
(1) *Biodegradación*. Los hongos destruyen todo tipo de materia orgánica, interviniendo en los ciclos del C, del N, etc.

(2) *Colonización*. Los hongos son los colonizadores más eficientes; invaden y destruyen o afectan a semillas, frutos, objetos, etc. Por otro lado se asocian con raíces de diversas plantas favoreciendo su crecimiento.

(3) *Patogénesis* en animales, incluyendo al hombre. Los hongos causan enfermedades superficiales y profundas, las cuales han adquirido mayor importancia por el uso masivo de antibióticos, y por el advenimiento de condiciones de inmunodeficiencia de distintos orígenes, incluyendo virales como el SIDA.

(4) *Producción de toxinas*. Las variadas toxinas producidas por los hongos están entre las de más alto riesgo. Quizás las más peligrosas sean las aflatoxinas

Los autores son investigadores del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav.



cuya acción mutagénica y cancerígena las hace doblemente temibles. Por ello causan severas pérdidas en la agricultura, ya que los productos contaminados deben ser descartados. Algunos hongos liberan productos tóxicos a la atmósfera.

(5) *Control biológico.* En el otro extremo están los hongos que por su capacidad de atacar y destruir nemátodos, insectos y otros hongos nocivos, pueden ser utilizados como armas para el control biológico de plagas.

(6) *Producción de sustancias y derivados de interés económico.* Diversos hongos son comestibles, lo que los constituye en una atractiva fuente alimenticia. En forma artesanal, diversos alimentos tradicionales como el pozol o el koji, por ejemplo, se obtienen por acción de diversos hongos en varios países. Los hongos se utilizan en la producción de bebidas alcohólicas y destilados. Mediante su capacidad biodegradativa, los hongos se utilizan en la transformación de productos extraños, desechos agrícolas, hidrocarburos, etc. Por medio de otros procesos industriales, los hongos son empleados para la obtención de ácidos orgánicos, vitaminas, antibióticos, enzimas, etc. Finalmente cabe señalar que mediante procesos de DNA recombinante, diversos hongos se están empleando en la actualidad para la síntesis de proteínas heterólogas de diferentes orígenes, incluso humano.

(7) *Patogénesis en plantas.* Los hongos son los principales patógenos de plantas. Atacan a todos los vegetales silvestres y cultivados, su incidencia y persistencia dificultan su control. Debido a esta capacidad, son causantes de severas pérdidas económicas e, indirectamente, de malnutrición y de pérdidas de vidas humanas. Se ha calculado que por su actividad patógena y de destrucción postcosecha, los hongos son responsables de la pérdida de más del 30% de las cosechas en el mundo. Cabe señalar que en la agricultura moderna, algunas prácticas han aumentado el potencial destructivo de diversos patógenos. Dichas prácticas incluyen el uso de plantas genéticamente similares, el uso de cultivares susceptibles a patógenos, y el uso de fertilizantes a concentraciones que incrementan la susceptibilidad de las plantas a enfermedades. Por ello, el control de enfermedades en plantas depende en gran medida del uso de fungicidas. De ahí la importancia de avanzar en el estudio de las relaciones entre los hongos y las plantas.

Diferenciación

Ha sido reconocido que nuestra incapacidad para controlar a los hongos es debida a la escasa investigación que se ha realizado en años recientes sobre sus aspectos básicos, excluyendo los estudios intensivos que se han efectuado con la levadura *Saccharomyces cere-*

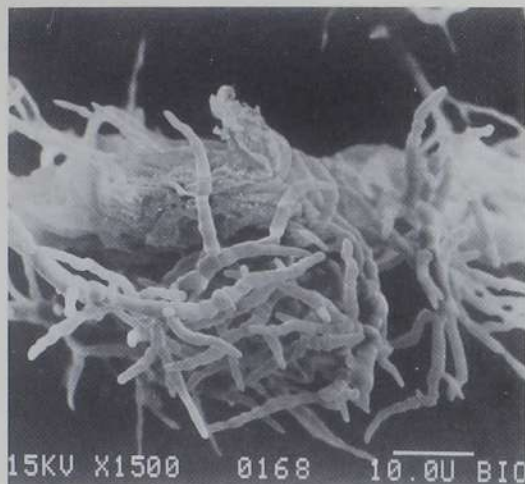


Fig. 1 Micelio de *Ustilago maydis*.

visiae. Esta deficiencia difícilmente puede ser comprendida si se parte del concepto desarrollado por Kluver sobre la bioquímica comparada, donde los hongos han sido empleados precisamente como modelos biológicos en el estudio del metabolismo intermedio, del crecimiento, de los fenómenos de senectud, y los ritmos circadianos. Los estudios con levaduras han sido críticos para nuestro conocimiento del ciclo celular y su regulación; así como de la función génica, a través de los análisis de homología entre proteínas y la clonación en levaduras de genes con función homóloga provenientes de diferentes organismos. Es quizás en el análisis de los fenómenos que son diferentes en los hongos, comparativamente con otros sistemas, y que son los que les dan aquellas características específicas que los hacen ya sea útiles o nocivos, en donde se ha avanzado escasamente en tiempos recientes.

En nuestro laboratorio, en los últimos años hemos analizado diversos aspectos del desarrollo de los hongos y establecido homologías y diferencias con otros sistemas biológicos para comprender los fenómenos de diferenciación y morfogénesis. La diferenciación es el fenómeno mediante el cual las células de un organismo se especializan. El caso de la célula huevo de un animal, a partir de la cual se forman los diferentes tipos de células que constituyen a los distintos tejidos y órganos, es un claro ejemplo de esta capacidad. La morfogé-

nesis es la serie de eventos que dan lugar al desarrollo de un individuo a partir de la célula original. Por sus características, los hongos constituyen modelos simples de estudio para el análisis de estos fenómenos. Su análisis comparativo con organismos superiores puede permitir definir las diferencias más importantes que caracterizan a este grupo de organismos. Por simplicidad en el enfoque del problema y para facilitar su estudio, la diferenciación se puede dividir en cuatro diferentes etapas:

(1) Pecepción del estímulo extracelular que dispara el fenómeno diferenciativo. Para que ocurra este fenómeno se requiere de la existencia de un receptor adecuado en la célula.

(2) Traducción de la información recibida en elementos comunes que puedan ser descifrados por la célula estimulada. Esta fase correspondería a la decodificación de la señal recibida.

(3) Cambio de programa genético. Esta fase involucra el "apagamiento" de algunas funciones celulares, y el "encendido" de otras, lo que permite que la célula se adapte a su nueva fisiología. La regulación de estos fenómenos puede tener lugar a nivel de síntesis de RNA (transcripción), a nivel de síntesis de proteínas (traducción), o a nivel posterior (postraduccion).

(4) Respuesta final. En esta fase ocurren los cambios funcionales y estructurales que permiten a la célula asumir sus nuevas funciones. A nivel celular, esta fase puede ser considerada homóloga con la morfogénesis.

Durante el crecimiento de los hongos pueden distinguirse algunos fenómenos que cumplen con los requisitos de la diferenciación. Estos son: la germinación de las esporas, la esporoferogénesis o formación de estructuras reproductivas, y la esporulación. Todos estos fenómenos pueden ser sexuales o asexuales. Debe citarse además un fenómeno reversible llamado dimorfismo, que es la capacidad que tienen algunos hongos para crecer en forma esferoidal (levaduras), o cilíndrica (micelio), dependiendo de las condiciones ambientales. Este último fenómeno tiene gran importancia ya que la mayoría de los hongos patógenos para el hombre, y muchos fitopatógenos son dimórficos, y presentan distintos patrones de crecimiento en sus fases saprofítica y parásita.

Durante los estudios de la diferenciación realizados por nuestro grupo de investigación hemos manejado distintos modelos y diferentes aspectos, tanto teóricos como de posible aplicación práctica. Los estímulos que desencadenan la diferenciación en los hongos son muy variados, y dependen de cada estadio específico. Por ejemplo, la germinación de las esporas puede ser estimulada por la presencia de nutrientes, por un choque térmico, o por la acción de sustancias específicas. En el caso de las transiciones dimórficas, éstas pueden ser inducidas por choques térmicos, cambios de pH, o nutrientes específicos. El caso de los patógenos humanos es interesante, ya que la morfología del estado patogénico es inducida por un choque térmico de cerca de 37°C, es decir, la temperatura del huésped. Nosotros hemos demostrado que en el patógeno oportunista *Mucor rouxii*, cuya morfología no se afecta en las formas saprófita y parásita, el efector morfogenético es el potencial Redox, además de la represión catabólica¹. *Ustilago maydis*, comúnmente conocido como huilacoché, es un patógeno del maíz el cual crece como levadura haploide en su forma saprófita, y como micelio dicariótico en su fase parásita². Nosotros hemos demostrado que el crecimiento a pH ácido induce la miceliación en la fase haploide saprofítica. El aislamiento de mutantes incapaces de crecer micelialmente en esas condiciones nos ha permitido demostrar la relación que existe entre miceliación y patogénesis, ya que los diploides homocigóticos de dichas mutantes no son patógenos. Estudios preliminares nos han permitido extender esta observación a *Ustilago hordei*, un patógeno importante de la cebada. Estos estudios tienen el interés de que permitirán un análisis más simple de los genes de patogenicidad en éstos y otros hongos relacionados que causan las enfermedades conocidas como "carbones".

Es evidente que la expresión de genes específicos requiere de la acción de factores transcripcionales con alto grado de selectividad, pero nuestros estudios sobre los factores involucrados en el cambio de programa de desarrollo nos han permitido demostrar que las poliaminas actúan como mensajeros generales en este proceso. La inhibición de la síntesis de poliaminas por sustancias que bloquean a la primera, y más regulada, enzima de la cadena biosintética, la ornitina descarboxilasa (ODC), origina la detención de diferentes fenómenos diferenciativos: germinación de esporas, esporulación y transición dimórfica, en todos los hongos

analizados, incluidos los patógenos humanos *Candida albicans* y *Paracoccidioides brasiliensis*, lo que plantea a la ODC como un posible blanco quimioterapéutico. Este bloqueo se elimina por la adición del producto de la ODC, la putrescina. El empleo de mutantes en ODC, ya sea puntuales de *Aspergillus nidulans*, o generados por substitución del gen, en el caso de *U. maydis*, confirmaron estos resultados. Datos preliminares sugieren que las poliaminas regulan la transcripción de genes específicos. El análisis de la producción de micotoxinas en *Aspergilli*, nos ha permitido demostrar su control simultáneo con la diferenciación (esporulación). Esta observación abre nuevas perspectivas para el control de la producción de micotoxinas. Otro factor que hemos reconocido como importante en la expresión selectiva de genes, es el estado de metilación del DNA. Hemos demostrado que la activación de algunos genes durante el desarrollo, como el gen *CUP* de *M. rouxii*, requieren su previa desmetilación. El fenómeno parece ser universal a los hongos, ya que mediante la técnica de AFLP, hemos demostrado la ocurrencia de metilación diferencial del DNA durante la transición dimórfica de *M. rouxii*, *U. maydis* y *Yarrowia lipolytica*.

La morfogénesis en los hongos depende en última instancia del mecanismo de crecimiento de la pared celular, la cual se caracteriza por la presencia de quitina, un polisacárido ausente en plantas y animales superiores, lo cual lo hace otro blanco importante para el control de los hongos³. La pared del micelio crece apicalmente, en tanto que la de las levaduras lo hace casi isodiamétricamente, debido a la deposición selectiva de la quitina. Nuestros estudios previos nos permitieron demostrar que la quitina sintetasa se transporta en microvesículas especializadas, que denominamos quitosomas, a los sitios de crecimiento de la pared. Esta movilización depende de gradientes de calcio cuya destrucción origina el cese inmediato del crecimiento. Análisis por microscopía electrónica de *Phycomyces blakesleeanus* sujeto a fotoestimulación, nos llevaron a concluir que la reacción morfogenética depende de la movilización selectiva de los quitosomas. Utilizando anticuerpos contra la quitina sintetasa estamos estudiando actualmente la vía de movilización de la enzima y los quitosomas en la célula. Por otro lado, nuestros estudios sobre la clonación del gen de quitina sintetasa en *U. maydis* han revelado una familia formada por cuatro genes estructurales, cualquiera de los

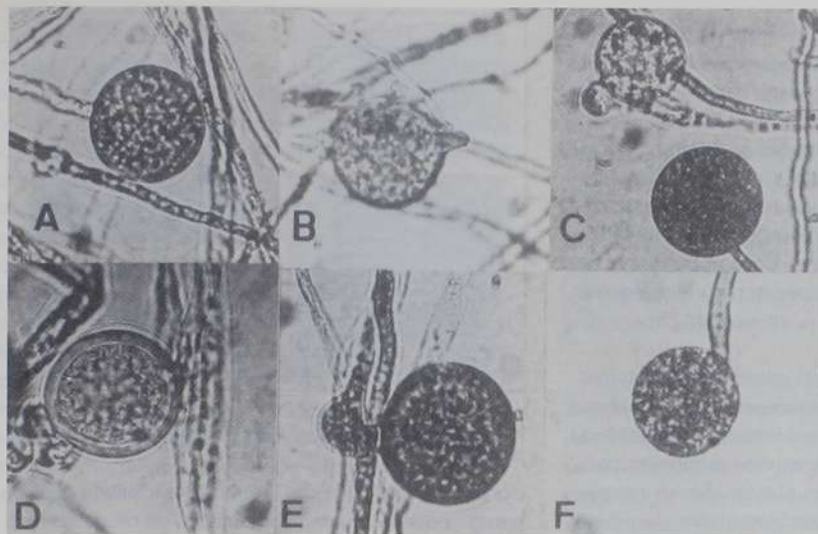


Fig. 2 Esporangios (A, B, C y F); oospora (D) y oogonia con anteridio anfigino (E) de *Phytophthora capsici*.

cuales es dispensable. Este es un fenómeno común en los hongos, cuyas implicaciones funcionales y evolutivas apenas empezamos a vislumbrar. Aunque aún es prematuro elaborar un modelo integral del fenómeno diferenciativo de los hongos, es claro que en un futuro no lejano podremos colocar las distintas piezas del rompecabezas para comprender mejor la biología de estos organismos y diseñar estrategias racionales para su mejor utilización o su control.

Patogénesis en *Phytophthora* spp

Los agentes fitopatógenos han sido causantes de considerables pérdidas en los cultivos a través de la historia de la agricultura; por ejemplo, el tizón tardío de la papa, enfermedad causada por *Phytophthora infestans*, provocó indirectamente el hambre de miles de irlandeses en el siglo pasado.

Se sabe desde hace más de un siglo que en cualquier enfermedad infecciosa se lleva a cabo una serie de eventos sucesivos que propician el desarrollo y la constancia de la enfermedad y del patógeno. A esta cadena de eventos se le denomina ciclo de la enfermedad. El ciclo de la enfermedad incluye los cambios y síntomas que sufre una planta, así como los que se producen en el patógeno. Los eventos principales del

ciclo de una enfermedad incluyen inoculación, penetración, infección, crecimiento, reproducción, dispersión y sobrevivencia del patógeno. En los últimos 30 años se ha dedicado un gran esfuerzo al entendimiento de los procesos que trae consigo la patogénesis en las plantas. A pesar de la información que se ha generado en cuanto a la fisiología de la patogénesis vegetal, aún no se ha llegado muy lejos. Con los adelantos modernos de las técnicas de genética molecular se espera que el progreso en la comprensión de estos eventos se vea acelerado. La comprensión de cómo estos hongos infectan a las plantas es limitada cuando se compara con otros aspectos del desarrollo celular de los hongos. Por otra parte los hongos fitopatógenos son capaces de crecer sobre materiales poliméricos como única fuente de carbono. Esta utilización lleva implícita la secreción de enzimas hidrolíticas. En el caso de las interacciones de los hongos con las plantas se sugiere que las esporas fúngicas y las plantas empiecen a comunicarse mutuamente tan pronto como tienen contacto. De esta forma las señales de la planta pueden disparar la germinación de las esporas fúngicas. Las bases moleculares de tal interacción aún no han sido entendidas. Las señales de la planta también encienden la expresión genética del hongo, permitiéndole penetrar las barreras protectoras del hospedero⁴.

Nuestro modelo de estudio es el hongo *Phyto-*

phthora De Bary (Fig. 2) cuyo nombre deriva del Griego *phyton* por planta y *phthora* por destrucción. El género ha sido muy bien nombrado considerando que todas las especies son patógenas de cultivos de importancia económica. Muchas especies se aíslan de suelo donde atacan raíces; otras de partes aéreas donde causan pudriciones de cuello de tallo, cáncer en troncos, marchitez de ramillas, caída de hojas, marchitez de hojas y pudrición de frutos. Un amplio rango de hospederos es típico de las especies pero hay algunas restringidas a uno sólo, como *P. infestans* en papa.

El desarrollo de un eficiente sistema de transferencia de ADN en *Phytophthora* spp. es esencial para el estudio de los genes que gobiernan especificidad, patogénesis y en el diseño de nuevas estrategias para la obtención de resistencia en plantas. Se ha progresado en este aspecto en el establecimiento de protoplastos regenerables y en la transferencia de ADN a los protoplastos por exposición a polietilenglicol. Con este principio hemos obtenido transformantes estables de *P. capsici* y *P. parasitica* usando plásmidos provenientes de *Ustilago maydis*, patógenos de maíz que codifican para resistencia al antibiótico marcador higromicina B. El desarrollo de un sistema de transformación en *Phytophthora* spp. fue publicado por primera vez por nuestro grupo de trabajo en la revista *Nucleic Acids Research* en 1991⁵.

También se han obtenido transformantes estables evitando la preparación de protoplastos mediante la utilización de la biolística, donde reportamos la eficiente transferencia del ADN a hifas intactas de *P. capsici*, *P. citricola*, *P. citrophthora* y *P. cinnamomi*⁶ (Fig. 3) mediante el uso del sistema de la β -glucuronidasa de *Escherichia coli*. Esta enzima no se detecta en hongos fitopatógenos por lo que su buen funcionamiento en las transformantes resulta muy positivo para el estudio de la expresión génica. Estos resultados son muy importantes en el diseño futuro de estrategias para la obtención de plantas transgénicas menos susceptibles a las infecciones por este importante grupo de patógenos.

Para el estudio de la patogénesis es necesaria la generación de mutantes no patogénicos (Nop) estables y la caracterización de los genes mutados responsables del fenotipo, y con la ayuda de los sistemas de transformación ya disponibles en *Phytophthora* spp. se podrán

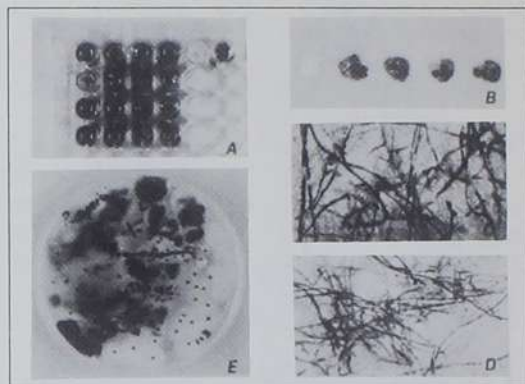


Fig. 3 Expresión del gen *gus* en micelios transformados por biolística.

clonar los genes alterados. Hemos desarrollado una estrategia novedosa para el aislamiento de mutantes Nop mediante la selección *in planta* después de una mutagénesis química⁷. El análisis de las mutantes demostró que la producción de esterases y cutinasa, enzimas que degradan la cutícula de las plantas, están reducidas y que estas mutantes al ser analizadas por electroforesis de campo en pulso tienen alteraciones en el tamaño de los cromosomas. La presencia de polimorfismos en las mutantes químicamente inducidas puede ser correlacionado con los bajos niveles de producción de esterases y cutinasa y con la completa pérdida de la patogenidad. No se habían registrado polimorfismos en mutantes de *Phytophthora* spp. químicamente inducidas.

La reducción en la producción de cutinasa en las mutantes Nop nos sugirió el estudio del gen y su relación en la patogenidad. Genes de cutinasas de otros hongos patógenos ya han sido clonados y sus secuencias reportadas por lo que, utilizando como sonda el gen de cutinasa de *Fusarium solani* f. sp. *pisi*, clonamos el gen de cutinasa de *P. capsici* mediante escrutinios en banco genómico. La clona seleccionada fue secuenciada y comparada con otras cutinasas, y se encontró una elevada homología con la secuencia de *Fusarium s. pisi*. El gen de cutinasa de *P. capsici* fue interrumpido en el sitio de restricción *Bgl*III que se encuentra casi en la mitad del marco de lectura mediante la adición de nucleótidos. Después de corroborar la interrupción mediante secuenciación, se procedió a la transformación de *P. capsici* para mutagenizar. Las mutantes cutinasa menos (*Cut*⁻) fueron seleccionadas

in planta y con el antibiótico higromicina B. Las mutantes nulas fueron crecidas con cutina tritiada y el ensayo enzimático reveló que no tenían actividad de cutinasa. En un ensayo tipo *Southern* pudimos constatar que el sitio *BglIII* no estaba presente en las mutantes y que el patrón de restricción era diferente al de la cepa silvestre. Cuando se probaron las mutantes en su capacidad infectiva el resultado fue que no pudieron infectar chile inclusive cuando se les inoculó dentro de los frutos. Lo que hipotéticamente hubiéramos esperado es que no infectaran a la planta con la cutícula intacta pero una vez eliminada ésta, o hecha una herida, esperábamos que pudieran producir la infección. Los resultados anteriores nos sugieren que la cutinasa en *P. capsici* tiene funciones adicionales al de la penetración, ya que las mutantes no fueron capaces de infectar sin la barrera cuticular.

En la búsqueda de los genes involucrados en la interacción *P. capsici*-chile estamos analizando la expresión diferencial de los genes de micelios inducidos en la presencia de la planta de chile. Después de diferentes tiempos de incubación el micelio se colecta y el ARN total se extrae para hacer reacciones tipo RT-PCR (técnica del display diferencial). Esta técnica ha sido utilizada para identificar y clonar genes expresados durante la diferenciación celular y el desarrollo de otros organismos. Estamos usando γ -ATP porque es más sensible y previene amplificaciones de rARN, problema frecuente con ^{35}S . Nuestro sistema está funcionando y hemos identificado algunos cADN diferenciales a diferentes tiempos de la interacción de *P. capsici* con chile. Nuestro objetivo es la transformación de *P. capsici* con genes expresados diferencialmente y que ya interrumpidos nos permitan encontrar su función en la infección.

Control biológico

Durante los pasados 25 años pocas áreas de investigación dentro de la fitopatología han atraído más interés que el uso de la introducción de microorganismos para el control de fitopatógenos. El gran interés despertado por el control biológico de patógenos de plantas es una respuesta en gran parte a la creciente preocupación de la sociedad acerca del uso de pesticidas químicos. El gobierno de muchos países está cada día más consciente de la problemática de muchos pesti-

das químicos en términos de su impacto en el medio ambiente, así como en los agricultores y los consumidores de productos agrícolas. Recientemente se reportó que más de 70 pesticidas, incluyendo fumigantes de suelo, han sido detectados en aguas del subsuelo en 38 Estados de EUA. Un estudio publicado por la agencia estadounidense de protección ambiental (EPA) indica que tan solo en los Estados Unidos de 3000-6000 casos de cáncer son inducidos anualmente por residuos de pesticidas en alimentos y otros 50-100 por la exposición a éstos durante su aplicación⁸.

Sin embargo, antes de que el control biológico llegue a ser un componente importante en el manejo de enfermedades de plantas, éste debe ser efectivo, confiable, consistente y económico. Para alcanzar estos criterios, se deben desarrollar cepas superiores junto con sistemas de aplicación que incrementen la actividad biocontroladora. Los atributos existentes de control biológico pueden ser incrementados mejorando agentes de biocontrol conocidos, a través de su manipulación genética. Esta puede no sólo incrementar su actividad sino extender su espectro de acción. Además, podemos pensar en los microorganismos con actividad inhibitoria contra patógenos de plantas como fuentes potenciales de genes de resistencia a enfermedades.

Los agentes de control biológico pueden funcionar a través de varios modos de acción como: la antibiosis, el micoparasitismo, la competencia, y la hipovirulencia. Es de primordial importancia conocer la proporción y temporalidad de cada modo de acción que pueda llevarse a cabo. Este tipo de información puede obtenerse de estudios *in vitro* o usando plantas crecidas bajo condiciones gnotobióticas, donde la actividad potencial de estos agentes puede ser valorada. Es importante resaltar que, además de la actividad antagonista, un buen agente de control debe tener la habilidad de sobrevivir en el habitat donde es aplicado. Desafortunadamente se han realizado pocos esfuerzos hacia la selección de características que incrementan la sobrevivencia de los agentes de control biológico. Sin embargo, hoy en día existen varias técnicas desarrolladas por los ecologistas microbianos y la industria de la fermentación para seleccionar y manipular a los organismos benéficos para la sobrevivencia bajo condiciones ambientales pre-establecidas, incluyendo temperatura, presión osmótica, intensidad luminosa y pH. Adicionalmente, una formulación apropiada del producto de



Fig. 4. Enrollamiento típico de *Trichoderma* sobre su huésped *Rhizoctonia solani*.

biocontrol puede proporcionarle larga vida de anaquel, la capacidad de soportar condiciones adversas e inclusive proveerle con los ingredientes necesarios para inducir su actividad específica.

Existen varios ejemplos de micoparasitismo, entre otros, se ha descrito el ataque directo de esclerocios de *Sclerotinia trifoliarum* por *Coniothyrium mintans* y que el micoparásito *Sporidesmium sclerotivorum* atrapa los esclerocios de *Sclerotinia minor*. Un ejemplo de un aspecto diferente de parasitismo fue observado en *Aquillospora pseudolongissima* el cual ataca a la micorriza *Glomus deserticola* (un microorganismo benéfico para las plantas). Sin embargo, la mayoría de los estudios publicados a la fecha se refieren a *Trichoderma* spp. porque éstos atacan una gran variedad de hongos fitopatógenos responsables de las enfermedades más importantes que atañen a las cosechas de mayor importancia económica a nivel mundial. Es por esto que nuestro grupo se ha interesado en entender el mecanismo utilizado por este organismo para atacar y controlar a hongos patógenos de plantas.

Se ha demostrado que *Trichoderma* actúa contra un amplio rango de hongos fitopatógenos transmitidos por suelo y aire. *Trichoderma* ha sido usado en el campo e

invernadero contra pudriciones en un amplio rango de especies, causadas por *Fusarium*, *Rhizoctonia* y *Pythium*, y patógenos formadores de esclerocios como *Sclerotinia* y *Sclerotium*⁹.

Se puede decir que el micoparasitismo por *Trichoderma* es un proceso complejo que incluye una serie de eventos sucesivos. La primera señal de interacción detectable muestra un crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma* en respuesta a algún estímulo en la hifa del huésped o hacia un gradiente de químicos producidos por el mismo. Cuando el micoparásito hace contacto físico con su huésped, sus hifas se enrollan alrededor de este (figura 4) o se le adhieren por medio de estructuras especializadas. Además, se ha demostrado que la interacción de *Trichoderma* con su huésped es específica y que está controlada por lectinas presentes en la pared celular de éste. Recientemente, ha sido posible mimetizar *in vitro* la interacción hongo-hongo usando fibras de nylon recubiertas con una lectina purificada de *S. rolfii*. Tal como sucede *in vivo* durante la interacción, *Trichoderma* reconoció y se adhirió a las fibras recubiertas enrollándose sobre ellas y formando estructuras relacionadas al micoparasitismo¹⁰. Como un paso posterior a estas interacciones el micoparásito penetra al micelio huésped, degradando aparentemente de manera parcial su pared celular. Observaciones al microscopio han permitido sugerir que *Trichoderma* produce y secreta enzimas micolíticas responsables de la degradación parcial de la pared celular de su huésped. Algunos resultados que apoyan esta hipótesis han mostrado que *Trichoderma* produce extracelularmente glucanasas, quitinasas, lipasas y proteasas.

En 1993, nuestro grupo reportó la purificación de una proteinasa secretada por *Trichoderma harzianum* bajo condiciones de micoparasitismo simulado. El gen correspondiente (*prb1*) fue aislado y caracterizado, obteniéndose así por primera vez un gen relacionado con el micoparasitismo. Recientemente hemos demostrado que este gen es inducido durante la interacción hongo-hongo y lo hemos usado para generar cepas transgénicas de *Trichoderma*. Las cepas generadas produjeron hasta 20 veces más proteinasa y una de ellas permitió una incidencia de enfermedad causada por *R. solani* en plántulas de algodón de tan solo un 6% mientras que para la cepa no transformada la incidencia de enfermedad fue de 30%.

Recientemente, se encontró que el sistema quitinolítico de *T. harzianum* es muy complejo y está constituido por dos -(1,4)-N-acetilglucosaminidasas y cuatro endoquitinasas. Todos los miembros del sistema quitinolítico son inducidos durante el crecimiento de *Trichoderma* cuando se usa quitina como única fuente de carbono. Probablemente la enzima más interesante del complejo sea la endoquitinasa Ech42 ya que es capaz de hidrolizar *in vitro* paredes celulares de *Botrytis cinerea*. A la fecha hemos clonado el gen correspondiente (*ech42*) y demostrado que su expresión es inducida fuertemente durante la interacción hongo-hongo.

La expresión de todas las enzimas del sistema micolítico de *T. harzianum* parece estar coordinada. Los datos disponibles sugieren un mecanismo de regulación que involucra inducción por sustrato y represión catabólica. La regulación del sistema ocurre muy probablemente a nivel de inicio de la transcripción como lo indican el hecho de que la síntesis de las enzimas fue detenida por un inhibidor de la transcripción y los análisis de los niveles estacionarios de los mensajeros correspondientes realizados con los genes clonados.

El efecto de las enzimas líticas sobre el huésped ha sido observado usando diferentes técnicas de microscopía. Los sitios de interacción han sido teñidos usando lectinas conjugadas con isotiocianato de fluoresceína o calcofluor, la aparición de zonas de fluorescencia en puntos localizados indica lisis de la pared celular del huésped en los puntos de interacción con el antagonista. Estudios de microscopía electrónica de los estadios tardíos de la interacción de *Trichoderma* con *S. rolfii* o *R. solani* mostraron que las hifas del parásito hicieron contacto con su huésped y digirieron de manera enzimática su pared celular resultando en una rápida vacuolación, colapso y desintegración del mismo. Cabe hacer notar que los niveles de enzimas hidrolíticas producidos son diferentes para cada interacción parásito-huésped analizada. Este fenómeno se correlaciona con la habilidad de cada aislado de *Trichoderma* para controlar un patógeno específico. Sin embargo, la especificidad de *Trichoderma* no puede explicarse por una simple diferencia de actividades enzimáticas, ya que aislados no-antagonistas de *Trichoderma* producen niveles significativos de enzimas líticas, a pesar de ser más bajos. Esta observación

apoya la idea de que el reconocimiento es un factor importante en la actividad parasítica de *Trichoderma*. Así, se puede decir que el proceso micoparasítico incluye las siguientes etapas: (i) crecimiento quimiotrópico de *Trichoderma*, (ii) reconocimiento superficial del huésped, (iii) secreción de enzimas, (iv) penetración de las hifas y (v) lisis del huésped. Dentro de nuestros intereses actuales, está el establecer qué tipo de comunicación existe entre diferentes cepas de *Trichoderma*, así como qué tipo de señales determinan la expresión de genes relacionados con el micoparasitismo y cómo se transmiten al interior de la célula.

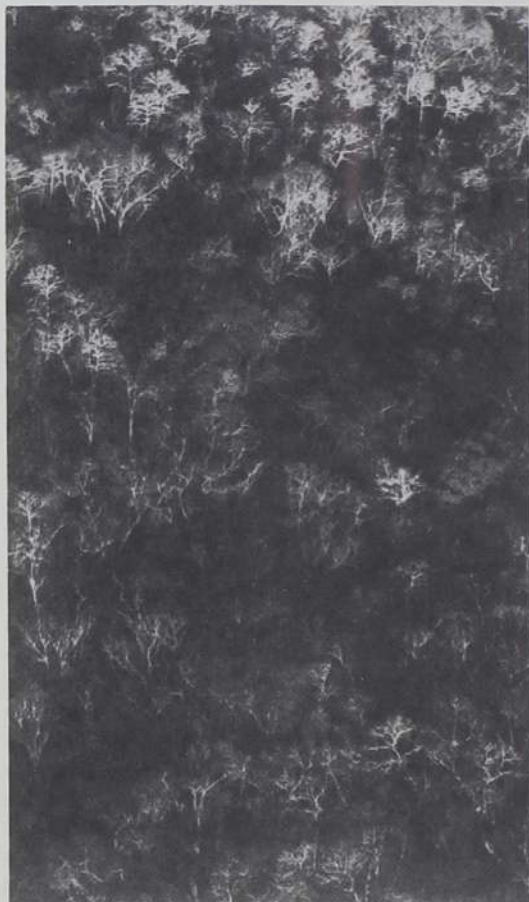


Notas

1. R. Salcedo-Hernández, y J. Ruiz-Herrera, *Experimental Mycology*, **17**, 142 (1993).
2. J. Ruiz-Herrera, C.G. León, L. Guevara-Olvera, y A. Cárabez-Trejo, *Microbiology*, **141**, 695, (1995).
3. J. Ruiz-Herrera, *Fungal Cell Wall. Structure, Synthesis and Assembly*. (CRC Press. Boca Ratón. Florida, EUA, 1992).
4. P.E. Kolattukudy, en *Molecular signals in plant-microbe communications*. Ed. Verma, D.P.S. (CRC Press. Boca Ratón, Florida, EUA 1994). p 65.
5. A.M. Bailey, G. Mena, y L. Herrera Estrella, *Nucl. Acid Res.* **19**: 4273, (1991).
6. A.M. Bailey, G. Mena, y L. Herrera Estrella, *Curr. Genet.* **23**, 42, (1993).
7. G. Mena, C.I. Muñoz, P.Guzman, y A.M. Bailey, *Phytopathology* **84**, 502, (1994).
8. M.A. De Waard, S.G. Georgopoulos, D. W. Hollomon, H. Ishii, P. Leroux, N.N. Ragsdale, y F.J. Schwinn, *Annu. Rev. Phytopathol.* **31**, 403, (1993).
9. I. Chet, en I. Chet (Eds.), *Innovative Approaches to Plant Disease Control*, (Wiley & Sons, Nueva York, p. 137, (1987).

10. J. Inbar y I. Chet, *J. Bacteriol.*, **174**, 1055 (1992).

11. C. Carsolio, A. Gutiérrez, B. Jiménez, M. Van Montagu y A. Herrera-Estrella, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **91**: 10903, (1994).



Estudios de la regulación de la expresión genética en bacterias de interés agronómico

Ariel Alvarez Morales, Rodolfo Marsch Moreno y Gabriela Olmedo Alvarez

Las bacterias han sido y siguen siendo modelos de estudio esenciales para el desarrollo de la biología molecular que han derivado conocimientos universales, que van desde la demostración del DNA como material hereditario hasta desentrañar procesos biológicos fundamentales, como la replicación del DNA. El grupo dedicado al estudio de bacterias en el Departamento de Ingeniería Genética de Plantas utiliza básicamente dos modelos de trabajo: *Pseudomonas syringae* y *Bacillus subtilis*. ¿Cuál es la importancia de estos dos géneros bacterianos en la agricultura? Los *Bacilli* son bacterias que abundan en la tierra; aun cuando no entendemos todavía la función de la mayoría de ellas, para otras sí se han encontrado aplicaciones biotecnológicas diversas, incluyendo el control biológico de plagas insectiles (*B. thuringiensis* y *B. sphaericus* son quizás los ejemplos más conocidos). Otros ejemplos son *B. subtilis* y *B. pumilus*, las cuales se usan para controlar enfermedades de plantas causadas por hongos. Dentro del género *Pseudomonas*, además de un gran número de especies benéficas se encuentran muchas especies patógenas para plantas de interés agrícola.

Las líneas de trabajo en nuestro grupo son diversas pero tienen en común tratar de entender algunos aspectos de la regulación de la expresión genética. La expresión de un gen tiene múltiples puntos de control que abarcan desde factores que controlan la iniciación de la transcripción para la síntesis del RNA mensajero hasta su traducción y posterior degradación. Comprender

Los autores son investigadores del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav.



der los procesos de expresión genética en estas bacterias es esencial para diseñar estrategias de manipulación aplicables al control biológico.

Pseudomonas syringae como modelo de estudio de la interacción planta patógeno

El conocimiento completo de los agentes causales de plagas y enfermedades de plantas es de vital importancia para buscar y diseñar estrategias y lograr el control de las enfermedades en los cultivos, por lo que resulta indispensable estudiar, a nivel molecular, los microorganismos causales de las infecciones, la relación entre la planta y el patógeno, y los eventos sucesivos que se llevan a cabo durante el desarrollo de la enfermedad, así como los mecanismos por los que se producen.

El frijol es un alimento básico para el pueblo mexicano, por lo que en nuestro país es conveniente, si no indispensable, estudiar los agentes microbianos que causan enfermedades en este cultivo. Entre éstos, se cuenta a *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (*P. s. phaseolicola*), que causa el tizón de halo del frijol, caracterizado por la formación de lesiones necróticas de aspecto acuoso, rodeadas de un halo clorótico en las hojas y vainas, y que causa la muerte de la planta por la producción de una toxina. Esta bacteria causa pérdidas importantes en los cultivos de frijol y ejote, por lo que la hemos tomado como el modelo de estudio de la biología molecular de la patogenicidad y la virulencia de bacterias fitopatógenas. Además de que ahora se reconoce que las bacterias fitopatógenas utilizan mecanismos comunes para invadir y causar enfermedad,

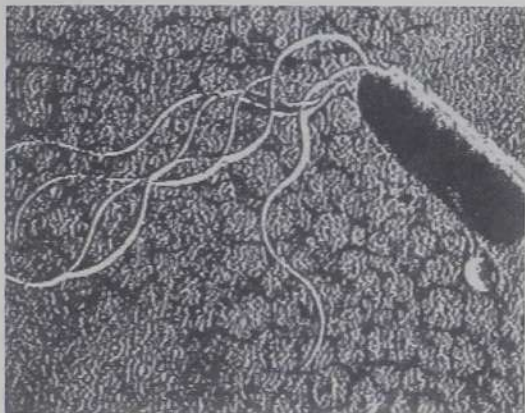
los descubrimiento que se han hecho y se harán en este campo con una bacteria, se pueden extrapolar a otras bacterias.

Una de las razones para estudiar la biología molecular de la patogénesis de *P. s. phaseolicola* es dilucidar los eventos moleculares que se llevan a cabo en la relación planta-bacteria fitopatógena, que se inicia en el momento en que los organismos entran en contacto. Cuando la bacteria inicia su interacción con una planta (susceptible o no) se encuentra en un medio diferente al que estaba acostumbrada; la presión osmótica es diferente, hay fructosa y otra gran variedad de metabolitos, algunos de ellos relacionados con la defensa de la planta, de tal manera que la bacteria, para poder establecerse, deberá expresar la información genética pertinente que le permita adherirse (fimbrias o pili), dirigirse (quimiotaxis), penetrar (vg., por heridas), modificar su entorno (exopolisacáridos), invadir y (o) matar (toxinas) a la planta; por el lado de la planta, ésta también es capaz de reconocer la presencia del patógeno, expresando a su vez la información adecuada para responder al estímulo producido por éste; por ejemplo, sintetizando metabolitos de defensa. Estos fenómenos forman lo que se podría denominar "una conversación bioquímica" entre la bacteria y la planta, y el resultado final será la infección y probable muerte de la planta o la destrucción del patógeno por medio de reacciones de hipersensibilidad.

El estudio de los genes involucrados en la conversación bioquímica y la determinación de los mecanismos genéticos que los regulan, ayudará a comprender cuál es el mecanismo por el que una bacteria fitopatógena, como *P. s. phaseolicola*, puede infectar, invadir y matar una planta, y permitirá también buscar estrategias de protección para evitar las pérdidas en los cultivos.

Herramientas moleculares para la identificación y análisis de genes de patogenicidad

Uno de los enfoques más utilizados en la actualidad para el estudio de estos patógenos es mediante la mutagénesis con transposones (elementos móviles), como el transposón 5, con el que se pueden mutar y etiquetar los genes de interés.



Para el estudio de *P. s. pv. phaseolicola* hemos construido herramientas genéticas derivadas del Tn5¹. En el Tn5-cat se substituyó uno de los extremos del Tn5 con el gen *cat* (resistencia a cloranfenicol) sin promotor, pero con la secuencia de unión a ribosomas; este transposón funciona como sonda transponible para buscar promotores bacterianos. También se construyeron dos "tránsidos desarmados" (tienen la capacidad de autorreplicarse autónomamente como los plásmidos en un fondo genético apropiado y además tienen la capacidad de transponerse; ambos son desarmados porque no tienen la información para la enzima transposasa, necesaria para la transposición, que debe proveerse externamente; el Tm_d5-oriColE1, que es un vector de clonación, además de funcionar como mutágeno biológico y el Tm_d5-cat-oriColE1-Mob (*PacI*, *PmeI*), que además de ser vector de clonación y mutágeno biológico, también funciona como sonda transponible para la detección de promotores bacterianos (*cat*), como vehículo para la movilización (Mob) de plásmidos y DNA de *Pseudomonas*, y nos permitirá localizar el sitio de inserción en el mapa físico del cromosoma de la bacteria, usando los sitios de restricción *PacI* y *PmeI*.

Estos elementos móviles fueron construidos para buscar promotores de *P. s. pv. phaseolicola*, que estén involucrados con la patogenicidad y la virulencia. Con el Tn5-cat se han obtenido mutantes, buscando los promotores que se expresan en las condiciones en que lo hacen los genes de los factores de patogénesis (a bajas temperaturas y en presencia de metabolitos de la planta) y todas las mutantes mostraron alteraciones en el fenotipo de la infección y por lo tanto los genes mu-

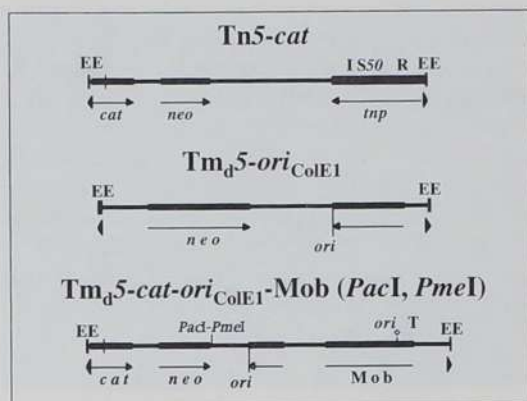
tados muy posiblemente intervengan en la patogénesis. Con este enfoque se ha comenzado a elaborar un catálogo de operones relacionados con la patogénesis, como un primer paso en el estudio de los genes involucrados en la conversación bioquímica entre la bacteria y la planta, y los mecanismos genéticos que los regulan, para llegar a comprender cuál es el mecanismo por el que una bacteria fitopatógena, como *P. s. phaseolicola*, puede infectar, invadir y matar una planta, y diseñar medios de protección para evitar las pérdidas en los cultivos.

Regulación de la expresión de la faseolotoxina de *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*

Pseudomonas syringae pv. *phaseolicola* es una bacteria Gram (-) de amplia distribución mundial y, como se mencionó anteriormente, es el agente causal de una enfermedad de frijol conocida como "Tizón de halo". Una de las características principales de esta enfermedad es la clorosis sistémica que se presenta en la planta como parte del desarrollo de la enfermedad. La clorosis es causada por una toxina, conocida como "faseolotoxina", la cual es producida por esta bacteria. Esta toxina inhibe de manera específica a la enzima ornitil-carbamoil transferasa (OCTasa), que es parte de la vía de síntesis de arginina catalizando la síntesis de citrulina a partir de ornitina y carbamoilfosfato. El efecto neto de la faseolotoxina es por lo tanto bloquear en las células la síntesis de arginina, lo que conduce a su muerte.

La faseolotoxina la produce *P. s. phaseolicola*, ex planta, cuando es crecida a 18°C pero no a 28°C que es su temperatura normal de crecimiento. Por otra parte, la faseolotoxina también tiene efecto sobre cultivos bacterianos, por lo que *P. s. phaseolicola* produce, de manera paralela a la síntesis de faseolotoxina, una OCTasa resistente a esta toxina (OCTasa-R) que le confiere inmunidad.

Nuestro grupo de trabajo ha aislado y caracterizado a nivel nucleotídico el gen que codifica para la OCTasa-R, el cual fue denominado *argK*². Este gen fue utilizado posteriormente para conferir resistencia a la faseolotoxina en plantas transgénicas que expresan



argK bajo el control de un promotor constitutivo³. El gen *argK* presenta una secuencia que corresponde a un promotor tipo Pribnow. Esto, aunado al hecho de que *argK* se expresa de manera constitutiva en *E. coli*, es indicativo de que la expresión de este gen está sujeta a control negativo, es decir, su expresión está controlada por una proteína represora, y en ausencia de la misma, ocurre la expresión de *argK*. Por otra parte, la expresión de este gen ocurre de manera simultánea a la síntesis de faseolotoxina cuando la bacteria es crecida a 18°C y también cesa esta expresión a 28°C.

Uno de los objetivos del laboratorio es el análisis de la expresión de *argK* y la búsqueda de otros genes reguladores involucrados en este sistema. Para este propósito se construyen fusiones cromosómicas de *argK::lacZ* o *argK::uidA* en *P.s. phaseolicola*. Con esta fusión de *argK* en *P.s. phaseolicola*, se procederá a determinar la cinética de producción de faseolotoxina y de expresión del gen reportero, en comparación con la cepa silvestre. Asimismo, una vez determinados los parámetros de expresión de *lacZ* (β -galactosidasa) o *uidA* (β -glucuronidasa) en la cepa silvestre, se utilizará un derivado de Tn5 para mutagenizar esta población y se buscarán mutantes que presenten alteraciones en el patrón de expresión del gen reportero, y de éstas se aislará, identificará y caracterizará el gen responsable de la alteración regulatoria.

La segunda línea de investigación de este laboratorio se enfoca a la identificación y análisis de genes involucrados en la síntesis de faseolotoxina. La faseolotoxina (N-d-fosfosulfanil)-ornitil-alanil-homoarginina, es un tripéptido modificado que incluye una porción inorgánica. Sobre la síntesis de esta toxina se

sabe muy poco, sin embargo se ha descrito que la síntesis de la homoargina presente en la faseolotoxina requiere de la actividad de una enzima específica, una amidinotransferasa involucrada en la transferencia de un grupo amido de la arginina a la lisina para formar homoarginina y ornitina, y que esta actividad sólo se detecta a 18°C y no a 28°C⁴, lo que indica que seguramente es una enzima específica para la síntesis de faseolotoxina, por lo que está termoregulada.

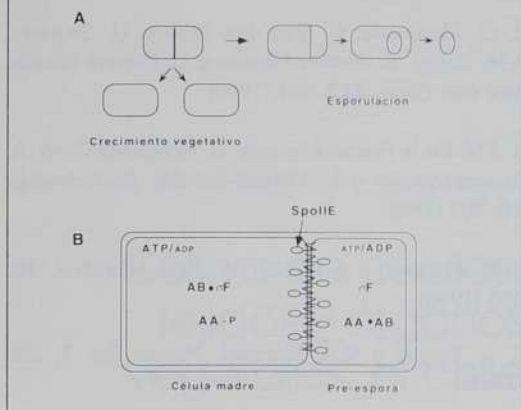
Otras amidinotransferasas están presentes en algunos mamíferos, incluyendo al hombre, así como en bacterias del género *Streptomyces*, en las que su presencia está relacionada con la síntesis de compuestos con actividad antibiótica. Una estrategia que se aborda para el aislamiento y caracterización del gen que codifica para la amidinotransferasa de *P.s. phaseolicola*, es la de comparar la secuencia de las amidinotransferasas de *Streptomyces* conocidas (por lo menos cuatro actualmente, todas con un alto grado de homología), y localizar regiones altamente conservadas para generar oligonucleótidos que nos permitan, mediante PCR, obtener el gen correspondiente en *Pseudomonas*.

Asimismo, se ha publicado que la molécula de faseolotoxina se define mejor como un antibiótico y no una toxina propiamente, sobre todo porque el tripéptido presente en esta molécula se sintetiza de manera no-ribosómica, lo cual es característico de la síntesis de antibióticos peptídicos. Ya se ha reportado la identificación de una péptido-sintetasa, mediante PCR, en *P.s. phaseolicola*⁵. Nosotros estamos utilizando este hecho para identificar y clonar el posible gen de péptido-sintetasa postulado para la síntesis de faseolotoxina.

La formación de esporas en *Bacillus subtilis* como el modelo más sencillo de diferenciación

La biología del género *Bacillus* está dominada por la endospora, carácter unificante dentro de la colección de bacterias saprofitas que comprende. El proceso de formación de esporas, además de ofrecer un modelo estupendo para la biología molecular de la diferenciación, se asocia con la producción de un rango de productos importantes para la biotecnología, tales como toxinas insecticidas y antibióticos peptídicos, y

***Bacillus subtilis*:
esporulación y control de la
expresión compartimento-específica**



da lugar a la formación de una estructura que es única en cuanto a su resistencia a agentes físicos y químicos adversos y a su gran longevidad en el ambiente. *B. subtilis* es la bacteria Gram positiva más extensamente estudiada; las herramientas moleculares disponibles en este organismo son muy sofisticadas e incluyen desde transposones hasta vectores muy estables de integración al cromosoma, cuyo número de copia puede ser controlado^{6,7}.

Nuestro trabajo con *B. subtilis* se centra en el estudio de dos aspectos de la expresión genética. El primero, dilucidar cómo se forman dos compartimentos en la primera etapa de diferenciación y cómo se establece una expresión genética distinta en ellos. El segundo, profundizar en el conocimiento del mecanismo de decaimiento del mRNA.

Formación del septo de esporulación y compartimentalización de la expresión genética

A diferencia del septo central que da lugar a dos células iguales durante el crecimiento vegetativo, durante la esporulación se forma un septo ubicado en uno de los polos, de tal manera que la célula queda dividida en

dos compartimentos de tamaño desigual; el compartimento pequeño se conoce como la pre-espora y el grande como la célula madre. El compartimento pequeño madura hasta convertirse en una espora que se libera al lisarse la célula madre. Se ha comprobado que ambos compartimentos exhiben expresión genética diferente desde el momento que se forman. El factor σF se requiere para establecer la expresión célula-específica durante el proceso de esporulación. Aunque σF esté presente desde antes de la formación del septo, sólo se activa después de la septación y exclusivamente en la pre-espora. Un reto importante es entender cómo se da la activación compartimento-específica de este factor.

Una proteína de gran interés es la codificada por el gen *spoIIIE*. Mutaciones en este locus bloquean la esporulación en el estadio de septación asimétrica y previenen la activación compartimento-específica del factor de transcripción σF . La actividad de σF está controlada por las proteínas regulatorias SpoIIAA y SpoIIAB. SpoIIAB actúa como un factor anti-sigma, ya que al formar un complejo con σF arresta su acción. Cuando SpoIIAA se une a SpoIIAB, σF queda libre y por tanto activo. SpoIIAB es una cinasa que utiliza ATP para fosforilar a SpoIIAA. Se cree que la preferencia en la unión de SpoIIAB a σF o a SpoIIAA depende de la concentración de ATP en el medio, ya que cuando SpoIIAA está fosforilado no se une a SpoIIAB. Recientemente se demostró que SpoIIIE posee una actividad de serina fosfatasa capaz de defosforilar a SpoIIAA,⁸ lo que explicaría el control que SpoIIIE ejerce sobre la activación de σF .

SpoIIIE es una proteína integral de membrana que posee entre 8 y 12 dominios transmembranales y un dominio citoplásmico. Es este último el que exhibe actividad de fosfatasa. Durante la división que da lugar al septo de esporulación SpoIIIE se localiza en el septo⁹. Nosotros hemos encontrado, a través del análisis de mutantes, que SpoIIIE juega un papel importante en el ensamble adecuado del septo de esporulación, y que esta actividad es independiente de la regulación sobre σF . La expresión de SpoIIIE controlada por un promotor inducible da lugar a células que contienen múltiples anomalías en el septo. De este modo SpoIIIE parece controlar dos eventos independientes: la formación de un septo de esporulación funcional y la compartimentalización de la actividad de σF .

Análisis de la degradación de mRNA en *B. subtilis*: el gen *cry1Aa* como modelo

El gen *cry1Aa* de *Bacillus thuringiensis*, codifica para una proteína insecticida que se produce en gran abundancia y que forma una inclusión bipiramidal característica. La expresión de este gen se lleva a cabo durante la esporulación y se restringe al compartimento de la célula madre. En *B. subtilis* el control transcripcional de *cry1Aa* es muy parecido al que ocurre en *B. thuringiensis*.

Nosotros hemos utilizado a *cry1Aa* como modelo para estudiar el proceso de decaimiento del mRNA durante la esporulación. Las ventajas que encontramos en este gen, son que se ha estudiado ya su control transcripcional y que su mRNA de aproximadamente 3600 nt es muy estable (vida media química de 11 min). Además, el decaimiento del mRNA *cry1Aa* da lugar a intermediarios de alto peso molecular que son a su vez estables. El estudio de estos intermediarios nos llevó a determinar que eran generados por rompimiento endonucleolítico. Hemos utilizado una serie de oligonucleótidos para mapear a lo largo de este mRNA los sitios potenciales de corte por endonucleasa. Parte de este trabajo se ha efectuado en paralelo en *E. coli*, en donde se ha hecho la mayor parte de estudios de decaimiento de mRNA en bacterias. El mRNA de *cry1Aa* aislado de *E. coli* exhibe un patrón de decaimiento similar al que observamos en *B. subtilis*. Además, hemos encontrado algunas coincidencias en los sitios de rompimiento endonucleolítico. Estos resultados nos llevan a concluir que en *B. subtilis*, al igual que sucede para algunos mRNAs en *E. coli*, el decaimiento de mRNA inicia con un rompimiento endonucleolítico al que sucede un procesamiento exonucleolítico. En *E. coli* se conocen varias de las nucleasas que participan en el procesamiento de mRNAs; recientemente se describió un complejo proteico que incluye una endo- y una exo-nucleasa al que se ha denominado degradosoma¹⁰. Actualmente estamos llevando a cabo experimentos encaminados a determinar cuáles son las ribonucleasas que participan en el decaimiento del mRNA de *cry1Aa* y qué elementos en su mRNA le proporcionan tal estabilidad.



Notas

1. R. Marsch Moreno, tesis doctoral, ENCB-IPN (1995).
2. G. Mosqueda, G. Van den Broeck, O. Saucedo, A.M. Bailey, A. Alvarez-Morales y L. Herrera-Estrella, *Mol. Gen. Genet.* **222**, 461 (1990).
3. J.M. De la Fuente-Martinez, G. Mosqueda-Cano, A. Alvarez-Morales y L. Herrera-Estrella, *Bio/technology* **10**, 905 (1992).
4. U. Markisch y G. Reuter, *J. Basic Microbiol.* **30**, 425 (1990).
5. K. Torgay y M.A. Marahiel, *Peptide Res.* **7**, 238 (1994).
6. P. Youngman, H. Poth, B. Green, K. York, G. Olmedo y K. Smith, en *Regulation of Prokaryotic Development*. I. Smith, R. Slepecky y P. Settlow, eds. (1989).
7. C. Vázquez-Cruz, J.C. Ochoa, y G. Olmedo-Alvarez, *Appl. Microbiol. Biotech.*, en prensa.
8. L. Duncan, S. Alper, F. Arigoni, R. Losick y P. Stragier, *Science* **270**, 641 (1995).
9. I. Barák, J. Behari, G. Olmedo, P. Guzmán, D. Brown, D. Walker, E. Castro, J. Westpheling y P. Youngman, *Molec. Microbiol.* **19**, 1047 (1996).
10. B. Py, C.F. Higgins, H.M. Krisch y A.J. Carpousis, *Nature* **381**, 169 (1996).

Cultivo de células, tejidos y órganos vegetales: el chile como sistema modelo

Neftalí Ochoa Alejo y Edmundo Lozoya Gloria

Los autores son investigadores del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav.

A mediados del siglo pasado se había postulado la teoría celular que proponía que todos los seres vivos estaban constituidos por unidades fundamentales metabólicamente independientes llamadas células, capaces de crecer y multiplicarse. Los primeros trabajos experimentales para intentar demostrar esta teoría se realizaron a finales del siglo pasado y principios de éste. Al principio se intentó el cultivo de segmentos de diferentes tipos de tejidos que se colocaban en medios muy simples que contenían sales minerales, azúcar y algunos compuestos nitrogenados (aminoácidos), consiguiendo solamente crecimiento limitado. El cultivo de órganos, como las raíces, fue exitoso gracias a la utilización de algunos extractos complejos como el extracto de levadura. Sin embargo, los avances más significativos en el establecimiento de los cultivos de células, tejidos y órganos se consiguieron después del descubrimiento de dos grupos importantes de reguladores de crecimiento: las auxinas y las citocininas. Estas sustancias estimulan el crecimiento y la división de las células vegetales e influyen de una manera determinante sobre la diferenciación celular. La presencia de uno u otro tipo de regulador o la combinación de ambos en concentraciones adecuadas en el medio de cultivo condujo a la inducción controlada de órganos específicos en tejidos de tabaco¹. También se consiguió promover la división de células individuales y, además, fue factible regenerar plantas completas a partir de ellas^{2,3}. Esta capacidad que presentan las células vegetales para regenerar al organismo multicelular completo se de-

nomina totipotencia y es una de las bases para diversas aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura y en la industria.

¿Cómo establecer los cultivos *in vitro*?

Para iniciar un cultivo *in vitro* es necesario primero seleccionar la parte de la planta más apropiada para ese fin. Aunque se puede utilizar cualquier tipo de material vegetal, en general resulta más conveniente utilizar los órganos, tejidos o células de plantas jóvenes que los de plantas adultas. También es más fácil iniciar y establecer los cultivos *in vitro* a partir de plantas herbáceas que de plantas leñosas debido al más lento crecimiento de estas últimas. Las plantas que van a servir como fuente de tejido están invariablemente contaminadas con microorganismos (hongos y bacterias principalmente). Estos microorganismos se tienen que eliminar del material vegetal antes del cultivo *in vitro*, pues como crecen mucho más rápido que las células vegetales podrían agotar los nutrientes del medio de cultivo y excretar sustancias tóxicas que pueden matar a los cultivos. La eliminación de los microorganismos contaminantes se consigue por un tratamiento con solución diluida de alguno de los blanqueadores para ropa que se encuentran disponibles en el mercado. Después de esta etapa el material está listo para colocarse en un medio de cultivo apropiado.

Las células, tejidos y órganos vegetales pueden crecer y desarrollarse separados de la planta cuando se les coloca en medios de cultivo en cuya composición se incluyan sales minerales, una fuente orgánica de carbono (azúcar), vitaminas y reguladores de crecimiento (hormonas). Los requerimientos nutricionales y hormonales varían con el tipo de material que se va a cultivar y se deben determinar específicamente para cada caso. Como regla general, se ha observado que los requerimientos nutricionales y hormonales son mayores cuanto menor es el tamaño de la parte de la planta que se va a cultivar⁴. Las yemas o brotes son más fáciles de cultivar que las células individuales.

De todos los componentes del medio de cultivo, los reguladores de crecimiento son sin lugar a dudas los compuestos que más influyen sobre el crecimiento y la diferenciación de las células y tejidos cultivados *in vi-*



tro. Generalmente las combinaciones apropiadas de las auxinas y citocininas en el medio de cultivo pueden promover el desarrollo de órganos cultivados *in vitro* o pueden inducir diferentes procesos morfogénicos, esto es, la formación de estructuras organizadas *de novo* a partir de los tejidos o células. Es posible promover específicamente la formación de raíces, brotes, flores (organogénesis) o estructuras semejantes a los embriones de las semillas (embriogénesis). De la combinación apropiada de reguladores de crecimiento se pueden regenerar yemas o brotes que se pueden transferir a medios específicos que induzcan la formación de raíces para regenerar plantas completas. Dependiendo también del tipo de regulador de crecimiento que se incluya en el medio de cultivo, es posible obtener masas de tejido amorfo sin una aparente especialización o diferenciación denominadas callos, que al ser inoculados en medios líquidos y en agitación se disgregan para producir cultivos celulares, llamados también suspensiones celulares.

Los cultivos *in vitro* deben incubarse en un medio ambiente apropiado para promover su desarrollo. Generalmente se mantienen en cuartos o cámaras de crecimiento con condiciones controladas de luz y temperatura. El tipo de luz, la intensidad y las horas de exposición a ella, tienen un importante efecto sobre la morfogénesis en los cultivos, por lo que es conveniente establecer las necesidades específicas para cada sistema.

Los cultivos de células, tejidos y órganos como sistemas de experimentación y manipulación genética

Después de conseguir con éxito el crecimiento ilimitado de órganos en medios sintéticos y de la demostración de la totipotencia celular, se han venido utilizando los cultivos *in vitro* como sistemas de experimentación para estudiar procesos que se llevan a cabo en los vegetales y como herramientas para la propagación asexual y el mejoramiento genético de plantas. Con estos sistemas es factible producir plantas que son copias genéticamente idénticas al material parental (clonas) o se puede generar variación genética para el aislamiento de líneas celulares variantes o mutantes con características específicas las cuales, a su vez, permiten la obtención de plantas diferentes a la planta original. También es posible transferir genes foráneos a las células vegetales para incorporarles características adicionales y de ahí regenerar plantas completas que ahora tendrán esas características en todas sus células. Los sistemas celulares y los cultivos de órganos también representan sistemas interesantes para la producción de compuestos naturales de plantas de importancia para diferentes industrias. Cada una de estas posibilidades se describirá más adelante con un sistema modelo: el chile.

El chile como sistema modelo

El chile es uno de los cultivos hortícolas más importantes a nivel mundial. México es el centro de diversidad genética de la especie *Capsicum annum*, de ahí la enorme variación en los tipos, tamaños, colores, sabores y pungencia de los frutos de chile. El sabor picante de los frutos está dado por la presencia de un grupo de compuestos conocidos como capsaicinoides, mientras que el color se debe a pigmentos como la clorofila, las antocianinas y los carotenoides. Tanto los capsaicinoides como los carotenoides de los frutos tienen aplicaciones en la industria de los alimentos y en medicina.

Como todas las especies cultivadas, la producción de chile se ve afectada por diferentes factores bióticos (virus, bacterias, hongos e insectos) y abióticos (sequía,

salinidad, heladas, etc.). El cultivo de tejidos podría ser una alternativa para llevar a cabo estudios básicos y para la manipulación genética tendiente al mejoramiento de las características agronómicas y a la manipulación de algunas vías metabólicas específicas de chile. Estas posibilidades y algunos resultados se describirán a continuación.

Regeneración de plantas de chile como etapa fundamental para la manipulación genética

Desde hace aproximadamente 12 años hemos venido realizando estudios tendientes al establecimiento de las condiciones para la regeneración de plantas a partir de células o tejidos cultivados *in vitro*. Esta etapa es esencial para intentar hacer manipulación genética a nivel celular, sea a través del aislamiento de líneas celulares con características agronómicas de interés o por medio de la transferencia de genes foráneos específicos que las modifiquen y que las mejoren genéticamente. Al respecto, el chile se ha mostrado como una especie recalitrante en relación a su capacidad para regenerar plantas a partir de células y tejidos en cultivo. Esto lo hace diferente a otros miembros de la familia *Solanaceae* como el tabaco, el jitomate, el tomate de cáscara y la petunia, que han mostrado una relativa facilidad de regeneración. A pesar de ello hemos conseguido establecer sistemas novedosos que nos han permitido la regeneración de órganos y eventualmente plantas de chile^{5,6}. Este sistema de regeneración se está utilizando actualmente para desarrollar la metodología para la transferencia de genes foráneos a chile.

Transferencia de genes foráneos a *Capsicum*

La ingeniería genética de plantas, que involucra el uso de técnicas de biología molecular y de cultivo de tejidos vegetales, es en la actualidad una alternativa para la manipulación genética y para el mejoramiento de plantas de importancia económica. A través de estas técnicas es posible aislar segmentos específicos de material genético a partir de cualquier organismo para luego transferirlos a las plantas y con ello conferirles características agronómicas adicionales sin perturbar

sus características originales. El método más frecuentemente utilizado para la transferencia de genes es la infección con la bacteria llamada *Agrobacterium tumefaciens*. Esta estrategia se ha estado experimentando con *Capsicum annuum* en nuestros laboratorios y se han podido obtener algunas plantas de chile transgénicas que expresan genes que confieren resistencia a antibióticos como la kanamicina (gen npt II) o que expresan actividad del gen reportero de la β -glucuronidasa (gen gus). Actualmente se está intentando aumentar la eficiencia de transformación genética para transferir en el futuro cercano genes que confieran resistencia a enfermedades causadas por hongos y virus, principales agentes que reducen el rendimiento del cultivo de chile. Asimismo, se pretende utilizar este sistema para manipular las vías de biosíntesis de los capsaicinoides, de carotenoides y de terpenos involucrados en los mecanismos de defensa contra el ataque por hongos, como se describe más adelante.

Variación genética en los cultivos *in vitro*: obtención de variantes y mutantes

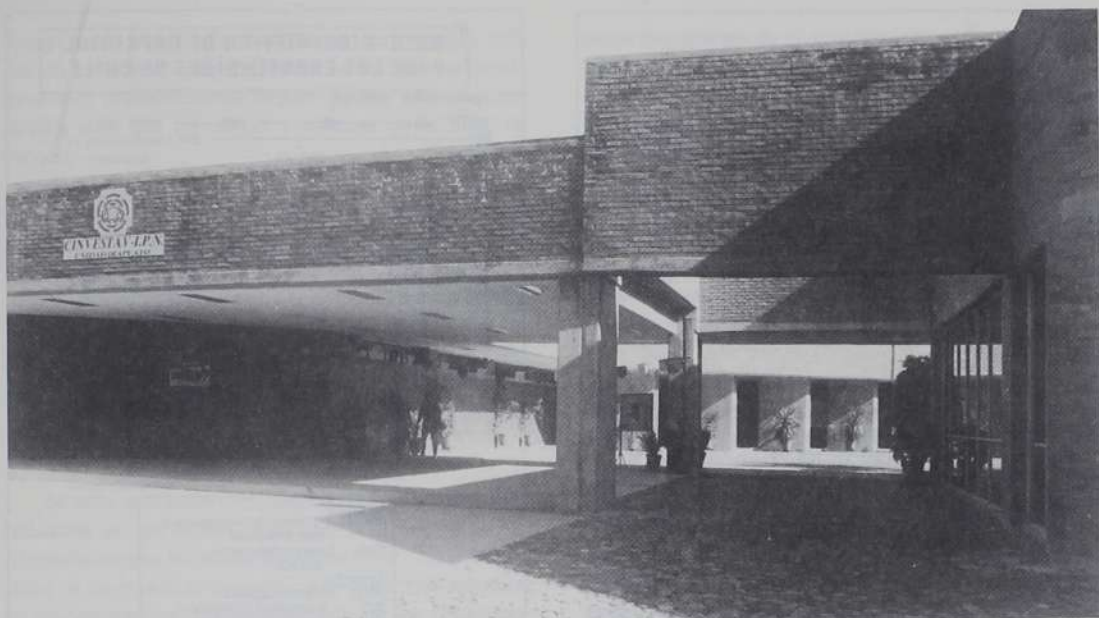
La variación genética espontánea y la mutación artificial han sido utilizadas tradicionalmente para el desarrollo de nuevas variedades de plantas. Desde hace aproximadamente 30 o 40 años se ha venido observando que cuando un tejido diferenciado pasa por una fase de dediferenciación durante su cultivo *in vitro*, se producen alteraciones genéticas que se pueden reflejar en cambios en las plantas regeneradas. Esta variación observada en las plantas regeneradas se denomina variación somaclonal y puede servir como una buena fuente de variación genética para programas de mejoramiento de plantas de importancia económica. También ofrece la oportunidad de utilizarla como fuente para la obtención de mutantes con ciertas características genéticas, bioquímicas, fisiológicas y agronómicas.

Los cambios observados se presentan generalmente en los cultivos de tejido calloso y en los cultivos celulares e incluyen alteraciones en el número de juegos cromosómicos (poliploidia), pérdida de algún cromosoma (aneuploidia), aberraciones cromosómicas (deleciones, translocaciones, inversiones) o mutaciones puntuales. Esto hace a los cultivos de callo o células en



suspensión sistemas interesantes y útiles para el aislamiento, por medio de una presión de selección, de células variantes o mutantes con características específicas; por ejemplo, resistentes a sustancias tóxicas (herbicidas, toxinas microbianas, metales pesados, etc.) e inclusive resistentes a factores abióticos como el frío, la salinidad y la sequía. Después del proceso de selección las células se podrían cultivar en medios apropiados que permitieran la regeneración de plantas con la característica seleccionada. En el caso de chile, hemos utilizado cultivos celulares para el aislamiento de clones celulares resistentes a condiciones de sequía. Las células resistentes a cierto grado de sequía se han podido seleccionar al cultivar a una población celular en un medio que contiene polietilenglicol, compuesto que reduce la concentración de agua disponible simulando con ello la sequía. Las células resistentes muestran una mayor capacidad de resistencia al déficit de agua, probablemente debido a la acumulación de ciertos iones y solutos orgánicos como la prolina y la glicinabetaína, que ayudan a retener más agua en el interior de las células o que protegen al metabolismo de los efectos deletéreos de la falta de agua⁸. Estas células se están utilizando como sistemas para estudiar los mecanismos de resistencia a sequía a nivel celular.

La variación genética en los cultivos celulares de chile la hemos explotado también para el aislamiento de líneas celulares con características bioquímicas interesantes. Hemos conseguido aislar variantes celulares de chile que muestran diferente resistencia a la



p-fluorofenilalanina, un análogo de la fenilalanina⁹. Las células más resistentes al análogo acumulan más fenilalanina, fenoles totales y ácidos fenilpropanoides en comparación con las células sensibles. Las células resistentes a p-fluorofenilalanina también acumulan una mayor cantidad de capsaicina, el principal compuesto picante; sin embargo, los niveles de capsaicina en las células resistentes no alcanzaron los valores detectados en los frutos de chile de la variedad de la cual se derivaron los cultivos. De cualquier manera, estos sistemas celulares abren la posibilidad de manipulación de la vía de los capsaicinoides para la producción controlada de estos compuestos.

Producción de metabolitos secundarios en cultivos *in vitro* de chile

Las plantas han servido al hombre no sólo como alimento sino como fuente de principios medicinales, saborizantes, pigmentos y aromas. En la actualidad se calcula que un 25% de los medicamentos en uso se derivan de las plantas. Con las restricciones cada vez mayores para la utilización de pigmentos sintetizados químicamente como aditivos en los alimentos, se está incrementando el uso de pigmentos naturales de plan-

tas. Igualmente, se está recurriendo con mayor frecuencia a los pigmentos vegetales para la fabricación de ciertos cosméticos.

La producción industrial de compuestos naturales requiere que la materia prima esté de preferencia disponible la mayor parte del año y sin una gran fluctuación. Esto es muy difícil de conseguir, pues la producción está determinada por los problemas inherentes al cultivo de las plantas en el campo (enfermedades, plagas y condiciones ambientales adversas). Una alternativa para la producción de compuestos naturales de plantas en condiciones controladas lo representan los cultivos celulares y de órganos. Ya mencionamos en el inciso anterior la posibilidad de producir los compuestos picantes por medio de cultivos celulares de chile. Los capsaicinoides se sintetizan a través de la ruta de los fenilpropanoides y de la vía de los ácidos grasos ramificados (figura 1). La ruta de los fenilpropanoides es una importante vía de síntesis de precursores e intermediarios de una enorme diversidad de compuestos como los ácidos benzoicos, las cumarinas, las ligninas y otros. En los cultivos celulares de chile se ha observado que los niveles de capsaicinoides son bajos en relación a los de los frutos. También hemos podido demostrar que una buena parte de los precursores e intermediarios de la ruta de los fenilpropanoides aplicados exógenamente a los cultivos

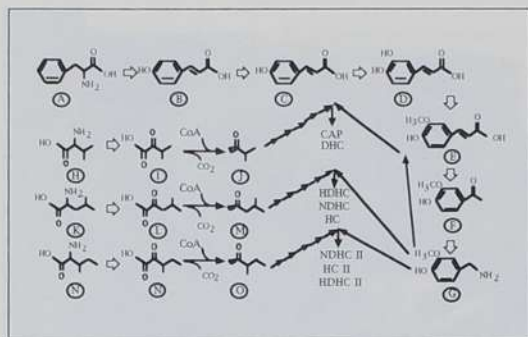


Fig. 1 Ruta biosintética completa de la capsaicina y sus análogos (dihidrocapsaicina (DHC); homodihidrocapsaicina (HDHC); nordihidrocapsaicina (NDHC); HC, y homocapsaicina (HC)). (A) fenilalanina; (B) ác. cinámico; (C) ác. p-cumárico; (D) ác. cafeico; (E) ác. ferúlico; (F) vainillina; (G) vainillamina; (H) valina; (I) α-cetolisovalerato; (J) isobutiril CoA; (K) leucina; (L) α-cetoliscaproato; (M), isovaleril CoA; (N) isoleucina; (O) α-ceto-β-metilvalerato; (O) α-metilbutiril CoA.

celulares de chile son desviados hacia la síntesis de ligninas, lo cual puede explicar en parte la baja capacidad de acumulación de capsaicinoides. Adicionalmente hemos detectado niveles más bajos de la enzima ácido cafeico O-metil transferasa y de la capsaicinoide sintetasa en tejido calloso (no diferenciado) en comparación con la de los frutos, lo cual sugiere que también esta deficiencia enzimática puede ser la responsable de los menores valores de acumulación de capsaicinoides en los cultivos celulares¹⁰.

Estudio de las defensas naturales de *Capsicum*

La utilización del cultivo de tejidos vegetales nos ha permitido también empezar a conocer cómo es que la planta de chile produce otros metabolitos secundarios interesantes y útiles y entender para qué le sirven. Es poco lo que se conoce sobre los productos naturales que caracterizan al fruto de esta planta, como son los pigmentos o carotenoides que le dan el color rojo a los frutos maduros, y también el capsidiol que es la fitoalexina de esta planta. A todos estos productos se les considera como metabolitos secundarios.

En este artículo ya se han mencionado los estudios que se desarrollan respecto de la capsaicina utilizando cultivos de células en suspensión de chile. Nos referiremos ahora a los trabajos que estamos desarrollando

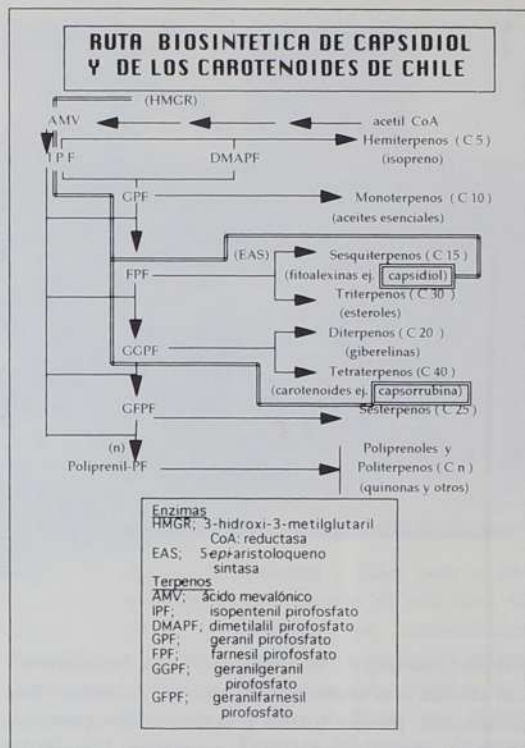


Fig. 2. Ruta biosintética de capsidiol y de los carotenoides de Chile (*Capsicum annum*).

sobre la biosíntesis del capsidiol y de los carotenoides (figura 2).

Uno de los problemas más importantes del cultivo de chile en México se refiere a las plagas y enfermedades que lo aquejan. Los tratamientos tradicionales con pesticidas y fungicidas químicos han provocado una grave contaminación de los suelos y la generación de cepas de hongos fitopatógenos más resistentes a estos productos. El problema ha llegado a tal grado que algunos productores de chile que tenían sus campos de cultivo en San Francisco del Rincón, en el Estado de Guanajuato, han tenido que buscar otro lugar para establecer sus cultivos, ya que es incosteable la producción de chile debido a la cantidad de residuos químicos acumulados en el suelo y la presencia de cepas de *Phytophthora* altamente resistentes a diversos fungicidas. Por estos motivos, los productores se han trasladado a Dolores Hidalgo en el mismo estado, en busca de campos libres de estos problemas. Sin em-

bargo, ante la falta de alternativas, han seguido utilizando los productos químicos en sus campos, sabiendo que muy probablemente lleguen a tener una situación similar a la que los obligó a moverse de su lugar de origen.

Una posibilidad interesante para intentar resolver estos problemas es la de tratar de incrementar la eficiencia de las defensas naturales de la planta de chile, como lo es la producción de la fitoalexina sesquiterpénica capsidiol. Las fitoalexinas son sustancias orgánicas de bajo peso molecular con propiedades antibióticas producidas sólo ante estímulos específicos como el ataque de patógenos o estimuladores bióticos o abióticos que simulan este ataque¹¹.

Se sabe que estos compuestos no permanecen acumulados en los tejidos, sino que posteriormente son degradados por la propia planta de chile. En este sentido, se les puede considerar como pesticidas naturales y biodegradables. En general, una de las diferencias observadas entre variedades de plantas susceptibles y resistentes a ciertas enfermedades, es la velocidad de producción y la concentración de la fitoalexina respectiva. Si la planta es capaz de producirla rápidamente y en altas concentraciones, tendrá mayores posibilidades de resistir el ataque. Por lo tanto, si pudiéramos controlar la producción de las fitoalexinas antes del ataque de los patógenos, podríamos estar en condiciones de enfrentar las enfermedades de los cultivos y disminuir o, en el mejor de los casos, eliminar el uso de agroquímicos. Existen dos maneras de intentar esto: la primera es por la adición de sustancias no contaminantes estimuladoras de la producción de las fitoalexinas para desarrollar tratamientos preventivos contra las enfermedades; y la segunda es por la manipulación genética de la ruta de biosíntesis de las fitoalexinas para tratar de obtener plantas transgénicas que las produzcan más rápido y en mayor cantidad o que sean capaces de producir una mayor diversidad en las estructuras químicas, lo que podría derivar en un espectro más amplio de acción. Es con esta intención que nos hemos involucrado en el estudio de la biosíntesis del capsidiol en la planta de chile.

Se ha demostrado que el capsidiol inhibe el crecimiento de diversos hongos fitopatógenos como *Fusarium*, *Helminthosporium* y algunas cepas de *Phytophthora*. Se conoce también su estructura química y los

pasos importantes de su ruta biosintética¹². Realizamos los primeros estudios con frutos de chile obtenidos en el mercado, a los cuales les inyectamos una solución de celulasa. Con esto se produce una degradación de las paredes celulares para simular un ataque de patógenos en el interior del fruto con la consecuente producción de capsidiol, que se acumula en el líquido inyectado. De ahí se extrae el capsidiol, se identifica por cromatografía en capa fina, se purifica y se utiliza para diversos estudios como los bioensayos con diferentes hongos.

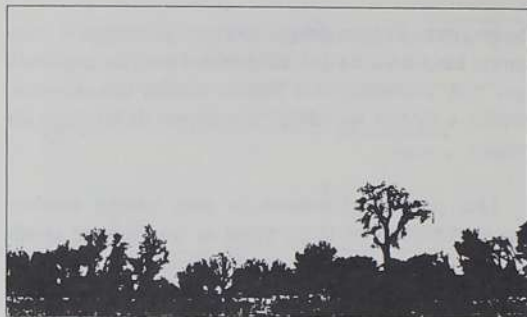
Hemos utilizado este sistema para la aplicación de otros posibles estimuladores más económicos, como el ácido salicílico y jasmonatos; sin embargo, ninguno de estos dos ha sido tan efectivo en la producción de capsidiol como la celulasa, pero sí se ha encontrado que el ácido salicílico aplicado conjuntamente con la celulasa abate la producción de capsidiol, lo que concuerda con los resultados de otros grupos¹³. Durante estos trabajos enfrentamos problemas de reproducibilidad de los resultados debidos a la presencia de residuos de pesticidas o a las infecciones internas en los frutos adquiridos directamente del mercado, lo cual alteraba la producción de la fitoalexina. Para solucionar este problema recurrimos al establecimiento de diversos cultivos *in vitro* de células de chile. Es posible obtener células en suspensión o callos de diferentes variedades de chile, pero en el caso de la variedad de chile ancho que utilizamos (Ancho San Luis), estos cultivos eran de lento crecimiento, delicados en su manejo y teníamos el inconveniente de que debían cultivarse con fitorreguladores para mantener el estado desdiferenciado y no sabíamos qué efecto podrían tener sobre la producción de la fitoalexina. Afortunadamente pudimos establecer cultivos de raíces de chile en condiciones estériles que, por ser órganos cultivados en condiciones controladas y sin fitorreguladores, ofrecían para nosotros muchas ventajas en comparación con los cultivos celulares. Estos cultivos de raíces respondieron bien a la adición de celulasa, con la ventaja adicional de que el capsidiol producido se excretaba al medio de cultivo facilitando así su obtención¹⁴.

Bioquímica y biología molecular de las fitoalexinas de *Capsicum*

El sistema de raíces cultivadas *in vitro* lo hemos utili-

zado para establecer la cinética de producción de capsidiol y para detectar a la enzima inducible responsable de canalizar la ruta general de los terpenos hacia la producción específica del capsidiol. A esta enzima se le conoce como 5-*epi*-aristolóqueno sintasa (EAS) y cataliza la ciclización del farnesil pirofosfato para la formación del precursor inmediato del capsidiol. Se ha demostrado, por medio de anticuerpos monoclonales contra una enzima similar pero de tabaco, que la EAS de Chile no se encuentra en tejidos que no han sido tratados con celulosa, por lo que su presencia sólo se puede deber a la expresión del gen respectivo. Esto sugiere que la región regulatoria del gen de la EAS inducible, debe tener la información necesaria para reconocer las señales de ataque o estimuladores similares e iniciar la producción del capsidiol. Actualmente estamos realizando diversas actividades con la intención de identificar y aislar a este gen para su posterior caracterización y manipulación genética.

Uno de los problemas que se tienen con cultivos comerciales como el Chile ancho, es que durante los programas de mejoramiento a través de selección y cruza de variedades silvestres y comerciales menos atractivas, esta variedad del tipo ancho ha acumulado una serie de genes dentro de los cuales podrían incluirse aquéllos en los que estamos interesados. Esto significa que probablemente en la variedad de tipo ancho exista más de un gen de la EAS o aun genes con secuencias similares, pero que no tengan relación con la producción de fitoalexinas. La dificultad estriba entonces en identificar y aislar específicamente el o los genes de EAS inducibles y que estén relacionados con la producción de capsidiol. Para lograr esto estamos intentando diversas estrategias: por un lado, ya se ha purificado parcialmente y caracterizado a la enzima EAS inducible¹⁵. Además de la valiosa información obtenida respecto a sus características bioquímicas, esperamos poder utilizarla para secuenciar alguno de sus extremos y diseñar oligonucleótidos específicos que nos sirvan como sondas adecuadas para identificar al gen respectivo. Se está intentando también la obtención de un fragmento específico del extremo 3' del ADNc de la EAS inducible. Para ello, se realizan actualmente una serie de combinaciones de métodos moleculares como RT-PCR, exposición diferencial ("differential display") y purificación de ADN a partir de geles tipo RFLP. Alternativamente, el sistema de raíces en cultivo se está utilizando para extraer ARNm a los



tiempos de incubación en los que se acumula la EAS después de la estimulación, con el fin de establecer una genoteca de ADNc y aislar de ahí el ADNc de la EAS inducible con las sondas que están siendo elaboradas. Actualmente, se tiene también un banco genómico de la variedad Ancho San Luis del cual se espera aislar el gen genómico de la EAS inducible para analizar su región regulatoria y diseñar estrategias de manipulación genética que nos permitan hacer más eficiente su expresión. La idea es que, al reintroducirse en la planta, pueda incrementarse la velocidad de producción y/o concentración de la fitoalexina.

Estrategias similares se están utilizando para identificar y aislar al gen de la enzima 3-hidroxi-3-metilglutaril Coenzima A reductasa (HMGR), que inicia la biosíntesis de terpenos. En este caso hay también varios genes de HMGR en Chile, por lo que intentamos aislar el inducible por ataque de patógenos¹⁶.

Respecto al estudio de los carotenoides y debido a la posición en que se encuentra la enzima HMGR en la ruta de los terpenos, estamos además realizando experimentos tendientes a determinar cuál sería el impacto de modificar la expresión del gen de HMGR para dirigir la enzima correspondiente al cloroplasto, que es el lugar en donde se sintetizan y acumulan los carotenoides. Para ello se han construido diversas versiones del ADNc de HMGR de *Arabidopsis thaliana*¹⁷ y con ellas se han transformado células de tabaco. De estas células se han regenerado plantas transgénicas y actualmente se están analizando los efectos de las diversas construcciones en la producción de carotenoides, esteroides y sesquiterpenos. Es conveniente mencionar que, al igual que el Chile, la planta de tabaco también produce capsidiol como fitoalexina en respuesta al ataque de patógenos y una vez que se tenga un sistema eficiente de transformación genética y regene-

ración de plantas de chile, se intentarían las transformaciones correspondientes.

Con estos trabajos esperamos conocer más sobre la interacción planta-patógeno y sobre los mecanismos de defensa inducibles de las plantas así como tener la posibilidad de aplicar estos conocimientos en problemas específicos y con posibilidades de lograr un mejor aprovechamiento de los productos naturales importantes de la planta de chile.

Notas

1. F. Skoog y C.O. Miller, *Symp. Soc. Exp. Biol.* **11**, 118 (1957).
2. W.H. Muir, A.C. Hildebrandt y A.J. Riker, *Science* **119**, 877 (1954).
3. V. Vasil y A.C. Hildebrandt, *Science* **150**, 889 (1965).
4. N. Ochoa Alejo, en *Fundamentos Teórico-Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales* (FAO, Roma, 1990) p. 25.
5. L.L. Valera-Montero y N. Ochoa-Alejo, *Plant Sci.* **84**, 215 (1992).
6. R. Ramírez-Malagón y N. Ochoa-Alejo, *Plant Cell Rep.*, en prensa.
7. M.S. Santos-Díaz y N. Ochoa-Alejo, *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **37**, 1 (1994).
8. R. Salgado-Garciglia y N. Ochoa-Alejo, *Plant Cell Rep.* **8**, 617 (1990).
9. N. Ochoa-Alejo y J.E. Gómez-Peralta, *J. Plant Physiol.* **141**, 147 (1993).
10. H. Cano-Camacho, G. Zavala-Páramo y E. Lozoya-Gloria, *Ciencia* **46**, 64 (1995).
11. D.G. Watson y C.J.W. Brooks, *Physiol. Plant Pathol.* **24**, 331 (1984).
12. R.C. Goytia-Acevedo, tesis de licenciatura (Q.F.B.), Fac. de Ciencias Químicas, Universidad Veracruzana (1995).
13. P.M. Chávez-Moctezuma y E. Lozoya-Gloria, *Plant Cell Rep.* **15**, 360 (1996).
14. H. Cano-Camacho, E. López-Romero y E. Lozoya-Gloria, enviado a *Plant Sci.*
15. D. Choi, B. Ward y R.M. Bostock, *Plant Cell* **4**, 1333 (1992).
16. C. Caelles, A. Ferrer, L. Balcells, F.G. Hegardt y A. Boronat, *Plant Mol. Biol.* **13**, 627 (1989).



CINVESTAV

Biotecnología

Maestría y Doctorado

Padrón de posgrados de excelencia del CONACYT

Objetivo

Formación de recursos humanos a través de su incorporación en proyectos de investigación interdisciplinarios en Biotecnología.

REQUISITOS DE INGRESO AL POSGRADO

- Promedio mínimo de ocho.
Acreditar los exámenes de admisión en agosto de cada año.
- Entrevistarse con el coordinador académico y requisitar todos los documentos que se soliciten.
- Estudios de licenciatura concluidos dentro de las áreas de Biología, Ingeniería Química, Biotecnología y afines.

Becas

Los estudiantes admitidos recibirán el apoyo Departamental para solicitar becas ante el CONACYT.

INFORMES E INSCRIPCIONES

Coordinación Académica del
Departamento de Biotecnología y Bioingeniería

Av. IPN No. 2508. Col. San Pedro Zacatenco,
México, D.F., C.P. 07300

Tels. 747 7000, 747 7001 ext. 3906 y 3918

Fax: 747 7000 ext. 3905, 747 7002

E-mail: csantoyo@mvax1.red.cinvestav.mx

Uso de marcadores moleculares en la agronomía

Azucena Mendoza-Herrera y June Simpson

Marcadores genéticos

Aunque no todos seamos especialistas en genética, de alguna manera nos resulta familiar el concepto de herencia genética. Por ejemplo, con facilidad apreciamos las similitudes entre los parientes de una misma familia; cuando escogemos frijoles negros o rosados apreciamos de manera intuitiva que las diferencias o similitudes entre individuos se debe a la información genética que hereda cada individuo de sus progenitores

Dentro de los organismos vivos existe una gran variedad de formas, colores, tamaños (características morfológicas), que los distinguen entre sí. Esta variabilidad, o "polimorfismo" genético, ocurre en forma natural dentro y entre diferentes poblaciones de organismos. Cualquier diferencia genética detectable entre dos individuos sirve entonces como una "etiqueta" o "marcador genético" que se convertirá en un rasgo característico y propio de cada individuo o de cierto grupo de individuos. Los marcadores más antiguos, y más ampliamente utilizados, son aquellos basados en caracteres morfológicos. En el caso particular de las plantas, los marcadores genéticos morfológicos se han empleado desde que el hombre practica la agricultura y ha seleccionado individuos con las características que forman la base del fitomejoramiento de una variedad y con una propiedad agronómica específica. Un ejemplo sencillo de este proceso lo constituye la preferencia natural por mazorcas de maíz de color amarillo aun

Las autoras son investigadoras del Departamento de Ingeniería Genética de la Unidad Irapuato del Cinvestav.

cuando existe información genética de variedades criollas para formar granos morados o cafés.

Una segunda generación de marcadores genéticos son los marcadores "bioquímicos". Con el fin de ampliar el espectro de marcadores disponibles, algunos investigadores han utilizados como marcadores genéticos varios compuestos bioquímicos. Estos marcadores bioquímicos pueden ser metabolitos secundarios, proteínas estructurales o enzimas. En general, las proteínas han sido más útiles como marcadores genéticos: la faseolina, proteína de almacenamiento del frijol, ha sido utilizada para estudiar las relaciones entre el germoplasma de frijol y mostrar que probablemente el frijol fue domesticado en dos regiones distintas de América, la región andina y la región meso-americana¹. Las isoenzimas han sido utilizadas extensamente en diversos cultivos, entre los que destaca el jitomate, para el cual se encontró una forma de fosfatasa ácida (utilizado como isoenzima), que funciona como un marcador para un gen de resistencia a nemátodos².

Aunque hay algunos casos que han tenido éxito, los marcadores morfológicos y bioquímicos presentan algunas desventajas: los marcadores morfológicos son afectados de manera intensa por el medio ambiente; por ejemplo, es difícil en algunos casos determinar si una planta de maíz dio un rendimiento pobre porque su potencial genético no le permite un mejor rendimiento o porque se cultivó en un lugar del campo con riego escaso o suelos pobres. Tanto los marcadores morfológicos como los bioquímicos pueden ser específicos de un tejido en particular o de un estadio de la planta. Para conocer el color de la flor de una planta debemos esperar, por supuesto, la etapa de floración. Tal vez la desventaja más importante en este sentido sea el número limitado de marcadores morfológicos y bioquímicos y el enorme esfuerzo requerido para conjuntar varias características en una sola variedad y su análisis simultáneo. El número máximo de isoenzimas registradas es de alrededor de 60³.

Estas limitaciones han sido superadas con la nueva generación de marcadores, los llamados marcadores moleculares o los marcadores basados en variación en el ADN. Los marcadores moleculares no son afectados por el medio ambiente, ya que se basan en las propiedades del ADN y la información genética no

cambia aunque las plantas estén sujetas a condiciones extremas y variadas. Además, como se trata de ADN, la información es constante en cualquier parte de la planta y en cualquier etapa del desarrollo. Por razones que se explican más adelante, existe potencialmente un número ilimitado de marcadores moleculares: en el maíz ya están disponibles más de mil marcadores⁴, y aun especies menos explotadas en este campo como el frijol tienen al menos 200 marcadores disponibles⁵. Al igual que los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores moleculares detectan la variación natural entre individuos y su herencia sigue las leyes mendelianas. Una ventaja adicional a nuestra disposición es la posibilidad de analizar locis únicos (regiones únicas en el genoma) o locis múltiples (regiones repetidas a través del genoma).

Marcadores moleculares

Los tres tipos de marcadores moleculares empleados de manera más amplia son: polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción (RFLP, por sus siglas en inglés)⁶, ADN polimórfico amplificado al azar (RAPD)^{7,8}, y polimorfismos en fragmentos amplificados (AFLP)⁹. Para detectar polimorfismos con marcadores moleculares se han usado dos técnicas básicas de biología molecular: hibridización tipo *Southern*¹⁰ y la reacción de polimerización en cadena, (PCR)¹¹. La metodología de los RFLP se basa en la técnica de hibridización tipo *Southern*. Esta técnica se basa en la propiedad del ADN de hibridar o aparear con secuencias homólogas. Si cortamos el ADN de un individuo con una enzima de restricción, el patrón preciso de fragmentos puede variar comparado con otro individuo. Esto se debe a pequeños cambios que ocurren en o cerca de los sitios de restricción. Cuando se hibridiza el ADN de diferentes individuos con una sonda específica marcada con un elemento radiactivo, detectamos estos pequeños cambios o polimorfismos como diferencias en la migración de los fragmentos en un gel de agarosa. Fragmentos más grandes corren más lentamente y *viceversa* (Fig.1).

La técnica de los RAPD se basa en una modificación de la técnica de la PCR. La PCR permite la amplificación específica de regiones de un genoma flanqueadas por secuencias conocidas. Pequeños oligonucleótidos, con homología a las secuencias flan-

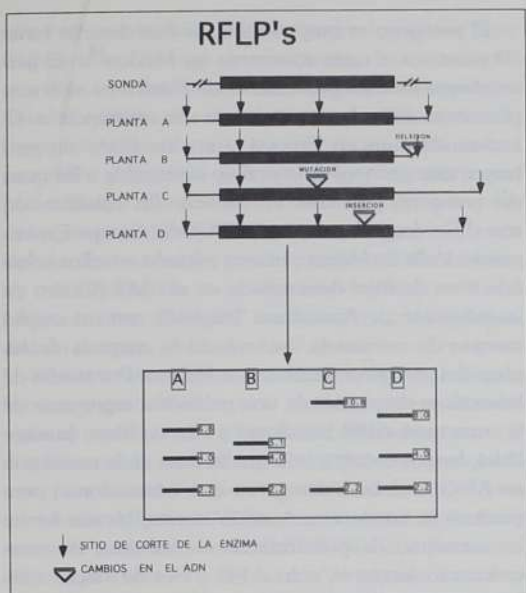


Fig. 1

queantes, son utilizados como iniciadores por la polimerización del ADN de la región de interés. La técnica de los RAPD usa un solo oligonucleótido con secuencia al azar y se amplifica una región del genoma flanqueada por replicas invertidas del oligonucleótido. Los resultados de la amplificación se pueden visualizar después de electroforesis en un gel de agarosa y tinción con bromuro de etidio. La base del polimorfismo en este caso resulta en pequeños cambios en o cerca de las regiones de homología del oligonucleótido, que pueden afectar la eficiencia de la PCR y causar ganancia o pérdida de bandas (Fig.2).

La metodología recién desarrollada es la de los AFLP, que combina análisis de polimorfismos en la longitud de fragmentos de restricción con detección por PCR. La base del polimorfismo de los AFLP es igual que en el caso de los RFLP. En el procedimiento de los AFLP, se corta el ADN genómico con enzimas de restricción como en el caso de los RFLP; sin embargo, en lugar de utilizar una sonda para detectar polimorfismos se usa PCR. Los oligonucleótidos utilizados no son de secuencias al azar, sino específicos para los sitios de restricción. Primero se lleva a cabo una ligación de adaptadores específicos, en los extremos cortados, luego se hace la PCR con oligonucleótidos homólogos a los adaptadores y con una base

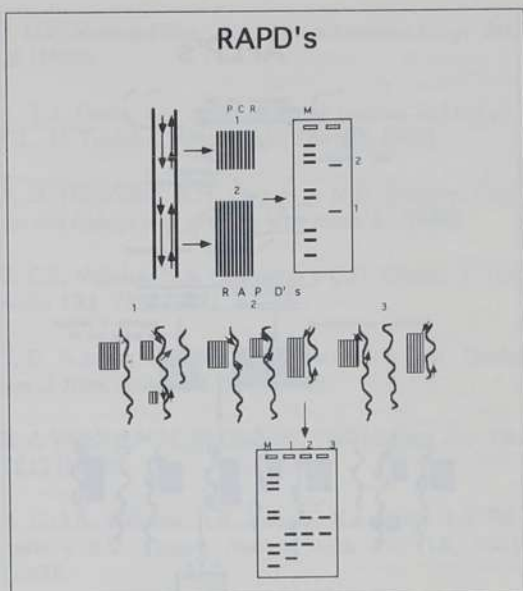


Fig. 2

selectiva. A continuación se hace una segunda PCR con tres bases selectivas (Fig.3). Durante la reacción, en realidad son los fragmentos de restricción los que son amplificados. El marcaje de uno de los oligonucleótidos con radiactividad permite visualizar las bandas amplificadas después de electroforesis en gels de acrilamida.

Debido al gran número de enzimas de restricción disponibles, y el número posible de permutaciones de secuencias de oligonucleótidos al azar, aunado al hecho que RAPD y AFLP detectan múltiples locis simultáneamente, estos marcadores son potencialmente ilimitados.

Los marcadores de ADN han extendido las aplicaciones de los marcadores genéticos clásicos. Actualmente se utilizan de manera rutinaria las "huellas genéticas" detectadas con marcadores moleculares en casos forenses y de paternidad en humanos, y para clasificación y protección varietal en plantas. En el campo de fitomejoramiento se están haciendo selecciones con marcadores en programas de mejoramiento, tanto para caracteres con base genética sencilla,¹² como para caracteres cuantitativos¹³. Los marcadores son herramientas muy poderosas que sirven para hacer eficiente la selección y acelerar dichos programas.

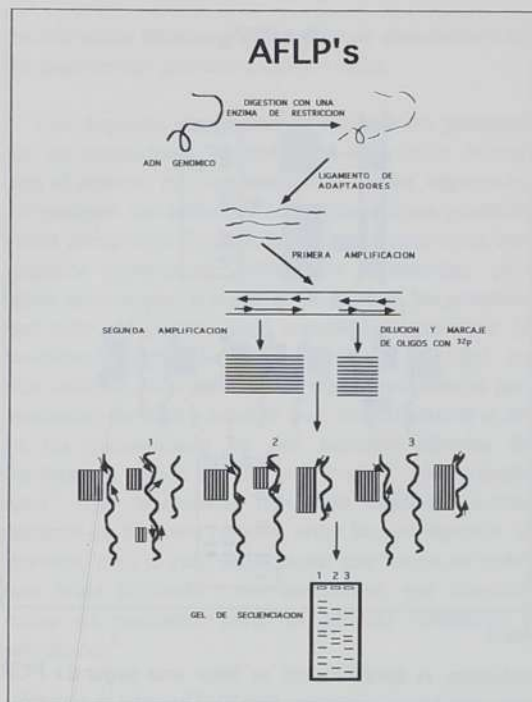


Fig. 3

La posibilidad de producir mapas genéticos esencialmente saturados con marcadores (utilizando las teorías de mapeo genético clásico), ha conducido a la clonación de genes de función bioquímica desconocida debido a su localización con marcadores moleculares. La estrategia radica en encontrar marcadores moleculares fuertemente ligados al gen de interés y que flanquean dicho gen. Esta estrategia ya ha tenido éxito en varios organismos, incluyendo el hombre, plantas y ratones entre otros.

Interacción entre frijol y *C. lindemuthianum*

En el grupo de genética molecular en la Unidad Irapuato del Cinvestav, el modelo de estudio que hemos escogido es la interacción entre el frijol (*Phaseolus vulgaris*) y el hongo causante del antracnosis en frijol, *Colletotrichum lindemuthianum*. El objetivo del trabajo a largo plazo es estudiar a nivel molecular el mecanismo de resistencia/susceptibilidad en la planta de frijol y los procesos relacionados con el hongo.

El patógeno es muy variable, se han descrito hasta 30 patotipos o razas solamente en México¹⁴. El germoplasma de frijol proveniente de México ha sido ampliamente utilizado como fuente de resistencia a *C. lindemuthianum* en Europa y en los EUA; sin embargo, este germoplasma es muy susceptible a las razas del patógeno presentes en México. En colaboración con el Dr. Jorge Acosta del INIFAP, del Campo Experimental Valle de México, hemos iniciado estudios sobre una línea de frijol desarrollada en el CIAT (Centro de Investigación de Agricultura Tropical), con un amplio margen de resistencia, incluyendo la mayoría de las razas del patógeno presentes en México. Por medio de infecciones de plantas de una población segregante de la cruz entre A193 (resistente) y Flor de Mayo (susceptible), hemos determinado que la base de la resistencia en A193 se debe a dos genes que interaccionan para producir la resistencia. Aunado a esto, hemos hecho un escrutinio de polimorfismo en términos de marcadores moleculares, entre A193 y Flor de Mayo, utilizando RFLP, RAPD y AFLP. Hemos determinado también más de 200 marcadores útiles para llevar a cabo estudios de ligamiento y mapeo en nuestro material. Como un primer acercamiento, hemos determinado dos grupos de ligamiento asociados con la resistencia; un grupo con 16 marcadores y otro con 7 marcadores. Está en progreso la preparación de un mapa de ligamiento completo para ubicar los genes de resistencia dentro del genoma de frijol. Además, los marcadores determinados están disponibles para otros investigadores o para uso en selección en programas de fitomejoramiento. Para facilitar la clonación y caracterización de los genes de resistencia a base de mapeo, está en sus últimas etapas de preparación¹⁵ una genoteca de frijol de ADN de alto peso molecular (100Kb).

Varios investigadores han analizado las razas de *C. lindemuthianum* que se encuentran en México^{16,17} utilizando cultivares diferenciales; sin embargo, no se ha llevado a cabo un estudio sistemático del patógeno en diferentes regiones del país. Nosotros hemos iniciado un estudio de este tipo en colaboración con el M.C. Raúl Rodríguez del INIFAP, Valle de Guadiana, Durango, al combinar métodos tradicionales, como la caracterización de aislados del hongo con cultivares diferenciales de frijol, y marcadores moleculares para formar huellas genéticas a través de AFLP. Con esta estrategia hemos caracterizado alrededor de 50 ais-

lados en los estados con más alta producción de frijol: Chihuahua, Durango y Zacatecas. Los resultados muestran que los marcadores moleculares agrupan los aislados en términos de su origen geográfico; sin embargo, no encontramos una correlación entre origen geográfico y patotipo determinado por infecciones sobre cultivares diferenciales. En los 50 aislados analizados se encontraron 7 patotipos; en cambio, cada aislado dio una huella genética distinta. Esto demuestra que la variación en la organización del genoma del hongo es muy dinámica, mientras hay poca variabilidad en patotipo. Además, los 7 patotipos encontrados invariablemente infectaron cultivares provenientes de México, y no cultivares de la región andina o de otras regiones de Meso-América. Estos resultados concuerdan bien con la teoría de coevolución entre patógenos y sus hospederos. Ya hemos extendido nuestro muestreo hasta Jalisco y Michoacán y actualmente estas muestras están bajo análisis. El estudio completo, que contempla incluir muestras de Veracruz, Oaxaca y Chiapas, dará una imagen bastante amplia de la prevalencia de las razas de *C. lindemuthianum* en México, lo cual será útil no solamente para nosotros sino también para los mejoradores y agricultores en estas regiones.

Conclusiones y perspectivas

Los marcadores moleculares son herramientas muy poderosas, tanto en proyectos aplicados de mejoramiento e identificación de individuos, como en estudios básicos de localización, aislamiento y caracterización de genes.

En la Unidad Irapuato del Cinvestav hemos explotado los marcadores moleculares para estudiar genes de resistencia a *C. lindemuthianum* en frijol y para analizar las poblaciones del patógeno en México. Según nuestros resultados preliminares, hemos diseñado experimentos para el aislamiento y caracterización de los genes de resistencia, para estudiar con más detalle la alta variabilidad del hongo y las relaciones entre los diferentes patotipos.

Notas

1. P. Gepts, T.C. Osborn, K. Rashka y F.A. Bliss, *Econ. Bot.* **40**, 451 (1986).

2. H.P. Medina-Filho, *Rep. Tomato Genetics Coop.* **30**, 26 (1980).

3. T.J. Orton, en *Applications of isozyme technology*, Ed. O. Tanksley (Amsterdam, Elsevier, 1983).

4. D. Hoisington, E.H. Coe Jr. y M.G. Neuffer, *Gene list and linkage map of maize* (*Zea mays* L., 1988).

5. C.E. Vallejos, N.S. Sakiyama y C.D. Chase, *L. Genetics* **131**, 733 (1992).

6. D. Botstein, R.L. White, M. Skolnick y R.W. Davis, *Am. J. Hum. Genet.* **32**, 314 (1980).

7. J. Welsh y M.M. McClelland, *Nucleic Acids Res.* **18**, 7213 (1990).

8. G.G.K. Williams, A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski y S.V. Tingey, *Nucleic Acids Res.* **18**, 6531 (1990).

9. P. Vos, R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijmans, T. vande Lee, M. Hornes, A. Frijters, J. Pot, J. Paleman, M. Kuiper y M. Zabeau, *Nucleic Acids Res.* **23**, 4407 (1995).

10. E.M. Southern, *J. Mol. Biol.* **98**, 503 (1975).

11. K. Mullis, y F. Faloona, *Methods Enzymol.* **155**, 335 (1987).

12. J.D. Kelly, *HortScience* **30**, 461 (1995).

13. A.H. Paterson, J.W. Deverna, B. Lanini y S.D. Tanksley, *Genetics* **124**, 735 (1990).

14. E.R. Garrido-Ramírez y S. Romero-Cova, *Agrociencia* **77**, 139 (1989).

15. S. Hernández, M. Sánchez, P. Guzmán y J. Simpson, *Meth. Mol. Cell. Biol.*, en prensa.

16. J.J. Aceves y J. Acosta, *Reacción a antracnosis de frijol de familias F2 y sus progenitores bajo condiciones de invernadero*. (Saltillo, Coah., SMF, 1992).

17. R. Rodríguez, J. Acosta y G. López, *Razas adicionales de Colletotrichum lindemuthianum identificadas en Durango*. (Saltillo, Coah., SMF, 1992).

El Instituto de Investigaciones Eléctricas (IIE) con el apoyo de la CFE y del CONACYT, ofrece becas para desarrollar la tesis de maestría o doctorado, en nuestras instalaciones y laboratorios, en alguno de los proyectos de investigación tecnológica de nuestro instituto.

BECAS PARA REALIZAR TESIS

**MAESTRIA
DOCTORADO**

BECAS PARA ESTUDIANTES Y EGRESADOS DE POSGRADOS EN:

- FÍSICA
- INFORMÁTICA
- INGENIERÍA CIVIL, EN COMPUTACIÓN Y SISTEMAS, ELÉCTRICA, ELECTRÓNICA Y COMUNICACIONES, MECÁNICA, NUCLEAR Y QUÍMICA
- MATEMÁTICAS APLICADAS
- QUÍMICA
- OTRAS

BENEFICIOS

- Beca económica
- Asesoría de investigadores
- Asistencia a cursos de capacitación
- Posibilidad de asistencia a seminarios y/o congresos internos
- Posibilidad de contratación en el IIE como investigador al término exitoso de su estancia
- Promoción en la bolsa de trabajo del IIE al término de su estancia
- Acceso a utilizar la infraestructura institucional, relacionada con su programa de trabajo

REQUISITOS

- Promedio general no inferior a 80/100
- Buen desempeño académico
- Ser mexicano
- Haber acreditado las materias del programa de maestría y doctorado y tener la aprobación de su institución para comenzar la tesis
- No tener más de 18 meses de haber iniciado el programa de maestría.

Instituto de Investigaciones Eléctricas
Departamento de Relaciones con el Sector Educativo
Interior Internado Palmira Edif. 12-3er piso, calle Reforma 113, Col. Palmira 62490, Temixco, Mor.
Tel: (73) 18 3811 ext. 7164 o 7161 Fax: (73) 18 9542

La genética y la fisiología molecular en el estudio de las plantas

Plinio Guzmán y Miguel A. Gómez Lim

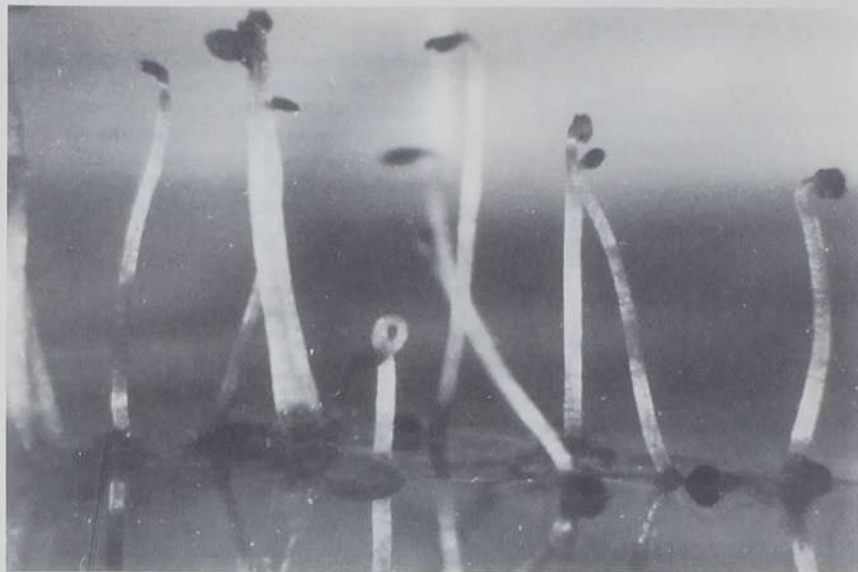
Genética molecular

La genética molecular en plantas es un área de la biología que ha venido desarrollándose extensamente en los últimos años. Esto ha ocurrido en parte gracias al establecimiento de la planta *Arabidopsis thaliana* como sistema modelo de estudio y a la generación de nuevas tecnologías para la manipulación genética. A nivel molecular, la mayoría de los conocimientos básicos sobre los fenómenos que rigen el crecimiento y desarrollo de una planta se entienden en menor grado que en otros sistemas eucarióticos. Avances recientes en la biología vegetal han establecido que muchos de estos fenómenos son análogos a los que ocurren en otros organismos, y que aunque los mecanismos de ejecución suelen ser diferentes, existen elementos en común con otros sistemas. Dos de los modelos más importantes en el estudio de la biología vegetal en la actualidad son *Arabidopsis* como fuente de nuevos genes, de mutantes y de sistemas para el análisis genético y molecular, y la levadura *Saccharomyces cerevisiae* como el sistema eucariótico más desarrollado genéticamente y con características únicas para el aislamiento y análisis de genes de otros organismos.

Arabidopsis thaliana, un hierbajo clave en genética molecular de plantas

Arabidopsis posee un gran número de propiedades que la han colocado como el sistema ideal en biología vegetal¹. Esta planta ha sido objeto de estudios clásicos

Los autores son investigadores titulares del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas de la Unidad Irapuato del Cinvestav.



en genética por más de cuarenta años, y desde hace unos diez años se ha establecido como el sistema más adecuado para desarrollar el área de la genética molecular en plantas. *Arabidopsis* pertenece a la familia *Brassicaceae* en la cual se agrupan cultivos de interés agrícola como son el brócoli y la coliflor. Algunas de las primeras características atractivas de *Arabidopsis* fueron: tamaño pequeño (20-30 cm), tiempo corto de generación (5-6 semanas), facilidad de crecerla en condiciones de laboratorio, el hecho que se autopoliniza y que produce cerca de 10,000 semillas por planta y posee el genoma más pequeño descrito en plantas compuesto, además, en su mayoría por secuencias únicas de DNA.

Dos de las áreas donde más empeño se ha puesto en *A. thaliana* es en el desarrollo de diversos aspectos para el análisis de su genoma y en el establecimiento de recursos de información electrónica. Se han generado mapas genéticos con más de 460 marcadores visibles y con diversos tipos de marcadores moleculares (RFLP, RAPD, CAP, AFLP, SSLP, RIL, etc.), al igual que mapas físicos de sus cinco cromosomas; más del 95% del genoma se halla ordenado en conjuntos de clonas en cósmidos y en cromosomas artificiales de levadura (YAC). La información relativa al genoma se encuentra depositada en el Centro del Genoma de *A. thaliana* (ATGC) en la Universidad de Pennsylvania.

Al igual que con otros sistemas modelo, existen en *Arabidopsis* proyectos destinados a la secuenciación de su genoma. Entre ellos se han obtenido avances significativos en la secuenciación de diversos genes que se expresan (clonas EST, *Expressed Sequence Tags*). Se ha publicado para *Arabidopsis* un número máximo de 20,000 genes, hasta el momento se ha reportado la secuenciación de cerca de 24,000 EST, que es más de lo que se tiene para cualquier otro organismo, exceptuando al humano. Con el propósito de ayudar al análisis de la colección de EST, éstos han sido recientemente ensamblados en consensos tentativos por TIGR (The Institute for Genome Research). La información en curso sobre la secuenciación de EST y sistemas para su análisis se encuentra depositada en bancos de información accesibles a través de la red WWW. La aplicación de la información y de los recursos obtenidos de la investigación básica con *Arabidopsis* marcará la pauta para el entendimiento de los problemas fundamentales de la biología de las plantas. Entre las metas a futuro en la investigación de *Arabidopsis* se encuentran la secuenciación completa de su genoma (programada para el año 2004), la continuación del aislamiento y caracterización de mutantes en genes esenciales utilizando diversas estrategias de selección, el desarrollo de tecnologías para evaluar la funcionalidad y la significancia de las secuencias genómicas identificadas, el fomento a los centros de acopio y asociaciones de bancos de datos. Información

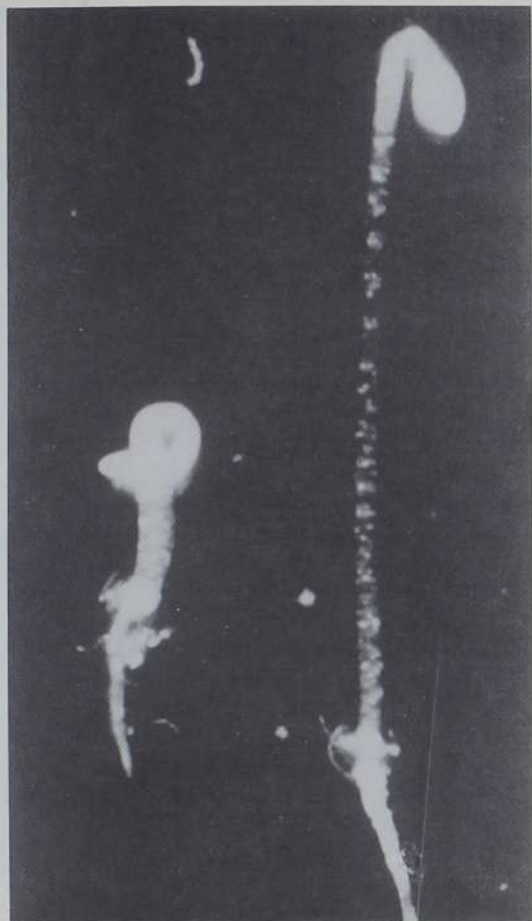


Fig. 1 Características morfológicas de plántulas etioladas de *Arabidopsis*. Plantas provenientes de semillas del tipo silvestre germinadas por 4 días en la oscuridad en presencia (plántula de la izquierda) o en ausencia (plántula de la derecha) del etileno. Mutantes insensibles y mutantes de respuesta constitutivamente al gas han sido obtenidos buscando variaciones morfológicas; los genes correspondientes a algunas de ellas han sido identificados.

adicional sobre *Arabidopsis* puede obtenerse a través de la red WWW.

A la caza de nuevos genes en plantas

El análisis genético ha sido uno de los enfoques más fértiles en la búsqueda de nuevos genes involucrados



Fig. 2 Fenotipo de clones de *Arabidopsis* tóxicos para *Saccharomyces cerevisiae*. Cajas de petri con cepas de *S. cerevisiae* donde se expresan posible genes tóxicos de *Arabidopsis*. Los cDNAs de *Arabidopsis* están clonados en un vector de expresión para su uso en *S. cerevisiae*. La expresión de los cDNAs está regulada por un promotor activo en medio suplementado con galactosa e inactivo en medio suplementado con glucosa. Las colonias que aparecen en ambos medios corresponden al vector de expresión y las otras a candidatos que expresan posibles genes tóxicos.

en la gran variedad de fenómenos que ocurren en las plantas. El ciclo de vida corto, el tamaño y la gran producción de progenie facilitan la búsqueda en *Arabidopsis* de mutantes alteradas en un fenómeno de interés. Las herramientas que se han desarrollado en *Arabidopsis* para el análisis y la manipulación del genoma permiten el aislamiento del gen de interés identificado únicamente por su fenotipo mutante^{2,3}. Un ejemplo es el del etileno, un gas simple que regula diversos procesos durante el crecimiento y desarrollo vegetal, como son la germinación, la senescencia, la elongación celular y la maduración de frutos⁴ (ver más adelante). El primer paso en este análisis genético fue identificar un fenotipo sencillo para la búsqueda de las mutantes⁵. La disección genética de la respuesta que presentan plántulas de *Arabidopsis* resultó ser un fenotipo muy apropiado para la identificación de componentes reguladores esenciales en la vía de señalización de este gas⁵. La caracterización de mutantes resistentes a la acción hormonal o que presentaron respuestas constitutivas a la hormona han servido para establecer qué mecanismos dependientes de fosforilación ocurren durante la percepción y la transducción de la señal del etileno y para el aislamiento del primer receptor de una hormona vegetal⁶.

Otro camino seguido comunmente en estudios de

ATL2	DPIE	CAVCLSEFE	ESETGRVLPNCQHTFHVDCIDMWFHS-HS--TCPLCRSLV
G1	DSDCC	AIICIEAYKPTDTIRILP-CKHEFHKNCIDPWLE-HR--TCPMCKLDV	
RAD18	TLLR	CHICKDFLKVPV--LTP--CGHTFCSLCIRTHLNN-QP--NCPLCLFEF	
IE110	EGDV	CAVCTDEIAPHL-RCDTFPCMHRCIPCMKTWMQL-RN--TCPLCNAKL	
PML	QFLRC	QQCQAEAKCP---KLLPCLHTLCSGCLAE-----SGMQCPICQAPW	
BRCA1	KILE	CPICELIKEP-----VSTKCDHIFCKFCMLKLLNQKKGPSQCPLCKNDI	
MSL2	QLLS	CVVQCQLLVDPYS--PKRCQHNVCRLCLRGKKHL-FP--SCTQCEGCS	
RING1	SELM	PICLDMLKNTMTT---KECLHRFCSDCIVTALRS-GN-KECPTCRKKL	
		* * * * *	
		H	

H

Fig. 3 Alineamiento del dominio rico en cisteínas de ATL2 con dominios del tipo RING. G1 es una proteína involucrada en la formación del mesodermo en *Drosophila*; RAD18 está involucrada en reparación del DNA en *S. cerevisiae*; IE110 es una proteína transcripcional del virus del herpes; PML y BCR1 son oncoproteínas humanas, PML involucrada en leucemia promielocítica aguda y BCR1 en susceptibilidad a cáncer mamario y de ovario; MSL2 participa en la regulación de la compensación de dosis génica en *Drosophila* y RING es una proteína reguladora humana que le da nombre al dominio. Los residuos de cisteína y de histidina que se postulan como ligandos del zinc están sombreados y señalados con (*). El cambio de una cisteína por una histidina (H) presente en ATL2 se señala.

genética molecular en plantas es el uso de la levadura *S. cerevisiae* como herramienta para el aislamiento y análisis de genes. Algunas de las estrategias más empleadas se basan en la identificación de componentes que logran substituir parcial o totalmente una función defectiva o suprimir mutantes condicionales de esta levadura. El uso de *S. cerevisiae* permite además evaluar estrategias no concebibles en otros eucariotes, que pudiesen aportar rápidamente y sin gran esfuerzo nuevos conocimientos aplicables a estos otros eucariotes. Son áreas importantes el diseño y la evaluación de nuevas estrategias de selección genética. La sobreexpresión condicional de cDNAs de *Arabidopsis* tóxicos para *S. cerevisiae* se ha evaluado como sistema de selección de genes regulatorios en plantas⁷. Esta estrategia surge de la observación de que algunos dominios regulatorios y algunos factores de transcripción quiméricos son tóxicos cuando se sobreexpresan en *S. cerevisiae*; de hecho este tipo de selección se ha utilizado para la identificación de adaptadores transcripcionales en mamíferos. La estrategia aplicada con *Arabidopsis* permitió identificar, entre otros, un nuevo gen regulador no descrito previamente en plantas. Este gen denominado ATL2 (gene de *Arabidopsis* tóxico para levadura), corresponde a una clase conocida como de respuesta primaria o de respuesta temprana⁸. Genes de este tipo en vertebrados, como *c-fos* y *c-jun*, realizan funciones esenciales durante el crecimiento y desarrollo celular⁸. ATL2 codifica además un dominio regulador y representa uno de los primeros genes descritos en plantas de este tipo.

Las predicciones sobre la estructura del producto génico indican que en ATL2 se combinan un dominio regulador constituido por un dedo de zinc similar al

del tipo RING, y una señal putativa de anclaje a membrana. La importancia de este tipo de dedo de zinc se asume por su presencia en una gran diversidad de proteínas conservadas en la escala evolutiva, que incluye factores de transcripción, oncogenes y genes involucrados en recombinación y reparación del DNA. La señal de anclaje sugiere un mecanismo transitorio de permanencia en el citoplasma del dominio que codifica al dedo de zinc. Como características comunes con genes de respuesta primaria, ATL2, muestra determinantes para la degradación rápida de mRNA y acumulación rápida y transitoria de transcrito en ausencia de síntesis de proteínas. Entre los inductores de la expresión de ATL2 están las auxinas. Estos reguladores del crecimiento controlan gran diversidad de procesos de crecimiento y desarrollo en plantas. ATL2, como gen regulador de respuesta primaria inducido por auxina, podría formar parte de los mecanismos iniciales de señalización controlando pasos subsecuentes de la respuesta. Análisis recientes indican que la disposición de RING encontrada en ATL2 aparte de ser un nuevo tipo de dominio regulador, está conservado en forma más constante en plantas que en otros eucariotes; es así como ATL2 es parte de una gran familia génica⁹. Las diversas herramientas para el análisis genético desarrolladas en *Arabidopsis* permitirán la disección funcional de esta nueva clase de proteínas regulatorias y determinar su papel durante las primeras etapas en vías de señalización en plantas.

Fisiología molecular

La disponibilidad de técnicas en biología molecular ha permitido abordar diversos fenómenos vegetales desde

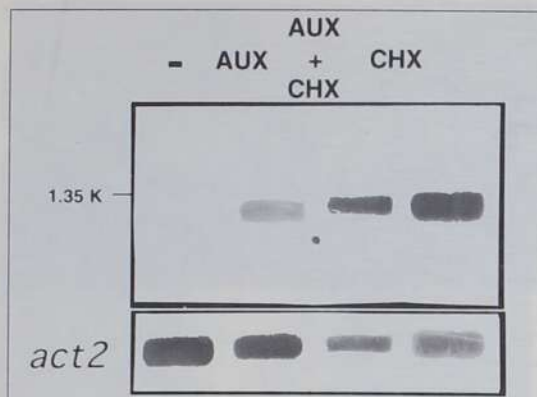


Fig. 4 Efecto de auxina y cicloheximida en la expresión de ATL2. Análisis tipo Northern realizado con RNA de plántulas de *Arabidopsis* tratadas por 15 minutos bajo las condiciones indicadas. La membrana se hibridó primero con ATL2 y luego, como control, con un gen de actina.

otra perspectiva. Las estrategias para aislar genes vegetales se han ido perfeccionando y en la actualidad existe una gran variedad de métodos para este fin (ver sección anterior). Al mismo tiempo la disponibilidad de técnicas para la manipulación genética de plantas superiores ha abierto una nueva vía para el análisis del desarrollo vegetal. La aplicación de estas metodologías ha resultado particularmente exitosa en el campo de la fisiología poscosecha de frutas y hortalizas, por lo que no resulta sorprendente llamar al estudio de procesos fisiológicos con técnicas de biología molecular, como fisiología molecular. Aunque en los albores de la ingeniería genética de plantas (principios de los años 80) las perspectivas de aplicación eran muchas y en diversas áreas, el primer producto manipulado por esta tecnología disponible comercialmente fue un fruto, el jitomate. Las propiedades de este fruto son una vida de anaquel mas prolongada que las variedades convencionales. Esto se logró gracias a estudios básicos del proceso de maduración de frutos.

Maduración de frutos

En muchas ocasiones resulta evidente la diferencia entre un fruto inmaduro y uno maduro. El cambio de color, aroma, sabor y textura son manifestaciones externas de una gran actividad metabólica interna. Existe un elemento clave para que un fruto madure y es el gas etileno, el cual, aunque tiene una estructura simple,

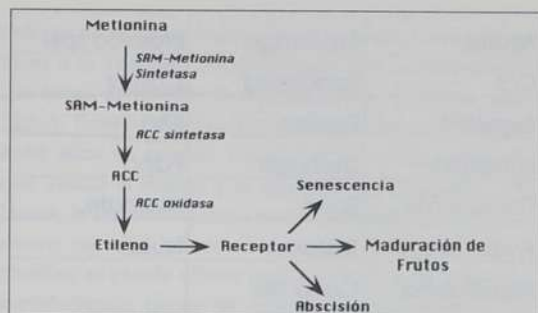


Fig. 5 La ruta biosintética del etileno. Se indican los principales intermediarios y las enzimas que los metabolizan así como tres procesos metabólicos en los que interviene el gas.

es capaz de provocar, a concentraciones muy bajas, efectos verdaderamente dramáticos en diversos procesos fisiológicos de las plantas⁴. El etileno fue detectado desde principios de este siglo precisamente por los efectos que tenía sobre la maduración de algunos frutos. Aunque al principio no se le consideró un producto vegetal, el desarrollo de poderosos métodos de análisis como la cromatografía de gases permitió demostrar que todas las plantas producían etileno de manera natural. Aunque todas las plantas producen etileno constantemente, existen determinadas etapas en el desarrollo durante las cuales la producción se incrementa considerablemente y una de estas etapas es precisamente la maduración de frutos⁴. El etileno acelera la maduración y esto tiene grandes repercusiones en la actividad agrícola de todo el mundo debido a que ocasiona considerables pérdidas poscosecha y en consecuencia pérdidas económicas. Todas las tecnologías actuales (como por ejemplo el uso de cámaras con atmósferas controladas) encaminadas a reducir las pérdidas poscosecha se basan en el control de la actividad o síntesis del etileno. Esto se consigue con diversos grados de éxito, pero en los frutos tropicales (mango, plátano, piña, guanabana etc) la aplicación de estas tecnologías no ha sido muy efectiva. Es precisamente en estos casos en donde la biología molecular y la ingeniería genética tendrán un impacto considerable.

Biología molecular del etileno

El etileno se sintetiza a partir del aminoácido metionina, siendo el principal intermediario el ácido 1-Amino ciclopropano carboxílico (Fig. 5). Las tres principales

Alfalfa	Espárrago	Brassica spp
Col	Zanahoria	Coliflor
Algodón	Pepino	Kiwi
Eucalipto	Lechuga	Papa
Cacahuete	Soya	Jitomate
Arroz	Tabaco	Nuez
Remolacha	Caña de azúcar	
Girasol	Maíz	Melón
Manzana	Calabaza	Ciruella
Crisantemo	Berenjena	

Tabla 1. Algunos cultivos modificados por Ingeniería genética

enzimas involucradas en la vía biosintética, S-adenosil metionina sintetasa, ACC sintetasa y ACC oxidasa han sido caracterizadas a nivel molecular y sus genes aislados de diversas plantas. El análisis de su expresión ha revelado que la S-adenosil metionina sintetasa es una enzima constitutiva además de que participa en otras reacciones metabólicas. Por el contrario la ACC sintetasa y la ACC oxidasa son enzimas que normalmente se encuentran en bajas cantidades o ausentes en frutos inmaduros pero que incrementan su actividad considerablemente durante la maduración. Utilizando técnicas de ingeniería genética fue posible bloquear la expresión de ambos genes por antisentido en plantas transgénicas de jitomate lo cual produjo frutos que producían muy poco etileno y por ello podían permanecer en condiciones adecuadas hasta tres meses^{10,11}. En contraste los frutos normales no duran más de dos semanas.

Por mucho tiempo se postuló que los efectos del etileno eran mediados por un receptor, el cual se encargaba de la transducción de las señales. La identificación de mutantes resistentes al etileno sirvieron para el aislamiento del primer receptor de una hormona vegetal^{5,6}. En este sentido en la Unidad Irapuato se ha aislado un gen que codifica para el receptor de etileno de un fruto tropical¹². La disponibilidad de este material abre la posibilidad de usarlo en experimentos de transformación genética para bloquear la producción de etileno tanto en frutas como en hortalizas.



Fig. 6 Una plántula regenerada de mango creciendo *in vitro* en una atmósfera rica en CO₂.

Para que la manipulación genética de los frutos tropicales sea una realidad, es necesario conocer en detalle qué mecanismos moleculares ocurren en estos frutos¹³. En nuestro laboratorio se ha aislado una serie de genes que tienen una participación activa en el proceso de maduración¹⁴. Lo interesante es que algunos de estos genes no se habían reportado previamente como participantes en el proceso de maduración^{15,16}. Actualmente se llevan a cabo estudios para dilucidar el papel que tienen en este proceso.

Ingeniería genética de frutos tropicales

La posibilidad de manipular o alterar la expresión de genes específicos por ingeniería genética ha revolucionado el campo de la fisiología vegetal. Actualmente la lista de especies vegetales susceptibles de transformación genética es considerable y crece a un ritmo acelerado (tabla 1). La mayoría de especies transformadas son del tipo herbáceo o arbustivo. Algunas especies de frutos del tipo leñoso han sido ya transformadas (manzana, nuez, ciruela, kiwi etc.). Sin embargo, los frutos tropicales en su mayoría aún no han sido manipulados genéticamente si exceptuamos a la papaya. Actualmente en la Unidad Irapuato se ha desarrollado un programa de regeneración y transformación genética de frutos tropicales como el mango, el aguacate y el plátano¹⁷ (Figs. 6 y 7). Al mismo tiempo se han aislado los genes que codifican para la síntesis de etileno de algunos de estos frutos¹⁸. Con una estrategia similar a la descrita anteriormente para el jitomate se intenta reducir la producción natural de etileno de estos frutos para alargar su vida de anaquel. Si la vida postcosecha de muchos frutos es corta debido al

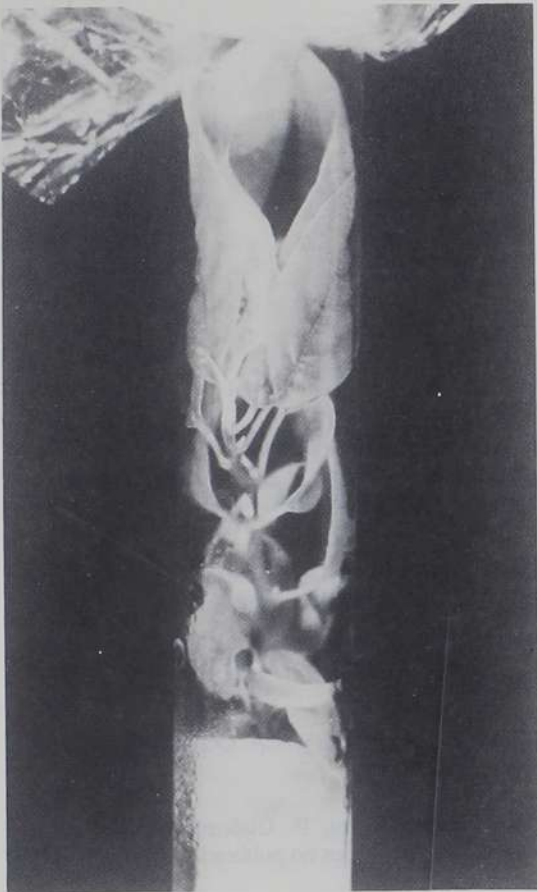


Fig. 7 Una plántula regenerada de aguacate creciendo *in vitro* en medio con iluminación total.

etileno, en los frutos tropicales este problema es particularmente agudo. Por ello, considerando los resultados obtenidos en la aplicación de tecnologías más convencionales en los frutos tropicales (cámaras de atmósferas controladas), la ingeniería genética parece ser una alternativa más efectiva. Esto permitiría la exportación de estos frutos a mercados lejanos, lo cual por el momento está restringido debido a su corta vida de anaquel.

Mejoramiento de frutos tropicales por ingeniería genética

El alargamiento de la vida de anaquel es solamente un aspecto de las múltiples aplicaciones que esta tec-

nología tiene en los frutos. Muchos de ellos son susceptibles a la infección por patógenos y la transformación con genes de resistencia representa una excelente alternativa. Existen muchos hongos que atacan a frutos y entre ellos se pueden mencionar a *Colletotricum spp* que infecta al mango y al aguacate, a *Micosphaerella fijiensis*, la famosa sigatoka negra del plátano y a *Phytophthora spp* que infecta al aguacate. La manipulación genética se puede utilizar para combatir a estos hongos introduciendo genes de resistencia tales como quitinasas, glucanasas, etc. Esta estrategia ya se ha probado con otras plantas y los resultados han sido excelentes.

Otra área de los frutos en la que también puede tener un impacto la ingeniería genética es en lo referente a la producción de aromas y sabores. Ya se han identificado algunos genes que codifican para enzimas involucradas en la producción de estos compuestos. La manipulación de estos genes para alterar o mejorar la calidad de muchos frutos está en proceso en varios laboratorios alrededor del mundo.

Finalmente los frutos, por medio de la ingeniería genética, podrían usarse como "biorreactores" para producir determinados compuestos útiles para el ser humano como diversos metabolitos, anticuerpos, plásticos y vacunas humanas. Actualmente se lleva a cabo en la Unidad Irapuato un proyecto de investigación en colaboración con instituciones de salud en México y la Universidad de Cornell para utilizar al fruto de plátano como vehículo para aplicar vacunas. Por el momento se tienen contempladas la vacuna contra el cólera y la hepatitis. Considerando el potencial de la ingeniería genética, las posibilidades de extender esta tecnología para abarcar otras vacunas son enormes.



Notas

1. E. M. Meyerowitz y C. R. Somerville, *Arabidopsis* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY, 1994)
2. P. Guzmán y J. Ecker, *Nucl. Acids Res.* **16**, 11091 (1988)
3. S. Gibson y C. Somerville, *TIBTECH* **11**, 306 (1993)

4. F. B. Abeles, P. W. Morgan y M. E. Saltveit Jr, *Ethylene in plant biology* (Academic Press, San Diego, CA, 1992)
5. P. Guzmán y J. Ecker, *Plant Cell* **2**, 513 (1990)
6. J. R. Ecker, *Science* **268**, 667 (1995)
7. M. Martínez-García, C. Garcidueñas-Piña y P. Guzmán, *Mol. Gen. Genet.* **252**, 587 (1996)
8. H. R. Herschman, *Annu. Rev. Biochem.* **60**, 281 (1991)
9. C. Garcidueñas-Piña, M.A. Cantero-García, M. Martínez-García, y P. Guzmán, *J. Mol. Biol.* enviado a publicación (1996).
10. J. Gray, S. Picton, J. Shabbeer, W. Schuch y D. Grierson, *Plant Mol. Biol.* **19**, 69 (1992)
11. P.W. Oeller, L.M. Wong, L.P. Taylor, D.A. Pike and A. Theologis, *Science* **254**, 437 (1991)
12. P. Gutiérrez Martínez y M.A. Gómez Lim, resultados no publicados
13. R. López-Gómez, y L.M. Gómez Lim, *J. Plant Physiol* **141** 82, (1992)
14. M.A. Gómez Lim, *Acta Horticulturae* **341**, 484, (1993)
15. G. Bojórquez, y M.A. Gómez Lim, *Plant Molecular Biology* **28**, 811 (1995)
16. A. Cruz Hernández y M.A. Gómez Lim, *Planta* **197**, 56 (1995)
17. A. Cruz Hernández y M.A. Gómez Lim, resultados no publicados
18. R. López-Gómez, P. Gutiérrez-Martínez y M.A. Gómez-Lim, resultados no publicados

Transformación genética de plantas

**Luis Herrera-Estrella, Alba Jofre y Garfias,
Gerardo Argüello Astorga y June Simpson**

Introducción

El desarrollo de metodologías para transferir genes derivados de otros organismos a plantas, y el avance en las tecnologías de cultivo de tejidos vegetales, han hecho factible la producción de plantas genéticamente modificadas (plantas transgénicas), que transmiten a su descendencia los genes que les fueron originalmente introducidos. En los últimos años se han generado plantas transgénicas con una mayor resistencia a enfermedades virales, al ataque de insectos, o tolerantes a dosis normalmente letales de herbicidas y otros agentes químicos, que tendrán un gran impacto en la producción agrícola futura. Al mismo tiempo, los sistemas transgénicos se han convertido en una poderosa herramienta para analizar y delimitar secuencias de DNA involucradas en el control transcripcional de los genes vegetales y el estudio de algunos procesos fisiológicos y del desarrollo que son poco accesibles a otros enfoques experimentales.

Mucho de este avance tan espectacular de la biología vegetal fue debido al intenso estudio de los mecanismos de patogénesis de una bacteria, *Agrobacterium tumefaciens*, de la cual se derivaron los primeros vectores para transformación genética de plantas.

El sistema de transferencia de genes de *Agrobacterium*

A. tumefaciens es una bacteria gram negativa del suelo

Los autores son investigadores del Departamento de Ingeniería Genética de Plantas de la Unidad Irapuato del Cinvestav.

que puede infectar una amplia gama de especies vegetales. La infección se inicia en zonas heridas de la planta, y da como resultado la formación de tumores ("agallas" o "tumores de corona"), producto del crecimiento desordenado de células vegetales no diferenciadas en la región infectada¹. Dos propiedades tipifican los tumores inducidos por *Agrobacterium*: (1) su crecimiento independiente de aporte exógeno de fitohormonas, normalmente requerido por células vegetales y (2) su capacidad metabólica de síntesis de un conjunto de compuestos nitrogenados atípicos, genéricamente denominados "opinas", que sirven de fuente de carbono y nitrógeno a las bacterias colonizantes. Las características fenotípicas anormales de las células que forman los tumores, son la consecuencia directa de la expresión de un segmento de DNA que *Agrobacterium* transfiere a las células infectadas, el cual se integra al genoma receptor en forma estable. Dicho segmento de DNA es conocido como T-DNA.

El T-DNA está contenido en un plásmido de gran tamaño (alrededor de 200 kpb), denominado plásmido Ti (*Tumor-inducing*) y codifica los genes involucrados en la formación de tumores y la síntesis de opinas. Dos repetidos directos de 25 pb (secuencias bordes) flanquean al T-DNA y delimitan de manera precisa los extremos del mismo. Tres genes localizados en el T-DNA codifican para enzimas involucradas en la síntesis de citocininas y auxinas, hormonas cuya acumulación es la causa directa de la proliferación de células indiferenciadas que da lugar a la formación de tumores.

Un análisis por mutagénesis usando transposones delimitó otra región del plásmido Ti involucrada en la formación de tumores, pero que no es transferida a la célula vegetal. Esta región de cerca de 35 kpb ha sido denominada región de "virulencia" (*vir*), y contiene 6 operones que codifican para todas las funciones responsables del procesamiento y transferencia del T-DNA al núcleo de células vegetales y probablemente también, de la integración del T-DNA al genoma de la célula vegetal receptante.

La secuencia de eventos que conducen a la formación de tumores inducidos por *A. tumefaciens* puede resumirse, para efectos de claridad, en cuatro etapas: colonización bacteriana y unión a las células vegetales; procesamiento y transferencia del T-DNA; integración del mismo al genoma de la célula receptante; y ex-

presión de las funciones codificadas por el ADN transferido.

La colonización se inicia cuando *Agrobacterium* es atraída a la zona herida por un fenómeno de quimiotaxis inducido por bajas concentraciones (10^{-7} M) de compuestos fenólicos tales como acetosiringona, ácido sinapínico o ácido caféico (probablemente intermedios o subproductos de la síntesis de lignina) presentes en los exudados de células vegetales. Estos mismos compuestos a concentraciones mayores (10^{-5} M) inducen la activación de la transcripción de los genes de virulencia. Estas moléculas inductoras son reconocidas por un sistema sensorial del tipo de dos componentes presentes en la bacteria, codificados por dos genes presentes en la región de virulencia (*virA* y *virG*).

El proceso de transferencia de DNA se inicia con el reconocimiento de las secuencias borde del T-DNA por un complejo formado por las proteínas codificadas por los genes *virD1* y *D2*. Este complejo VirD, hace un corte en la cadena inferior en cada una de las secuencias borde y se empieza a generar una copia de cadena sencilla del T-DNA, por un desplazamiento re-plcativo causado por los sistemas de reparación de DNA. Esta molécula de cadena sencilla queda covalentemente unida a la proteína *virD2*, y es recubierta por otra proteína, que se une a ácidos nucleicos monocatenarios, codificada por el gene *virE2*. Este complejo nucleoprotéico, llamado complejo T, es transferido a células vegetales por un proceso aparentemente análogo al de la conjugación bacteriana. Una vez presente en el citoplasma de la célula vegetal, el complejo T es guiado al núcleo por la proteína *VirD2*, la cual contiene secuencias de localización nuclear funcionales en plantas (figura 1). Ya en su destino final, el T-DNA se integra covalentemente al genoma de la planta, en una o más copias, en sitios distribuidos aleatoriamente en los cromosomas de la célula receptora. Una vez integrado en algún sitio del genoma de la célula infectada, los genes del T-DNA son transcritos por la RNA polimerasa II, cuya expresión resulta en el fenotipo tumoral.

Transferencia de genes foráneos a células vegetales

Una vez que se estableció definitivamente que *A. tumefaciens* es capaz de transferir un segmento del plás-

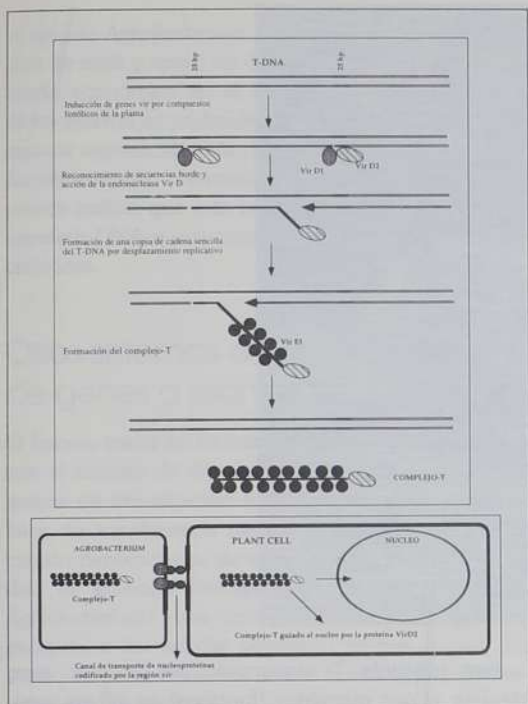


Figura 1. Representación esquemática de los eventos moleculares que resultan en la formación del complejo nucleoprotéico (complejo-T) que se transfiere de *Agrobacterium* a células vegetales.

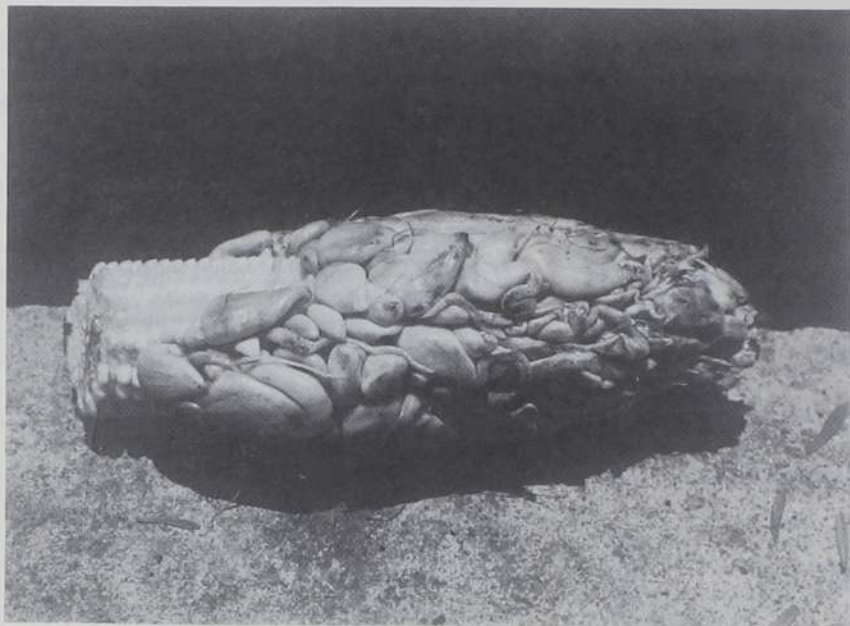
midido Ti al genoma de células vegetales, surgió un comprensible interés entre los biólogos moleculares por lo que parecía un vector potencial para transferir genes específicos a plantas. La demostración de que un transposón bacteriano (Tn7), inserto en la región T de un plásmido Ti, era transferido e integrado en el genoma de células de tabaco como parte del T-DNA², puso de relieve la capacidad de este sistema para transferir cualquier secuencia de ADN introducida experimentalmente en la región T del plásmido Ti.

Estudios orientados a establecer la funcionalidad de genes provenientes de otros organismos en sistemas vegetales, mostraron que los genes procarióticos o eucarióticos heterólogos intactos no son reconocidos por la maquinaria transcripcional de la planta, y por consiguiente, no son expresados. Esto llevó a la conclusión de que la expresión de genes heterólogos en sistemas vegetales, sólo sería posible si las secuencias codifican-

tes de los genes foráneos se colocaban bajo el control de señales transcripcionales funcionales en plantas.

El primer ejemplo exitoso de la expresión de un gen foráneo en células vegetales fue logrado en 1983 por Herrera-Estrella y colaboradores³, quienes para probar la factibilidad de expresar un gene bacteriano en plantas construyeron un gen quimérico compuesto por el promotor y el terminador de la transcripción del gen de la nopalina sintasa (un gen del T-DNA que es funcional en plantas), y la región codificante del gen bacteriano que codifica para la cloramfenicol-acetil transferasa (*cat*) proveniente del Transposon⁴. El gen híbrido fue insertado en el T-DNA de una cepa de *A. tumefaciens* y transferido a células de tabaco. La detección de los ARNm y la actividad enzimática correspondientes al gen *cat*, en los tumores de las plantas de tabaco infectadas con esta cepa, comprobó que el gen quimérico era correctamente transcrito y traducido, demostrándose de esta manera por primera vez que es posible expresar genes de otros organismos en tejidos vegetales.

Una vez que se sabía que la expresión de genes foráneos en células vegetales era factible, el desarrollo de un sistema eficaz de transformación de plantas requería del diseño y construcción de genes quiméricos susceptibles de ser usados como marcadores de selección dominantes, que son esenciales para la selección y recuperación de las células que han incorporado la información genética transflectada. El gen bacteriano que codifica para la neomicina-fosfotransferasa II (*nptII*), se presentaba como un buen candidato para la construcción de marcadores de ese tipo, ya que dicha enzima inactiva a los antibióticos kanamicina y G-418, ambos altamente tóxicos para células vegetales. Dos grupos independientes publicaron de manera simultánea^{5,6} la construcción de genes quiméricos en los que la secuencia codificante del gene *nptII* fue fusionada a las señales de iniciación y terminación de la transcripción derivadas del gen de la nopalina sintasa. Cuando este gen quimérico fue introducido en células vegetales, se encontró que las células transformadas mostraban resistencia a los antibióticos kanamicina y G-418, demostrándose que el gen híbrido transflectado era funcional en plantas. Los genes quiméricos que expresan NPT II se convirtieron pronto en los marcadores de selección estándar para vectores de clonación y expresión en plantas.



Vectores no-oncogénicos derivados del plásmido Ti

Como ya se ha descrito, los primeros experimentos de transferencia de genes a células vegetales se llevaron a cabo utilizando plásmidos Ti oncogénicos, por lo que no era posible regenerar plantas a partir de las células transformadas. Para que ello fuese factible era indispensable el diseño y construcción de plásmidos Ti no-oncogénicos que preservaran, sin embargo, su capacidad de movilizar el T-DNA al huésped vegetal. El descubrimiento de que el T-DNA no codifica ninguna función para su procesamiento y transferencia al genoma de células vegetales, y que los repetidos directos de 25 pb en sus extremos son los únicos elementos de esta región indispensables para que tales procesos tengan lugar, condujo pronto al desarrollo de ese tipo de vectores. Zambriski y colaboradores⁷ construyeron un plásmido Ti "desarmado", de cuyo T-DNA se eliminaron los genes implicados en la biosíntesis de hormonas (los "oncogenes"), preservándose del original solamente las secuencias bordes (repetidos de 25 pb) y el gen de la nopalina sintasa (*nos*), este último utilizado como gen reportero para demostrar que los plásmidos desarmados son funcionales en la transferencia del T-DNA.

Este plásmido Ti desarmado fué utilizado para transferir el gen quimérico (funcional en células vegetales) que codifica para la neomicina fosfotransferasa II a células de tabaco, encontrándose que los transformantes adquirieron resistencia a kanamicina y, lo que fue más importante, respondieron normalmente a fitohormonas y pudieron dar origen a plantas completas y aparentemente inalteradas. Más aún, estas plantas transgénicas produjeron semillas, y su análisis mostró que el patrón hereditario del gen quimérico correspondía a una distribución mendeliana típica para un carácter monogénico dominante⁸. Este resultado abrió una amplia perspectiva para la generación de plantas transgénicas, e impulsó el desarrollo de otros vectores Ti "desarmados", cuyo diseño facilita enormemente la inserción del gen de interés en el T-DNA.

El sistema de transformación de plantas basado en *A. tumefaciens* ha sido aplicado exitosamente a un gran número de plantas dicotiledóneas, como tomate, papa, petunia, soya, zanahoria, lino, algodón y otras. Esfuerzos iniciales de transformar cereales y algunas otras importantes variedades agrícolas tuvieron poco éxito, y fueron interpretados como consecuencia de una pretendida incapacidad de *Agrobacterium* para transferir DNA a especies que no son sus huéspedes naturales. Sin embargo, recientemente se ha registrado

el uso de *Agrobacterium* para la eficiente transformación de maíz y arroz, los dos cereales de mayor importancia económica en el mundo, lo que sugiere que dicho sistema es probablemente efectivo para cualquier especie vegetal. Más aún, la reciente transformación de *Saccharomyces cerevisiae* usando *Agrobacterium* parece indicar que esta bacteria tiene la capacidad de transferir DNA a una amplia gama de organismos eucarióticos.

Otros sistemas de transferencia de genes a plantas

El fracaso inicial en los intentos de transformar cereales con el sistema de *Agrobacterium*, estimuló a muchos grupos de investigación a desarrollar sistemas alternativos de transferencia directa de genes a plantas. El común denominador de estas técnicas es que prescinden de sistemas biológicos de transferencia (virus, *Agrobacterium*) para introducir información genética exógena a las células vegetales, lo que logran por medio de procedimientos de naturaleza química, físico-química, o mecánica.

Muchos métodos de transferencia directa de DNA a células vegetales fueron desarrollados con diferentes grados de éxito, entre los que destacan la incubación con polietilén glicol y CaCl_2 , la microinyección, la electroporación, y el bombardeo con micropartículas. Por limitaciones de espacio y la importancia relativa de cada uno de estos métodos, nos limitaremos a describir el más frecuentemente utilizado de estos métodos, el bombardeo con micropartículas o biobalística.

Biobalística

La biobalística o bombardeo con micropartículas es un proceso muy original desarrollado por el grupo del Dr. John Sanford, que permite introducir DNA a virtualmente cualquier tipo de célula. En este procedimiento el DNA es introducido a las células por medio de partículas microscópicas aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la membrana celular sin causar, por lo general, efectos letales⁹. Los microproyectiles son partículas de forma aproximadamente esférica (de 0.4 a 2.0 micrómetros de diámetro), hechas con materiales densos como tungsteno u oro,

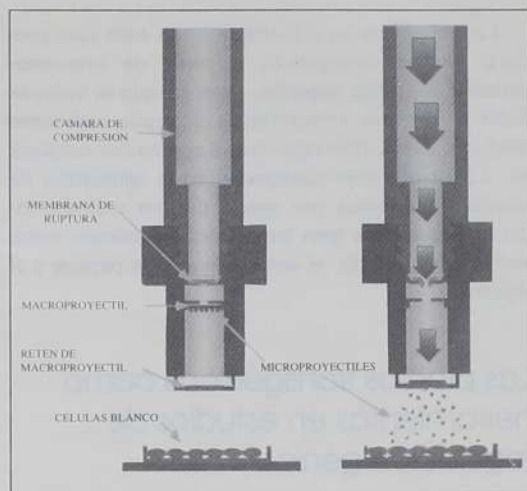


Figura 2. Representación esquemática del sistema de bombardeo con micropartículas o biolística. Se muestra el sistema más moderno, en donde el macroproyectil es propulsado por una descarga de helio a alta presión.

y que se recubren con el ADN que se desea transferir a las plantas⁹. Para acelerar los microproyectiles y que adquieran un *momentum* (masa x velocidad) suficiente para penetrar a las células blanco, se utilizan "macroproyectiles" que son impulsados a grandes velocidades (los microproyectiles son colocados sobre su superficie) por un choque de gas, que puede derivarse de una explosión química, la explosión eléctrica de una gota de agua, o una descarga de un gas inerte⁹. Las células o tejidos que constituyen el blanco de los proyectiles se disponen de tal forma que presentan la máxima superficie para el bombardeo, en una área de cerca de 5 cm de diámetro (figura 2).

El método biolístico podría considerarse lo más cercano a un mecanismo "universal" de transferencia de genes, ya que por su naturaleza totalmente física, es independiente del tipo de célula blanco y ha sido utilizado no sólo para introducir ADN exógeno a células vegetales, sino a células de una gran variedad de organismos tales como bacterias, algas, hongos, células animales, y aun animales y plantas intactas. Adicionalmente, el proceso biolístico parece ser al presente el único medio de transformar de modo reproducible organelos celulares, como mitocondrias, y cloroplastos.

La biobalística ha sido utilizada con éxito para producir plantas transgénicas a partir de una gran variedad de tejidos vegetales, entre los que se incluyen hojas, meristemas, embriones en desarrollo, embriones maduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares etc. Los logros más connotados en la generación de plantas transgénicas por medio de este método, incluyen especies de gran importancia económica como son la soya, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya y el espárrago.

Las plantas transgénicas como herramientas en estudios de regulación génica

Los sistemas transgénicos han constituido una poderosa herramienta para estudiar los procesos de control transcripcional de los genes vegetales, y para delimitar con gran precisión las secuencias de DNA responsables de regular su expresión. Asimismo, la caracterización de los promotores de genes que son activados o reprimidos por el efecto de factores ambientales, o que muestran un patrón de expresión específico de tejido y/o de una etapa del desarrollo, ha tenido un gran impacto en la ingeniería genética de plantas, al proporcionar a los biotecnólogos los elementos necesarios para impartir a los genes híbridos de interés agronómico o industrial, las características de regulación más convenientes para los fines prácticos perseguidos.

Las primeras investigaciones relativas al control de la expresión génica en plantas, se centraron sobre dos familias de genes cuyos productos juegan un papel crucial en el proceso fotosintético: los genes que codifican la subunidad pequeña de la ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa (genes *rbcS*), y los genes que codifican las proteínas que se asocian a las clorofilas a y b (genes *cab*) en los llamados complejos colectores de luz de los cloroplastos. Estos genes resultaban especialmente atractivos para esta clase de estudios, ya que su actividad transcripcional es afectada por múltiples factores, entre los que destaca la luz y señales endógenas asociadas al tipo de tejido o a la presencia y estado funcional de los cloroplastos.

En el primer estudio realizado con un sistema vege-

tal transformado (callos de tabaco), se pudo demostrar que un fragmento de 973 pb derivado del gen *SS 3.6* (un gen *rbcS*) del chícharo, posee la información necesaria para conferir expresión fotoinducible y dependiente de cloroplastos a un gen reportero *cat*¹⁰. Posteriormente, se encontró que esta región 5' de *SS 3.6* incluye elementos con ciertas propiedades de "enhancer" transcripcional, ya que un fragmento que comprende de -90 a -973 de ese gen, fusionado a un promotor NOS truncado, fue capaz de promover la expresión fotorregulada del gen *CAT*, lo mismo si estaba fusionado en su orientación normal o en la opuesta¹¹.

En un estudio similar, realizado esta vez con plantas transgénicas regeneradas, y en el que se examinó la secuencia flanqueante 5' del gen *AB80* (un miembro de la familia de genes *cab*) de chícharo, se demostró que un segmento de 247 pb de la misma combina las propiedades de "activador" y "represor" de la transcripción. Plantas transformadas con un gen quimérico integrado por un segmento 5' de *AB80* (-347 a -100), fusionado a un promotor NOS truncado y la secuencia codificante de *NPT (II)*, expresaron el gen híbrido en las hojas a niveles entre 5 y 8 veces más altos en presencia de luz que en la oscuridad, pero no manifestaron actividad detectable de *NPT (II)* en raíces, a diferencia de plantas transformadas con un gen quimérico similar pero carente de la secuencia *AB80*, que expresaron *NPT (II)* a niveles equiparables tanto en raíces como en hojas, y lo mismo en la luz que en la oscuridad. Por lo tanto, se concluyó que el elemento *AB80* ensayado funciona a la vez como "enhancer" fotorregulado en hojas, y como un silenciador transcripcional específico de tejido, en raíz¹².

Un gran número de estudios subsecuentes, basados en estrategias similares en lo esencial a las de los trabajos mencionados, y que se han beneficiado además de la existencia de nuevos genes reporteros, han conducido a la delimitación muy precisa de elementos de secuencia que están involucrados en la respuesta transcripcional de genes vegetales a agentes externos, como luz, virus, hongos, daño mecánico, y anaerobiosis, así como a un conjunto de señales endógenas que determinan la expresión específica de tejido, y la activación por hormonas, cuya producción está vinculada tanto a estímulos internos como externos.

Una importante consecuencia de los avances en la



delimitación fina de elementos cis-reguladores, ha sido la de facilitar la caracterización de factores nucleares que interactúan específicamente con tales elementos, y regulan en *trans* la actividad de los genes. La implementación de sistemas de expresión en los que coexisten genes híbridos con secuencias de control definidas, y los genes que codifican los factores que interactúan específicamente con ellas, modificados estos últimos de tal forma que su expresión pueda modularse experimentalmente, habrá de conducir a una comprensión más profunda de los mecanismos moleculares que subyacen a los complejos procesos de regulación génica en plantas, conocimiento que a su vez permitirá un mejor control de los genes de interés agronómico transferidos a plantas, para su funcionamiento óptimo a nivel de campo.



Notas

1. M. De Cleene, J. De Ley, *Bot. Rev.* **42**, 389 (1976).
2. J.P. Hernalsteens, F. Van Vliet, M. De Beucheleer, A. Depicker, G. Engler, *et al. Nature* **287**, 654 (1980).
3. L. Herrera Estrella, A. Depicker, M. Van Montagu y J. Schell, *Nature* **303**, 209 (1983).
4. J. Simpson, J. Schell, M. Van Montagu y L. Herrera-Estrella, *Nature* **323**, 551 (1986).
5. R.T. Fraley, S.G. Rogers, R.B. Horsch, P. Sanders, J. Flink, S. Adams, M. Bittner, L. Brand, C. Fink, J. Fry, G. Gallupi, S. Goldberg, N. Hoffman y S. Woo, *Proc.Natl.Acad.Sci.* **80**, 4803 (1983).
6. L. Herrera Estrella, M. De Block, M. Van Montagu y J. Schell, *EMBO J.*, **2**, 987 (1983).
7. P. Zambryski, H. Joos, C. Genetello, J. Leemans, M. Van Montagu y J. Schell, *EMBO J.* **2**, 2143 (1983).
8. M. De Block, L. Herrera-Estrella, M. Van Montagu, J. Schell y P. Zambryski, *EMBO J.* **3**, 1681 (1984).
9. J. Sanford, *Trends Biotech* **6**, 229 (1988).
10. L. Herrera Estrella, G. Van den Broeck, R. Maenhaut, M. Van Montagu, J. Schell, *et al. Nature* **310**, 115 (1984).
11. M.P. Timko, A.P. Kausch, C. Castresana, J. Fassler, L. Herrera-Estrella y A. Chasmore, *Nature* **318**, 579 (1985).
12. J. Simpson, M. Van Montagu y L. Herrera-Estrella, *Science* **233**, 34 (1986).



INFORMACION PARA LOS AUTORES de *Avance y Perspectiva*

La revista *Avance y Perspectiva* (A y P), órgano de difusión del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), es una publicación bimestral con artículos de divulgación y notas sobre avances científicos y tecnológicos. Los artículos o notas que se propongan para ser publicados en A y P deben enviarse por triplicado a:

Director Editorial, *Avance y Perspectiva*
CINVESTAV
Apdo. Postal 14-740
07000 México, D.F.
Tel. 747 7000-01 ext. 2536
Fax: 747 7076

Los artículos y notas recibidos serán evaluados por especialistas seleccionados por el Consejo Editorial. Los artículos de divulgación deben dar cuenta de los logros o avances obtenidos en las especialidades que se cultivan en el CINVESTAV. Se buscará que su contenido sea ameno y novedoso. Deberán ser escritos a máquina, a doble espacio, con márgenes amplios y extensión máxima de 20 cuartillas. El lenguaje debe ser accesible a estudiantes de licenciatura sin perjuicio de la información científica o académica contenida en el artículo. Cuando sea necesario el uso de tecnicismos, deberá explicarse su significado con la amplitud conveniente. Se recomienda la inclusión de recuadros que aclaren el significado de conceptos de difícil comprensión. Dentro de lo posible, se evitará el uso de fórmulas y ecuaciones. Los artículos pueden tener subtítulos o incisos y un resumen al principio, no mayor de cinco líneas, a manera de introducción, que atraiga el interés del lector. Las referencias bibliográficas aparecerán completas al final del artículo; cuando se mencionen en el artículo deberán indicarse con un superíndice y estar numeradas por orden de aparición.

Deberán enviarse los originales de las figuras, gráficas o fotografías que acompañen el texto. Las figuras y gráficas se deben preparar por computadora a línea sin pantallas o con tinta china sobre papel albanene con buena calidad. Los autores recibirán las pruebas de galera de sus artículos con la debida anticipación. Sin embargo, para evitar retrasos en el proceso de publicación, los autores que usen un procesador de textos en microcomputadora, además del texto impreso en papel, deben enviar su texto grabado en un disco flexible. Los procesadores de texto útiles para este propósito son: *Microsoft Word*, *Word Perfect*, *Ami Pro*, *Xy Writer*, *Wordstar* y *Multimate*, guardando el documento con la extensión DOC.

Dos aproximaciones a la bioquímica de las plantas

Alejandro Blanco Labra, Luis E. González de la Vara y Silvia E. Valdés Rodríguez

La Unidad Irapuato, ahora Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, del Cinvestav, fue fundada hace 15 años. Su objetivo principal era desarrollar tecnología útil para preservar productos agrícolas, así como para aumentar la producción de los mismos. Por primera vez el Cinvestav se involucraba en investigaciones agrícolas. Por otra parte, la fundación de esta Unidad coincidió con el inicio de la biología molecular de plantas, la cual se ha desarrollado explosivamente en estos últimos 15 años. Por esto, también se planeó trabajar en esta disciplina que, como veremos, complementa a las investigaciones en bioquímica de plantas, como las que se describen en este artículo.

Factores intrínsecos de resistencia

El laboratorio, que entonces se llamó de Almacenamiento de Granos y Semillas, fue establecido al fundarse la Unidad para buscar soluciones a problemas de infestaciones de los granos almacenados, por insectos u hongos. Desde entonces, en este laboratorio comenzamos a estudiar los factores intrínsecos de resistencia al ataque de insectos y hongos presentes en los granos de maíz. ¿Por qué? Porque, especialmente en regiones agrícolas como El Bajío, resulta de gran importancia poder contar con alternativas no contaminantes para el combate a las plagas. El uso intenso de insecticidas ha producido daños ecológicos significativos, no sólo porque atacan indiscriminadamente a muy diversos organismos, tanto dañinos como benéficos; sino

Los autores son investigadores del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato del Cinvestav.

también porque, en la medida en que los insectos adquieren resistencia a un insecticida dado, los usuarios, que en general saben muy poco sobre sus consecuencias, elevan las dosis generando problemas tanto a los humanos como a los animales, domésticos y silvestres. Los factores intrínsecos de resistencia presentes en las semillas, en cambio, son más específicos pues actúan solamente sobre aquellos insectos u hongos que atacan a las plantas, o a las semillas almacenadas. La flora y la fauna circundantes no son afectadas.

Entre los primeros factores intrínsecos de resistencia que estudiamos se encuentran los inhibidores de proteasas o de amilasas. Los insectos y los hongos utilizan a las proteasas y amilasas para digerir, respectivamente, a las proteínas y al almidón presentes en las semillas de las que se alimentan. La presencia en los granos de inhibidores, que impiden la actividad de las enzimas mencionadas, disminuyen de esta manera la severidad de los ataques de hongos e insectos.

Primeramente aislamos y caracterizamos un inhibidor de semillas de maíz con actividad contra amilasas. Más tarde encontramos otro inhibidor que tenía actividad tanto contra proteasas como contra amilasas, y se ensayó su actividad contra enzimas de diversos insectos y hongos. Posteriormente, en colaboración con el Dr. M. Richardson de la Universidad de Durham, obtuvimos su secuencia de aminoácidos.

Esta secuencia fue sorprendente, pues reveló que este inhibidor presentaba grandes semejanzas con la taumatina, una proteína de semillas de *Thaumatococcus danielli*, un arbusto africano. En ese tiempo el estudio de la taumatina presentaba un gran interés pues su sabor es extremadamente dulce y podría ser un buen edulcorante. Aunque el inhibidor de maíz no es dulce, y la taumatina no presenta actividad inhibitoria, la semejanza entre estas proteínas sugirió a los editores el título del artículo de *Nature*¹, donde se publicaron estos resultados.

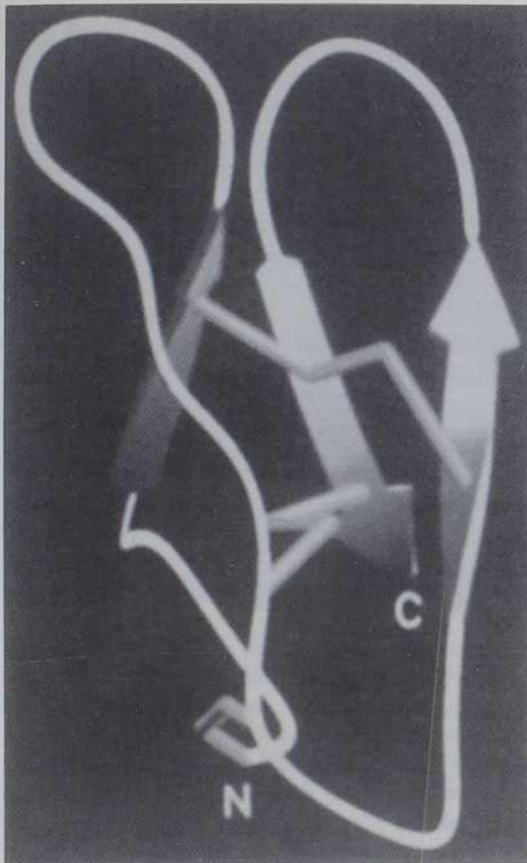
La colaboración con el Dr. Richardson continuó: secuenciamos otros dos inhibidores (de lenteja y calabaza), que resultaron ser casi idénticos a otros inhibidores bien conocidos. En fin, no se puede anticipar la importancia de un descubrimiento. Todavía secuenciamos y caracterizamos bioquímicamente un nuevo



inhibidor de proteasas, esta vez de amaranto y en colaboración con la Dra. Magdalena Segura, investigadora de nuestra Unidad².

Continuamos hasta hoy con el aislamiento y la caracterización de inhibidores de proteasas y amilasas de diversas fuentes vegetales para aprovechar su gran diversidad. Estudiamos actualmente inhibidores de frijol tepari (*Phaseolus acutifolius*, un frijol muy resistente a la sequía, que se consume en el norte del país) y de quinoa (*Chenopodium quinoa*, una planta semejante al amaranto, cuyas semillas son consumidas en los países andinos). Por otra parte, hemos estudiado las enzimas de insectos que se alimentan de semillas almacenadas, que pudieran ser afectadas por los inhibidores presentes en ellas. De esta manera hemos caracterizado las principales amilasas y proteasas del barrenador grande del maíz: *Prostephanus truncatus*. Este insecto es el causante de grandes pérdidas en el maíz almacenado, no sólo en México de donde es originario, sino principalmente en los países africanos a donde ha sido introducido junto con el maíz mismo.

Dos resultados experimentales enfatizan la importancia de los inhibidores de proteasas en la defensa contra el ataque de insectos. Algunos de ellos son sintetizados en las hojas de las plantas en respuesta a las heridas causadas por insectos herbívoros³. También se han obtenido plantas transgénicas de tabaco que expresan inhibidores de proteasas del frijol *Vigna unguiculata*, que son más resistentes al ataque de insectos⁴. Pero, en el caso específico del maíz almacenado ¿son los inhibidores de proteasas los principales, o únicos, factores intrínsecos de resistencia? Para responder a esta pregunta, José Antonio Serratos desa-



Modelo esquemático de la Estructura del Inhibidor de amilasa. Aislado de semillas de amaranto (AAI).

rolló su tesis doctoral. La respuesta parece ser que probablemente no, pues el contenido de compuestos fenólicos correlaciona mejor con la resistencia al ataque de insectos que el contenido de inhibidores. Por otra parte, la dureza de la testa (la capa más exterior del grano) sólo presentó correlación con esta resistencia a valores extremos⁵.

Bioenergética y biomembranas

A diferencia de las investigaciones descritas hasta ahora, que fueron iniciadas en respuesta a un problema al que se enfrentaban los agricultores, el Laboratorio de Bioenergética y Biomembranas se estableció en 1984 para realizar estudios bioquímicos básicos sobre la fisiología normal de las plantas. Muy

pronto las investigaciones se concentraron en la membrana plasmática de las células vegetales, pues esta membrana constituye el límite entre el "interior" de las células y el "medio externo". Al ocupar esta posición de frontera, es natural que tenga la capacidad de reconocer múltiples señales externas; ya sean de naturaleza física (luz, calor) o biológica (herbívoros, hormonas, productos de bacterias u hongos). Ahora se sabe que la membrana plasmática no solamente percibe estas señales, sino que las procesa y envía moléculas mensajeras a las diferentes partes de la célula involucradas en la respuesta al estímulo percibido. Este proceso se conoce como transducción de señales.

Por otra parte, en la membrana plasmática también ocurren importantes transformaciones energéticas. Una enzima situada en ella: la H^+ -ATPasa, gasta más del 25% del ATP (el trifosfato de adenosina, el compuesto responsable de transferir la energía producida por fotosíntesis o respiración a los sitios de la célula donde se necesita) producido para transportar iones H^+ hacia el exterior de la célula. Esto produce una diferencia de acidez y de potencial eléctrico entre el interior y el exterior de la célula. En esta diferencia se conserva la energía que es utilizada principalmente para el transporte de nutrientes.

Por esta razón, la H^+ -ATPasa fue nuestro primer objeto de estudio. Se conocía que esta enzima era del "tipo P", como otras ATPasas que transportan sodio, potasio o calcio en células animales. Las ATPasas de tipo P presentan tres características comunes: (1) tienen una subunidad catalítica única que hidroliza el ATP y transporta los iones (son, quizá, más simples de estudiar que las ATPasas de otros tipos, con múltiples subunidades); (2) no hidrolizan el ATP directamente, sino que un grupo fosfato del ATP se une primero a la enzima, y después este fosfato es removido de la enzima, por hidrólisis; y (3) al hidrolizar ATP y transportar iones, estas ATPasas oscilan entre dos conformaciones, llamadas E1 y E2.

Cuando comenzamos a investigar sobre la H^+ -ATPasa de las células de betabel (*Beta vulgaris*, una planta sin mayor importancia comercial, pero muy adecuada para estudios bioquímicos), ya se sabía que esta enzima tenía las características 1 y 2, mencionadas anteriormente. Nosotros encontramos evidencias que señalan que también tiene la característica 3: también



es posible que adopte dos conformaciones durante su ciclo catalítico.

Primeramente observamos las inhibiciones producidas sobre la H^+ -ATPasa por el fosfato inorgánico, un producto de la reacción catalizada por esta enzima, y por el vanadato, un análogo del fosfato. Estas inhibiciones fueron mayores a concentraciones altas de ATP, lo que sugiere que éste, al unirse a la enzima en la conformación E1, de alguna manera "crea" un sitio al que se une el vanadato, quizá induciendo un cambio a la conformación E2. Además observamos que la inhibición por fosfato es parcial: aun a concentraciones saturantes de fosfato la ATPasa no se inhibía completamente. Esto, junto con otras observaciones, nos llevó a proponer un mecanismo cinético diferente para esta enzima⁶.

Por otra parte, fosforilamos a la H^+ -ATPasa, no con ATP como ocurre normalmente, sino con fosfato inorgánico, como si la enzima trabajara en reversa⁷. Esta fosforilación es incrementada por el ATP, lo que indica nuevamente que la ATPasa puede adoptar dos conformaciones de manera alternativa.

Precisamente cuando observábamos la fosforilación de la ATPasa encontramos que las membranas plasmáticas de betabel tienen una gran actividad de

proteína cinasa. Las proteínas cinasas son enzimas que unen un grupo fosfato (generalmente del ATP) a una proteína, principalmente para modificar la actividad enzimática de la proteína fosforilada. Como la actividad de las cinasas también está regulada, aquí tenemos un ejemplo de transducción de señales: un factor variable activa a la cinasa, que a su vez fosforila a una o varias proteínas cuya actividad se modifica en consecuencia.

¿Cuál es el factor variable que activa a las cinasas? El calcio, cuya concentración dentro de la célula varía en respuesta a diversos estímulos, activa a la mayoría de las cinasas de la membrana plasmática. Así comenzamos a estudiar estas enzimas⁸, y el aislamiento y caracterización de una de ellas fue el tema de tesis doctoral de Víctor M. Baizabal Aguirre. Más tarde comenzamos el estudio de una segunda cinasa.

No conocemos aún cuáles son las proteínas que son fosforiladas naturalmente por las cinasas que hemos estudiado; pero por otra parte, sabemos que la H^+ -ATPasa es fosforilada por una cinasa dependiente de calcio (en un sitio y por un tiempo diferentes de la fosforilación que ocurre durante la catálisis). ¿Cuál es esta cinasa? No lo sabemos, pero puede pertenecer a una clase de cinasas descubiertas recientemente en plantas: las CDPK. ¿Qué efectos tiene la fosforilación



dependiente de calcio sobre la ATPasa? Hemos observado que la actividad de la H^+ -ATPasa disminuye cuando es fosforilada.

Durante este tiempo la biología molecular produjo resultados cada vez más abundantes. El primer gen de una H^+ -ATPasa de una membrana plasmática vegetal fue aislado en 1989. Esto nos permitió conocer la secuencia de aminoácidos de esta enzima. Dos años más tarde se encontró que un extremo de esta ATPasa tenía propiedades auto-inhedoras: si era removido, la actividad de hidrólisis de ATP aumentaba notablemente. Tenemos evidencias de que las cinasas dependientes de calcio fosforilan a la H^+ -ATPasa precisamente en este extremo. Probablemente, su potencia inhibitoria es mayor cuando está fosforilado.

Actualmente continuamos purificando y caracterizando a las proteínas cinasas estimulables por calcio de la membrana plasmática. Tratamos de identificar a la cinasa que fosforila a la H^+ -ATPasa. Hemos detectado la presencia de otras proteínas involucradas en la transducción de señales, como las fosfatasa, que remueven de las proteínas el fosfato unido por las cinasas. Finalmente hemos iniciado la caracterización de receptores a estímulos extracelulares, para conocer los mecanismos que permiten a las células vegetales regular sus funciones en respuesta a señales del ambiente.

Biología estructural

Volvamos ahora al Laboratorio de Almacenamiento de Granos y Semillas que ha cambiado su nombre a Laboratorio de Mecanismos de Defensa de Plantas, donde hemos iniciado estudios de biología estructural de algunos de los inhibidores aislados. Determinar la estructura de las moléculas que intervienen en los procesos biológicos es uno de los objetivos más importantes de la investigación bioquímica; y correlacionar esta estructura con la función es, quizá, más importante aún. Los inhibidores de proteasas y amilasas son un buen modelo para estudiar las interacciones entre proteínas; pues si se conocen sus estructuras, se pueden deducir fácilmente sus interacciones con las enzimas que inhiben.

Los inhibidores que estudiamos, como todas las proteínas, presentan varios niveles de estructura: la estructura primaria (la secuencia de aminoácidos) se puede determinar por degradación química de la proteína purificada o, en muchos casos más fácilmente, a partir de la secuencia de su gen particular. Actualmente, en colaboración con los doctores June Simpson y Luis Herrera Estrella, estamos aislando y caracterizando los genes de los inhibidores de proteasas y de amilasas de amaranto.

Por otra parte, hemos encontrado que la estructura primaria del inhibidor de proteasas del frijol tépari, es similar a la de inhibidores del tipo "Bowman-Birk". Estos poseen dos sitios, con los que reconocen a la tripsina y a la quimotripsina, respectivamente. Nuestro inhibidor, sin embargo, reconoce sólo a la tripsina. Por esto proponemos que se trata de un inhibidor ancestral, cuyo gen dio origen, por duplicación y mutación, a los inhibidores del tipo Bowman-Birk. El inhibidor de tépari, además, no actúa como monómero, sino como trímero.

Las cadenas de aminoácidos, que constituyen a las proteínas, normalmente se enrollan formando patrones sencillos característicos (estructura secundaria), los cuales se distribuyen en el espacio (estructura terciaria) de tal manera que su energía conformacional tiende a ser mínima. La estructura terciaria de una proteína se puede determinar mediante difracción de rayos X, si se cuenta con la proteína cristalizada; o por resonancia magnética nuclear, si la proteína es lo suficientemente

pequeña, como el inhibidor de amilasas mencionado, cuya estructura determina actualmente, por este método, la Dra. S. Wodak. Si se conoce la secuencia y la estructura de una proteína similar, se puede a veces hacer una predicción de la estructura, calculando aquella de energía mínima. De esta manera, en colaboración con el Dr. S. Pongor, hemos modelado la estructura del inhibidor de amilasas de amaranto⁹. ¿A qué se parece? A una proteína de veneno de araña.

Balance y perspectivas

En este momento, a los 15 años de existencia de la unidad, es tiempo de pensar en el balance y las perspectivas de nuestro trabajo. ¿Hemos llegado al objetivo planteado originalmente (mejorar la abundancia y calidad de los productos vegetales almacenados)? No. ¿Nos acercamos a él por la vía más corta conocida? Probablemente tampoco. ¿Por qué? Porque hemos seguido la lógica propia de la ciencia, que nos dice que en la investigación nunca se sabe de antemano cual es el camino mas corto a un objetivo. ¿Es posible, entonces, alcanzar objetivos prácticos siguiendo la lógica científica? Creemos que sí. Estamos convencidos de que conociendo las bases moleculares del funcionamiento de las plantas, tendremos elementos para proponer soluciones que hoy no podemos siquiera imaginar.



Notas

1. M. Richardson, S. Valdés Rodríguez y A. Blanco-Labra, *Nature* **237**, 432 (1987).
2. S. Valdés Rodríguez, M. Segura Nieto, A. Chagolla-López, A. Verver y Vargas Cortina, N. Martínez Gallardo y A. Blanco Labra, *Plant Physiol.* **103**, 1407 (1993).
3. J. S. Graham, G. Pearce, J. Merryweather, K. Titani, L. Ericsson y C. Ryan, *J. Biol. Chem.* **260**, 6555 (1985).
4. V.A. Hilder, A.M.R. Gatehouse, S.E. Sherman, R.F. Baker y D. Boulter, *Nature* **300**, 160 (1987).
5. J.A. Serratos, A. Blanco Labra, J.A. Mihm, L. Pietrzak y J.T. Arnason, *Can. J. Bot.* **71**, 1176 (1993).
6. L. González de la Vara, V.M. Baizabal Aguirre y M.G. Medina, *Physiol. Plant.* **86**, 407 (1992).
7. L. González de la Vara y G. Medina, *Plant Physiol.* **94**, 1522 (1990).
8. V.M. Baizabal Aguirre y L. González de la Vara, *Physiol. Plant.* **91**, 147 (1994).
9. A. Chagolla, A. Blanco Labra, A. Patthy, R. Sánchez and S. Pongor, *J. Biol. Chem.* **269**, 23675 (1994).

Productos naturales

Mercedez G. López y Jorge Molina

Compuestos orgánicos volátiles

Mesoamérica es una de las principales zonas de biodiversidad en el mundo. Las posibilidades de subsistencia de los recursos florísticos endémicos en esta área se encuentran paulatinamente restringidas por razones diversas. Por ello resulta interesante estudiar el metabolismo secundario asociado a grupos taxonómicos que han desarrollado estrategias químicas o bioquímicas para interaccionar con otros organismos. Esta interacción involucra la presencia de compuestos bioactivos que incluyen desde potentes componentes tóxicos hasta moléculas altamente especializadas utilizadas para comunicarse con otros organismos.

Se sabe que las plantas tienen la capacidad de biogenerar una larga variedad de compuestos orgánicos volátiles (COV) que desempeñan diversos papeles fisiológicos y de transmisiones de señales. Algunos de estos compuestos orgánicos son emitidos en cantidades suficientemente grandes como para producir un impacto en el medio ambiente. Por ejemplo, algunos monoterpenos inducen la producción de ozono, el geraniol es un atrayente de polinizadores, ciertos aldehídos actúan como defensas químicas contra el ataque de microorganismos y otros señalan sitios de alimentación. Además, algunos tienen efectos muy profundos en el comportamiento, estado de ánimo y funcionamiento humano. Por ejemplo, para algunas personas el aroma de las violetas sugiere distinción, elegancia y perfección.

Los autores son investigadores del Departamento de Biotecnología y Bioquímica de la Unidad Irapuato del Cinvestav.

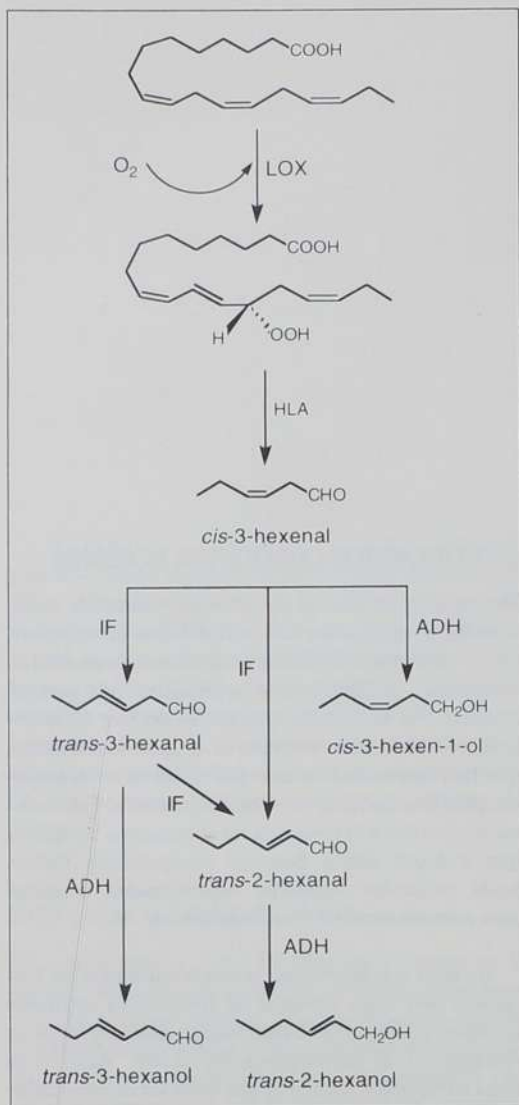


Figura 1. Biodegradación del ácido linolénico.

En cuanto al aroma asociado a productos comestibles, éste es uno de los factores más importantes en la aceptación de un producto por el consumidor. El aroma de un alimento es usualmente una mezcla muy compleja de compuestos volátiles con diferentes características sensoriales. Los compuestos volátiles con un umbral de detección bajo son más potentes y por lo

tanto son considerados como los responsables directos del aroma típico de un alimento.

Los compuestos volátiles emitidos o extraídos de plantas son una fuente importante de metabolitos secundarios con una amplia gama de propiedades biológicas con aplicaciones industriales y ecológicas, tales como aromas, alomonas, caíromonas, fungicidas, plaguicidas y bactericidas. La principal característica asociada a estos compuestos es que tienen presiones de vapor altas, lo que les permite difundirse con facilidad en el aire.

Por otra parte, el espectro de compuestos orgánicos volátiles emitidos por diferentes plantas depende no sólo de factores genéticos, sino también químicos y ambientales. La biodegradación de ácidos grasos insaturados da origen a un amplio espectro de compuestos orgánicos volátiles. En muchos casos la formación particular de algún compuesto volátil puede estar asociada a la acción de una o más enzimas (figura 1). La degradación de los ácidos grasos puede estar supeditada al estado en que se encuentre la planta, ya sea que haya sido víctima de un ataque de patógenos o hervíboros, que esté bajo estrés biótico o abiótico, o bien que haya sufrido algún daño físico. En cualquiera de estos casos, la generación de compuestos volátiles va a modificar la atmósfera circundante y puede inducir el ataque de predadores o, quizás, provocar la atracción de algunos insectos benéficos para la planta.

La investigación de COV puede ser enfocada principalmente de tres maneras diferentes dependiendo del tipo de información que se desee obtener (figura 2):

- (1) Volátiles vivos: mezcla de compuestos volátiles (esencia) emitidos por la planta intacta, ya sea que provengan de las hojas, tallos y frutos mientras éstos sigan siendo parte de la planta.
- (2) Volátiles no vivos: mezcla de compuestos volátiles extraídos de material cosechado, ya sean hojas, tallos o frutos.
- (3) Volátiles in vitro: extracción de compuestos volátiles a partir de callo o suspensiones celulares.

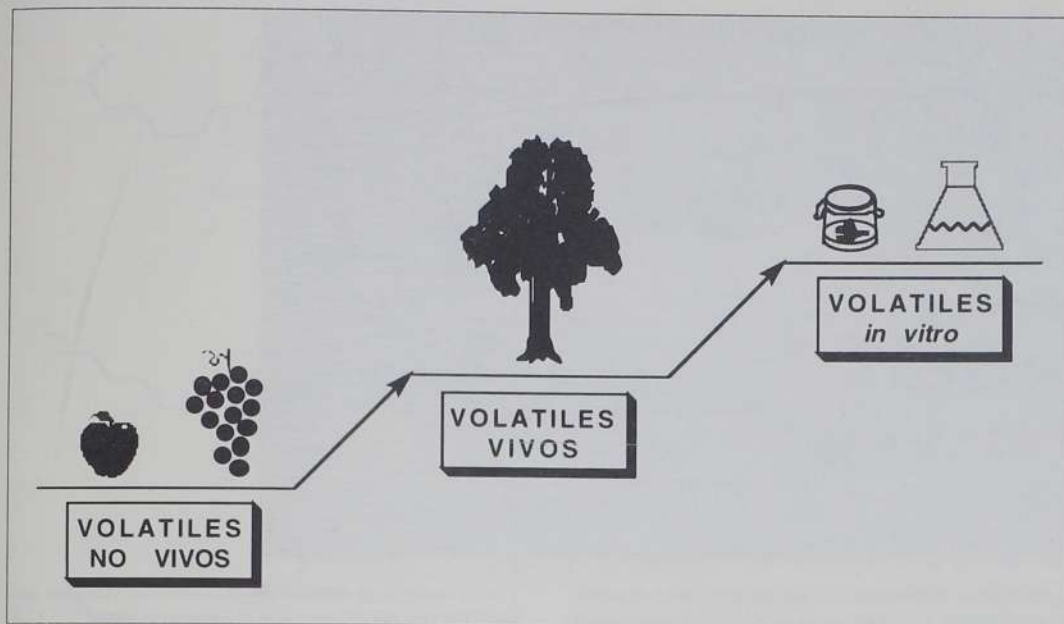


Figura 2. Evolución del estudio de aromas.

Es esencial para tener una determinación exitosa de compuestos volátiles emplear métodos físicos como la extracción, que puede ser de tipo *head-space* (fase vapor) estática o dinámica, extracción-distilación simultánea o destilación al vacío. El método se selecciona en base al tipo de información que se desee obtener. Por ejemplo, volátiles vivos o no vivos, volátiles cocinados o frescos. Además del método de extracción, se deben considerar otros factores como el tamaño de la muestra, el tiempo involucrado, el flujo de purga, las condiciones aeróbicas o anaeróbicas (nitrógeno o aire) y el tipo de adsorbente (tenax, carbón activado o sílica gel).

La caracterización estructural de COV puede ser determinada por medio de técnicas analíticas sofisticadas como la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y la cromatografía de gases acoplada a infrarrojo. Sin embargo, una limitante en este tipo de investigación es la correlación entre la información analítica y la sensorial (métodos biológicos).

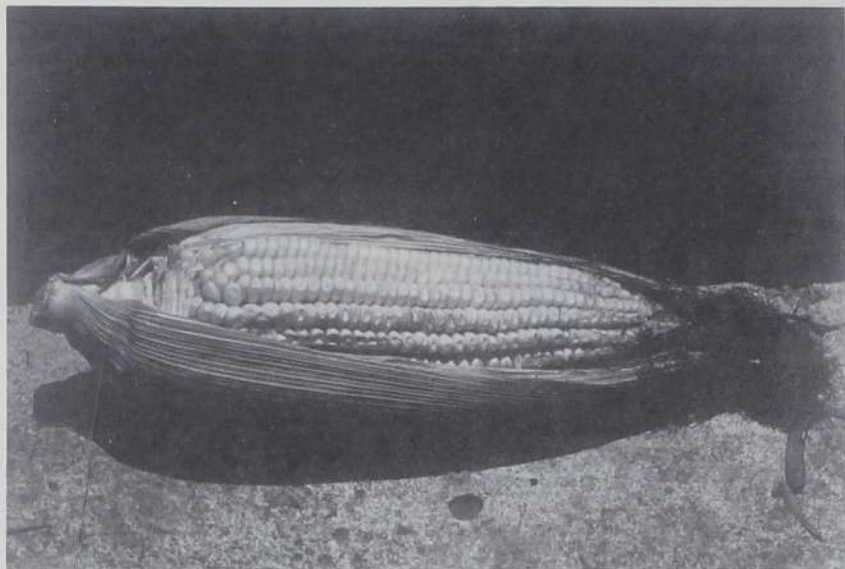
La técnica analítica elegida puede ser determinante, siendo la más adecuada la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, seguida por espec-

troscopía infrarroja y resonancia magnética nuclear. Resulta crítico también el uso de normas definidas para cuantificar cada uno de los componentes presentes en un extracto.

Todo radica en el olor. La capacidad de detectar y aislar olores específicos es un trabajo laborioso y complejo. Sin embargo, resulta posible si se cuenta con un cromatógrafo de gases acoplado a un olfatómetro. Existen principalmente tres métodos biológicos para determinar el potencial odorífero de los alimentos:

(1) *AEDA*. Este método requiere que el extracto sea sometido a una serie de diluciones, de ahí su nombre, análisis de diluciones del extracto aromático (*AEDA*, por sus siglas en inglés). Estas diluciones permiten estimar cuantitativamente el potencial odorífero de los componentes presentes en el extracto. Los compuestos detectados a mayores diluciones son los que presentan un umbral de detección menor, y por lo tanto los más importantes en el extracto.

(2) *Charm analysis*. A este método se le dio el nombre de *charm* debido a que permite detectar olores



agradables o atraentes. Es un bioensayo muy semejante al AEDA. La única diferencia es que éste tiene la capacidad de medir la intensidad del olor durante el tiempo que tarde en eluir el componente.

(3) *Aromscanner*. Es un sistema que a través del uso de 32 sensores tiene la capacidad de emular las funciones de la nariz humana para detectar y analizar compuestos volátiles en niveles de ppb. Este equipo es muy valioso en el control de calidad y desarrollo de nuevos productos, principalmente en el área de alimentos y en farmacología.

Por otra parte, la determinación de la autenticidad de un producto natural es un procedimiento muy complejo que requiere de un gran número de técnicas analíticas, ya que no existe una sola medición que pueda dar una garantía total de autenticidad. Por ello, es necesario hacer una prueba de componentes múltiples para determinar si se trata de un producto natural o artificial.

Verificar la autenticidad de un producto se ha hecho más difícil, debido a la sofisticación que existe hoy en día en la adulteración de productos naturales. Entre las determinaciones utilizadas actualmente se encuentra el análisis de isótopos (carbono e hidrógeno) por espectrometría de masas acoplado a cromatografía de gases y combustión. Además, con esta técnica se

puede realizar el estudio de compuestos volátiles generados por las diferentes rutas biosintéticas (C-3, C-4 o CAM) en base a las diferencias en el carbón radioactivo presente.

En la actualidad, en el Laboratorio de Química de Productos Naturales de la Unidad Irapuato se están estandarizando las técnicas y metodologías más importantes para la captura, extracción y caracterización de compuestos volátiles, así como para la caracterización estructural y biológica por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas y a un olfatómetro. Además, se realizan bioensayos para determinar el potencial biológico de mezclas de volátiles vivos y no vivos de especias. Entre los materiales investigados hasta el momento en nuestro laboratorio se encuentran extractos de fresa, mango, huitlacoche, flor de calabaza, epazote, perejil y cilantro, ya sean compuestos orgánicos volátiles vivos, no vivos o *in vitro*.

Metabolitos secundarios

Otra de las áreas de investigación de la Unidad Irapuato en el estudio de los compuestos naturales, está asociada a los productos del metabolismo secundario de las plantas superiores. La definición más generalizada de metabolito secundario es la de aquel compuesto de distribución restringida a una especie o

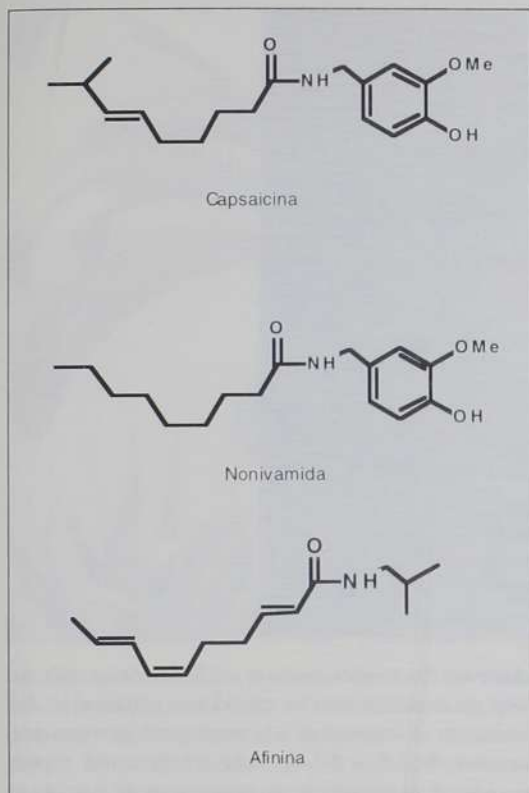


Figura 3. Alcamidas olefinicas.

familia que no tiene una función en el metabolismo intermediario de la célula. Recientemente, a este tipo de moléculas se les han atribuido funciones ecológicas específicas, esto es, funciones de relación con otros organismos. Desde luego, estas definiciones requieren de un estudio amplio de los diferentes organismos. Por ejemplo, cuando se descubrieron algunos compuestos que se consideraron restringidos a una especie, como en el caso del escualeno o el ácido shiquímico, después se confirmó que son moléculas clave en el metabolismo intermediario y de distribución ubicua.

En general, el metabolismo secundario frecuentemente se manifiesta en un órgano específico, como el aroma de una flor o el sabor de un fruto. Existen múltiples variaciones, como en el caso de la nicotina que se sintetiza en raíces y se acumula en el tejido de las hojas que es tolerante a este alcaloide. La síntesis de estos

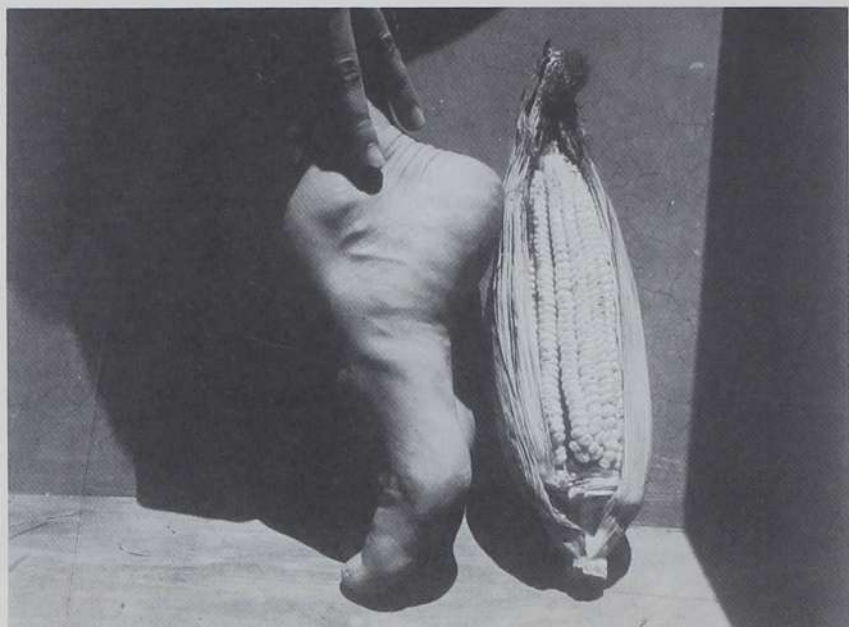
compuestos puede estar limitada a una especie de plantas, como en el caso de la colchicina restringida a *Colchicum autumnale* L., o bien tener una distribución más amplia en un grupo o familia de plantas, como el caso de las alcamidas en las Compuestas, o puede encontrarse ampliamente distribuida con un orden aún no reconocido, como en el caso de los monoterpenos, el limoneno o el eugenol que están presentes en varias familias y que no tienen una relación taxonómica aparente.

Las alcamidas olefinicas (figura 3) se presentan en dos grupos importantes de plantas: en la familia de las Compuestas y en el género de *Capsicum*. La síntesis de estas alcamidas se lleva a cabo con frecuencia en un tejido específico. En este caso, las alcamidas de *Capsicum* se sintetizan exclusivamente en la estructura denominada placenta, a la que se encuentran unidas las semillas, esto es, en lo que popularmente se denomina las venas del fruto. La principal alcamida en este caso es la capsaicina, cuya estructura es la de una benzilamina sustituida, unida a una cadena ácida Δ^6 E-monoen-isodecanoico. Los precursores inmediatos de la capsaicina son la vainillilamida y el ácido isocaproico. Este último se origina probablemente en la ruta de síntesis de ácidos grasos con isobutilil CoA como iniciador.

La capsaicina, además de su tradicional importancia como saborizante, recientemente ha recibido atención por otras propiedades biológicas. Esto ha resultado en la aparición de varios productos farmacéuticos de aplicación tópica que no requieren receta para su compra y que contienen capsaicina u oleoresina de chile. Este producto se utiliza farmacológicamente para reducir el nivel del dolor.

En los frutos del género *Capsicum*, la capsaicina es el componente mayoritario. La dihidrocapsaicina y otros componentes minoritarios constituyen un grupo de compuestos denominado capsaicinoides, donde todos ellos comparten la misma estructura en la parte amida y varían ligeramente en la estructura de la cadena ácida. La nonivamida comprende una cadena saturada lineal (C:9) de fácil síntesis, por lo que se ha denominado capsaicina sintética aun cuando como ya se mencionó, existe en forma natural en los frutos del género *Capsicum*.

La nonivamida sintética es el principal adulterante



cuando es utilizado como especie y en la industria farmacológica. Este compuesto no sólo es tan picante como la capsaicina, sino que sus características organolépticas y químicas prácticamente no se pueden distinguir de las de la capsaicina. Recientemente se logró aislar la nonivamina partir de la oleoresina de *Capsicum* con el uso de HPLC en fase reversa argentada. Es un componente minoritario de la oleoresina de chile y se encuentra en una concentración menor al 1% entre los capsaicinoides.

La nonivamida sintética se ha utilizado en forma importante en la preparación de gases lacrimógenos para uso personal. Otras aplicaciones de compuestos sintéticos de la capsaicina todavía están en proceso de desarrollo. El uso de este compuesto sintético aún no ha sido legalizado en las industrias de los saborizantes y en la farmacológica. Hasta ahora, en el vecino país del norte, la capsaicina es el único constituyente químico de *Capsicum* reconocido por la FDA para uso humano.

La capsaicina se usa farmacológicamente para reducir el dolor en geles y cremas de aplicación tópica, además de los usos más tradicionales como el de producir una sensación refrescante en pastas de dientes y enjuagues bucales. En el comercio, las muestras que se

observan con niveles mayores a 3% de nonivamida del total de capsaicinoides se consideran adulteradas. Actualmente se encuentran a la venta productos con porcentajes de 1.5 a 50 de nonivamida como capsaicinoides. En presentaciones comerciales de parches se ha observado que 25% contienen sólo nonivamida sin capsaicina.

La demanda del sabor picante en nuestro país ha hecho que se importen extractos crudos de chile, oleoresina, para elevar la pungencia de salsas picantes comerciales y se mencionan también casos de tratamiento de frutos con oleoresina para realzar su sabor.

Otro grupo importante de acilalcamidas tiene una distribución taxonómica más amplia. Son típicas de la familia de las Compuestas, lo que les da importancia fitotaxonómica. Desde el punto de vista bioquímico, presentan un patrón biosintético interesante de estudiar. Se pueden subdividir en dos grupos importantes. El primer y más amplio subgrupo está constituido por alcámidas de cadena acilo lineal que van de C:9 a C:18, tanto con número par como impar de carbonos en esta cadena, con una o más uniones acetilénicas. La mayor parte de las especies que contienen este tipo de compuestos pertenecen a la tribu de las *Anthemideas*. El segundo subgrupo está formado por al-



camidas de cadena acilo lineal que van de C:8 a C:14, donde la mayoría son C:10 o C:12. Ambos subgrupos presentan las insaturaciones en posiciones similares: 2E, 6Z, 8E o 2E, 4Z, 8E, 10E y el sustituyente amida puede ser isobutilo, 2 metil-butilo o etil-fenilo. La biosíntesis de las cadenas acilo en este caso no requiere de un iniciador especial, como en el caso de la capsaicina, sino de acetil-CoA de la ruta normal de ácidos grasos.

Este grupo de alcanmidas de las Compuestas se asocia a tejidos específicos de la planta, principalmente a las raíces, a las cabezuelas florales y a las semillas, pero en algunas especies se distribuye en la planta completa. En la mayoría de los muchos casos la fuente principal son las raíces.

Entre las plantas utilizadas en la herbolaria tradicional de varias regiones del mundo se pueden citar varias especies de la familia de las Compuestas que sintetizan estas alcanmidas y que han encontrado un uso en la medicina indígena. No puede quedar excluida la medicina tradicional de nuestro país donde podemos encontrar algunas especies de esta familia. Entre ellas destaca el caso de una pequeña planta que se encuentra en riesgo de desaparición, nada menos que por la presencia de alcanmidas con actividad

biológica, que probablemente en otros tiempos le permitieron sobrevivir pero hoy son motivo de una demanda que puede exponerla a su extinción. Su destino en este punto no depende de ella, sino de la prudencia del hombre. Se trata de *Heliopsis longipes*.

Esta especie tiene una larga tradición en la herbolaria indígena que se puede ilustrar por su nombre de origen nahuatl: *chilcuague* o *chilmecatl* (de chili, chile y mecatl, mecate, aludiendo a las raíces filiformes y su sabor picante). Por sus propiedades insecticidas, en la década de los años 50 se llevó casi a la extinción por satisfacer la demanda de exportación al vecino país del norte. Esta especie fue la primera donde se observó la presencia de una alcanmida olefínica; sin embargo, habiendo sido clasificada erróneamente esta planta como *Erigeon affinis*, la amida fue denominada afinina. La afinina es la principal alcanmida responsable de los efectos biológicos observados en esta raíz. Entre sus principales funciones se pueden señalar la actividad anestésica local, saborizante, insecticida y bactericida.

Creyéndose extinta, esta planta fue abandonada y se buscó su sustitución por otras especies de la misma tribu *Heliantheae* (*Heliopsis scabra*, *Echinacea purpurea* y *E. angustifolia*). *Heliopsis scabra* resultó ser tóxica para humanos, pero las echinaceas son muy apre-

ciadas en el comercio de plantas medicinales, siendo la especie de mayor consumo y exportación a los E.U.A. Estas especies son endémicas en ese país y además son sujetas al cultivo agrícola. En México existe una cantidad considerable de especies de la tribu *Heliantheae* que no han sido estudiadas desde el punto de vista fitoquímico.

Afortunadamente, el chilcuague no se extinguió por la euforia de la exportación. Aunque se ha citado su distribución en forma limitada al norte del Estado de Guanajuato, en las colindancias de San Luis Potosí y Querétaro prácticamente no existe, excepto en forma cultivada en la Sierra Gorda en los municipios de Xichú y Atarjea.

Entre las actividades biológicas que se han atribuido al chilcuague están la antiviral en el tratamiento de las aftas bucales y de algunas variedades de herpes; la fungicida, en el tratamiento de pie de atleta; molusquicida y en el tratamiento de algunos parásitos intestinales. Sin embargo hay poca información científica de la actividad biológica de la planta. De entre sus componentes, sólo se ha reportado la afinina. No obstante, existe una familia de compuestos derivada de esta ruta metabólica en raíces que permite proceder a un estudio a nivel molecular.

El trabajo en nuestro laboratorio se ha orientado a la investigación del metabolismo secundario de raíces *in vitro*. En el estudio de la tribu *Heliantheae* se han ob-

tenido líneas de raíces normales y transformadas de *Heliopsis longipes* y de *Acmella* (*Spilanthus*) *oppositifolia* partiendo de plántulas infectadas con *Agrobacterium rhizogenes* (9402, PeSC4). En ensayos preliminares de laboratorio, hemos observado una importante acción inhibitoria de las alcalmidas del chilcuague al desarrollo *in vitro* de *Escherichia coli* y algunos hongos fitopatógenos como *Sclerotium cepivorum*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum*. Esto no pasaría de ser un dato de inhibición generalizada, pero los resultados de laboratorio obtenidos recientemente muestran una maquinaria de acción específica que está arrojando nueva luz sobre el mecanismo de toxicidad en el metabolismo intermediario. Por último, es interesante mencionar que existen unas cuantas especies que contienen el tipo de alcalmidas de las Compuestas, que no están relacionadas con ellas, pero como tienen un sabor picante el hombre las ha utilizado como especias. Este es el caso de la pimienta negra.



VII ICFA SCHOOL ON INSTRUMENTATION IN ELEMENTARY PARTICLE PHYSICS

León, Guanajuato, México

July 7-19, 1997

Organized by

ICFA Panel on Instrumentation Innovation and Development

Division of Particles and Fields (Mexican Physical Society), University of Guanajuato at León and CINVESTAV

International Organizing Committee

- A. Cattai, Switzerland
- B. Dolgoshein, Rusia
- T. Ekelöf, Sweden
- I. A. Golutvin, Rusia
- A. Gurtu, India
- G. Herrera, México
- Ma Ji-Mao, China
- T. Kondo, Japan
- S. Majewski, USA
- D. R. Nygren, USA
- H. Okuno, Japan
- A. Savoy-Navarro, France
- M. Sheaff, México/USA
- V. Sidorov, Rusia
- J. Va'vra, USA
- A. P. Vorobiev, Rusia
- H. Walenta, Germany

Local Organizing Committee

- A. Becerril Vilchis, ININ
- H. Castilla Valdez, CINVESTAV
- J. Félix Valdez, IF-UG (co-chair)
- A. Fernández, FCFM BUAP
- G. Herrera, CINVESTAV (chair)
- A. Menchaca, IFUNAM
- H. Méndez, CINVESTAV
- A. Morelos, IF-UASLP
- M. Sosa, IFUG

School Programme

Lecture Courses

Physics of Particle Detection

- C. Grupen, Univ. Siegen

Gaseous Detectors

- J. Va'vra, SLAC

Particle Identification

- T. Ekelöf, Univ. Uppsala

Calorimetry

- H. Marsisker, SLAC

Silicon Detectors

- P. Weilhammer, CERN

High Rate Data Acquisition

- P. S. Cooper, Fermilab

Laboratory Courses

Multiwire Proportional Chambers

- G. Moreno and M. Sosa, Guanajuato Univ.

Muon Lifetime Measurement

- L. M. Villaseñor, Michoacán Univ.

Silicon Detectors and Signal Processing

- P. Weilhammer, CERN and P. Giubellino, U. Torino

Microstrip Gas Chambers

- P. Bellazzini, INFN-Pisa

Scintillating Fibres and Advanced Photo Detectors

- M. Atac, Fermilab/UCLA

Analog and Digital Circuits

- G. Hall, Imp. College (*)

Data Acquisition

- M. Sheaff, CINVESTAV and M. Johnson, Fermilab

X-Ray Imaging

- Y. Zanevsky, JINR

PPAC Multi Strip Detectors

- A. Martínez and R. Alfaro, IFUNAM

Review Talks

Heavy-Ion Experiments

- A. Sandoval, GSI Darmstadt (*)

Perspectives in High Energy Physics

- A. Zepeda, CINVESTAV

Medical Applications; Radiology and Nuclear Medicine

- L. Shekhtman, Budker INP

New Ideas in Detector Technology

- A. Breskin, Weizmann Inst. (*)

Dark Matter Detector

- D. McCammon, Univ. Wisconsin

Photodetection

- K. Arisaka, UCLA

VLPC's for Tracking, Medical Imaging and Astronomy

- M. Atac, Fermilab/UCLA

Airshower Detectors

- C. Escobar, UNICAMP/USP

Neutrino Detectors

- K. Nakamura, KEK

(*) To be confirmed

Further Information: Gerardo Herrera-Julian Félix Valdez

Fax: (51) 7 47 70 98, E-mail: icfa@fis.cinvestav.mx

<http://www.fcm.buap.mx/~marciano/ICFA/Page.html>



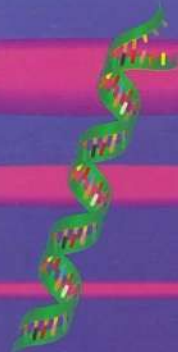


MAESTRIA Y DOCTORADO EN

BIOTECNOLOGIA DE PLANTAS

**Opciones: Biotecnología y Bioquímica
Ingeniería Genética**

*El programa de posgrado incluye la Maestría,
el Doctorado después de una Licenciatura y el
Doctorado después de la Maestría.*



**Exámen de
admisión:** Última semana de enero y julio

**Iniciación de
cursos:** Primera semana de marzo y septiembre
(La Maestría inicia en Septiembre únicamente)

Para mayores informes dirigirse a:

Coordinación Académica
Centro de Investigación y de Estudios
Avanzados del IPN (CINVESTAV) Unidad Irapuato
Km. 9.6 Libramiento norte carretera Irapuato-León
Apdo. Postal 629; 36500 Irapuato, Gto. México
Tel: (462) 516-00 Fax: (462) 458-46

Unidad Irapuato