

TRES DÉCADAS DE TRANSGÉNICOS

Director: Francisco García Olmedo

AVANCES EN EL CONOCIMIENTO
DE LAS PLANTAS
(Conferencia III)

Francisco García Olmedo
Real Academia de Ingeniería



Introducción

La transgénesis y la genómica han sido ante todo poderosas herramientas para el progreso en el conocimiento del mundo vegetal y su desarrollo se ha traducido en una verdadera revolución científica, tanto en el ritmo de generación de nueva información como en el modo de interpretarla. En las últimas décadas hemos aprendido más sobre las plantas que en todo el tiempo precedente. Si se comparan los excelentes libros actuales sobre Biología Vegetal con los de hace treinta años podemos tener la impresión de que estamos ante dos disciplinas diferentes. Como se sabe, la genética nació dentro del seno de la ciencia vegetal, la química orgánica se ha ocupado durante casi dos siglos de establecer la estructura de los compuestos constituyentes de las plantas, los productos naturales, la bioquímica y la fisiología se han enfocado a desvelar el metabolismo y el funcionamiento macroscópico de la planta, la taxonomía ha tratado de poner orden en el mundo vegetal con una perspectiva evolucionista. Con la vigorosa irrupción de la biología molecular en las indagaciones sobre las plantas, todos estos veneros han confluído y se han integrado en un único río bajo la denominación de Biología Vegetal. En esta lección trataremos de glosar algunos de los avances más señeros en este campo, dando una vuelta de 360 grados con nuestro periscopio. Esta glosa será necesariamente sucinta e incompleta, aunque aspira a transmitir la efervescencia de todo un campo científico. En la cuarta y última lección de este ciclo, nos referiremos a las aplicaciones tecnológicas que se han derivado de estos avances científicos. Estamos ante una situación en la que la Tecnología se ha derivado directamente de la Ciencia, algo que no es ni mucho menos la primera vez que ocurre. Lo que tal vez tenga de singular esta revolución es que buena parte de las innovaciones han surgido al mismo tiempo y en los mismos laboratorios que los conocimientos básicos que las sustentan.

Indagación del pasado

La disponibilidad de una cantidad ingente de información sobre las secuencias de genes y genomas de las más variadas especies vegetales terrestres ha permitido someter a prueba y, en su caso, revisar las hipótesis que sobre su

evolución se habían venido proponiendo a lo largo de los años. El proceso fotosintético, característico de las plantas, surgió hace unos 3.800 millones de años para alcanzar gran relevancia hace 2.200 millones de años. Este proceso fue protagonizado por las cianobacterias hasta formar una atmósfera rica en oxígeno como la que sustenta la biosfera actual. Las células eucarióticas fotosintéticas que forman las plantas superiores se formaron tras dos pasos de endosimbiosis que las dotaron de los órganos subcelulares que gestionan sus procesos energéticos, las mitocondrias y los plástidos. Las plantas verdes son monofiléticas. Las primeras plantas superiores surgieron evolutivamente hace unos 475 millones de años, en el ordovícico medio, y se diversificaron a lo largo de los periodos silúrico y devónico. Al final de este último periodo evolucionan las plantas con semillas, que se diversifican en el pérmico, hace entre 290 y 250 millones de años.

Las plantas actuales pueden integrarse en cinco grupos: cuatro de gimnospermas, Cicadales, Ginkgoales, Coniferales y Gnetales y formado por las angiospermas. No hay un consenso respecto a las relaciones evolutivas entre estos grupos, pero se manejan dos posibles esquemas que implican orígenes radicalmente distintos para las angiospermas. El primer esquema, que se basa en comparaciones morfológicas, situaría a las Gnetales como las parientes más próximas de las angiospermas, mientras que el segundo esquema, sustentado por los datos de secuencia y con grandes probabilidades de ser aceptado, situaría el linaje de las angiospermas como el más antiguo y el de la Gnetales como más próximas a las coníferas que a las angiospermas.

Las angiospermas o plantas con flores aparecen en el cretácico, hace aproximadamente unos 135 millones de años. Se originaron en los trópicos y luego se extendieron por latitudes más altas. Las angiospermas se dividen en dicotiledóneas y monocotiledóneas. Estas últimas constituyen un grupo monofilético, dentro del cual surgieron las gramíneas (Poaceae) hace unos 60 millones de años, por lo que su diversificación es un fenómeno relativamente reciente. Las especies domesticadas de este grupo sirvieron de base al nacimiento de las grandes civilizaciones humanas.

La domesticación

La domesticación, el proceso de selección artificial mediante el cual ciertas especies vegetales se pusieron bajo dominio humano, ha sido en gran medida clarificado a nivel molecular durante las últimas décadas. Como resultado de dicho proceso las especies en cuestión fueron perdiendo una serie de características de las que dependía su propagación en vida libre, es decir, requeridas para completar sus ciclos vitales como especies 'naturales', para convertirse en especies 'artificiales' que requieren del concurso humano para su supervivencia y que poseen una serie de caracteres agronómicos apropiados, útiles para el agricultor pero inútiles o incluso perjudiciales para la autonomía de la propia planta en estado silvestre. La comparación detallada de los genomas de las especies cultivadas con los de las especies silvestres de las que se derivaron está permitiendo establecer las bases moleculares de la domesticación. Lo primero que puede concluirse de este tipo de estudios es que las operaciones genéticas que se hicieron en el neolítico para la domesticación fueron esencialmente las mismas en distintos lugares del planeta y en las distintas especies. Es decir, cuando se examina la domesticación del arroz en el Oriente Lejano, del trigo en el Oriente Próximo o del maíz en América puede constatarse de que estamos ante el mismo invento realizado de forma independiente en distintas partes del mundo. Los cambios genéticos introducidos durante la domesticación fueron numerosos, pero sólo un número reducido de ellos fueron esenciales para el proceso. Así por ejemplo, entre el teosinte silvestre y el maíz cultivado pueden observarse cambios alélicos esenciales (variantes) en cinco genes. Uno solo de ellos, el *teosinte branched*, es responsable de las diferencias arquitectónicas y sexuales entre las dos especies, unas diferencias tan marcadas que un observador superficial no las consideraría como parientes próximos, que es lo que son.

Del mismo modo que en el caso del maíz, se ha averiguado que la coliflor surgió de una berza por la mutación de un gen regulador que controla la identidad del meristemo o que el tamaño del fruto del tomate, desde el pequeño correspondiente al silvestre al grande característico del cultivado, fue un paso temprano en la domesticación del mismo. En suma, los métodos moleculares actuales corroboran plenamente que la domesticación fue un proceso *contra*

natura en el que se dieron cambios tales como el del raquis tenaz frente al frágil, el porte erecto frente al rastrero, y semillas, frutos y tubérculos más grandes, así como el 'desarme' de los tejidos vegetales de compuestos tóxicos o adversos para la especie humana. Las plantas cultivadas dependen de nosotros para completar sus ciclos en la misma medida que nosotros dependemos de ellas para nuestra supervivencia.

El ciclo celular

Entre los procesos básicos intensamente investigados con ayuda de las modernas herramientas moleculares está aquél por el cual una célula da lugar a dos idénticas, el ciclo celular, el cual implica la replicación idéntica del ADN celular y su reparto equitativo entre las dos células hijas. Se ha podido comprobar que este proceso no es distinto en las plantas con respecto a los otros eucariotas. La secuencia de acontecimientos del ciclo está estrechamente regulada: en la fase **G1** la célula se prepara para replicar el ADN; la replicación propiamente dicha tiene lugar en la fase **S**; luego sigue la fase **G2**, durante la cual se reparte el material replicado; la ruptura de la envuelta nuclear marca el principio de la fase **M** (mitosis) que separa los cromosomas repartidos a extremos opuestos de la célula mediante el huso; se forma entonces una placa celular y eventualmente una pared divisoria que da lugar a las dos células hijas. En cada una de estas etapas están involucrados complejos mecanismos regulatorios y decenas de elementos funcionales cuya estructura y función hubieran sido imposibles de conocer sin el concurso de la transgénesis, la genómica y toda una serie de herramientas que se han puesto a punto en el curso de los últimos años.

La pared celular

Una característica exclusiva y diferencial de las células vegetales con respecto a las animales es la de poseer una compleja pared celular, además de la membrana celular común a ambos tipos de células. La pared celular, que representa una alta proporción del peso seco del material vegetal, es un elemento crucial en relación con las propiedades mecánicas de la planta, con su desarrollo biológico y con las interacciones de la planta con agentes bióticos y abióticos del medio. La pared celular primaria consiste de microfibrillas de

celulosa inmersas en una matriz de pectinas y glicanos entrecruzados. La matriz se deposita en la placa celular y, cuando ésta ha alcanzado los lados de la célula, se inicia la síntesis y deposición de las microfibrillas de celulosa. El producto final es una red tridimensional de celulosa y glicanos inmersa en una especie de gel formado por las pectinas. La pared no es una estructura estática sino que debe expansionarse conforme la célula debe aumentar de tamaño. El proceso se hace posible por la introducción continua de polisacáridos y enzimas que rompen y sintetizan enlaces en los puntos donde se introducen los nuevos materiales. La placa celular no es una barrera continua entre las dos células hijas sino que deja lugar para la formación de canales entre los citoplasmas de éstas que quedan revestidos de forma continua por sus membranas celulares; se trata de los *plasmodesmata*.

Una vez que la célula alcanza su tamaño final, puede iniciar la síntesis y deposición de la pared celular secundaria. La formación de ésta es crucial en el desarrollo de los distintos tipos celulares en las plantas superiores. La naturaleza de esta pared secundaria es muy distinta en los distintos tipos y es en buena parte responsable de su diferenciación. Es a menudo gruesa y estructurada en varias capas: pueden contener una gran variedad de polímeros que pueden servir como moléculas de almacenamiento o como impermeabilizantes, así como ser responsables de la consistencia mecánica y de la durabilidad de la estructura. De particular importancia es la presencia del polímero lignina que entrecruza la estructura. En las células epidérmicas, sobre la pared se deposita la cutícula, que es la cubierta externa de las partes aéreas.

Metabolismo

En la célula vegetal, como en la animal, unos compuestos se transforman en otros a través de reacciones mediadas por enzimas. Al conjunto de esas reacciones llamamos metabolismo. Las enzimas responsables del metabolismo están codificadas por genes, de modo que el conocimiento del genoma completo implica en principio el conocimiento del repertorio completo de las enzimas que pueden funcionar en una célula. Ya hemos indicado que cada tipo de célula en un momento dado expresa un subconjunto del repertorio génico

total y lo hace de un modo regulado y coordinado que determina qué cantidad de cada enzima se fabrica en cada momento. La transgénesis permite investigar la función de cada enzima viendo, por ejemplo, qué consecuencias tiene para el metabolismo cuando bloqueamos su expresión o cuando la aumentamos, es decir, cuando la 'sobre-expresamos'. Además, al poder alterar a voluntad, nucleótido a nucleótido, la parte informática del gen, a la que hemos llamado 'promotor', podemos averiguar de qué secuencias concretas dependen las propiedades regulatorias del gen: porque unos genes responden a la luz, otros al frío y otros a la sequía. Toda esta capacidad técnica ha permitido un conocimiento del metabolismo, tanto de sus eslabones o etapas como de su regulación, que era impensable hace tan sólo un par de décadas.

Las células vegetales se distinguen de las animales no sólo porque poseen una pared celular sino porque son capaces de convertir energía lumínica en energía química mediante el proceso de la fotosíntesis. Este proceso energético, que tiene lugar en el cloroplasto, hace posible la asimilación neta de carbónico atmosférico a través del ciclo de Calvin. El aparato fotosintético puede revertir parcialmente su función principal en un proceso denominado foto-respiración que implica la captación de oxígeno y la emisión de carbónico. La foto-respiración tiene obviamente consecuencias relevantes en la economía del carbono y del nitrógeno en la hoja.

El resultado neto de la fotosíntesis es la producción de sacarosa y la acumulación de almidón en los plastidios. La sacarosa se transporta por el floema de las partes verdes de la planta a las partes no fotosintéticas y la forma en que se descarga en destino depende del órgano vegetal que la reciba. El suministro de sacarosa (de 'asimilado') desde la hoja a los órganos que la demandan está estrechamente coordinado. En destino, la sacarosa es utilizada para generar energía y precursores por las rutas catabólicas clásicas.

Otro aspecto importante del metabolismo vegetal es la asimilación de nitrógeno. El nitrato es reducido por la nitrato reductasa que es una enzima altamente regulada. La planta posee varios transportadores de nitrato regulados por diversas señales y la asimilación del nitrógeno está acoplada a la demanda, a su disponibilidad y a la de precursores biosintéticos. El nitrógeno

acaba almacenándose en forma de aminoácidos y proteínas específicas de reserva.

La asimilación de otros nutrientes minerales está siendo también esclarecida en sus mecanismos íntimos. Especialmente importante es la del fósforo, en forma de fosfato, que puede suponer un factor limitante en el crecimiento vegetal. El azufre lo obtiene la planta en forma de sulfato, para luego ser reducido a sulfuro y asimilado en forma del aminoácido cisteína. El movimiento de nutrientes minerales en la planta tiene lugar tanto a través del xilema como del floema. El agua se mueve de las raíces a las hojas mediante un mecanismo de naturaleza hidráulica y de las hojas se pierde a la atmósfera por transpiración.

Desarrollo

Del cigoto a la planta madura reproductivamente tiene lugar un complejo proceso de desarrollo que está siendo elucidado gracias a que el conjunto de las ómicas nos brinda la posibilidad de desentrañar las interacciones entre los distintos genes reguladores (factores de transcripción) y entre los genes reguladores y los que éstos regulan. Durante el desarrollo de un organismo multicelular, diferentes células deben adoptar distintas funciones o roles dentro del organismo en crecimiento, de modo que el crecimiento y la división celular deben coordinarse para generar los distintos órganos y eventualmente una planta completa. Las células se comunican e interactúan entre ellas para forjar su destino final, y el órgano en su conjunto debe detectar y responder a su entorno. Los orígenes de la multi-celularidad en las plantas y en los animales son distintos, y muchos de los mecanismos involucrados en el desarrollo son específicos de las plantas, aunque muchos de los procesos sean comunes a ambos tipos de organismos.

En contraste con el embrión animal, no todas las partes que compondrán la planta desarrollada son detectables en el embrión maduro. La forma de la planta va cambiando durante la germinación de la semilla y los nuevos órganos van formándose en el ápice en crecimiento. Al final de la embriogénesis vegetal se forman dos tipos de células, dos tipos de 'meristemos': el que dará lugar a las partes aéreas y el que originará el sistema radicular. El crecimiento de tallos

y raíces tiene lugar por un proceso reiterativo de formación de nuevos órganos a partir de los meristemas, es decir, estamos ante un sistema modular. Así por ejemplo, un módulo de la parte aérea se compone de una hoja, un meristemo lateral y un entrenudo, y el desarrollo del tallo resulta de la adición sucesiva de este tipo de módulo. Estos módulos se generan bajo un programa genético del que cada vez sabemos más, lo que no es incompatible con que las circunstancias ambientales tengan un profundo impacto en el curso del desarrollo. Así por ejemplo, el desarrollo del sistema radicular dependerá en gran medida de la estructura y naturaleza del suelo, así como de las condiciones de disponibilidad de nutrientes y de humedad prevalentes.

El ambiente influye también en otro aspecto crucial cual es la conmutación del programa genético del meristemo para producir un tipo diferente de módulo, como puede ser el caso del viraje que supone dejar de producir hojas para generar botones florales.

Otra característica distintiva del desarrollo vegetal es la capacidad que tienen de generar el organismo completo a partir de sus partes separadas. En otras palabras, el destino celular puede ser redirigido en las plantas con mucha mayor facilidad que en los animales, en los que la separación de las células germinales, responsables de perpetuar el organismo, ocurre muy pronto en el proceso de desarrollo. En los animales, las células germinales forman gametos haploides a través de la meiosis, mientras que en las plantas, la meiosis da lugar a los gametofitos que generan los gametos, de modo que en el ciclo vital de las plantas se alterna una fase diploide con otra haploide. La existencia temporal de la planta como organismo haploide tiene consecuencias genéticas importantes, la principal de las cuales es el hecho de que las mutaciones recesivas quedan expuestas durante dicha fase.

Percepción de señales ambientales

Las plantas están sujetas a una vida inmóvil que no permite la huida ante los retos ambientales, por lo que deben lidiar con ellos *in situ*, para lo que han desarrollado una serie de estrategias a lo largo de la evolución. La puesta en marcha de los mecanismos de respuesta requiere un sistema sofisticado de

percepción que le permita descifrar la situación ambiental concreta a la que deben adaptarse. Glosemos algunos ejemplos:

La maduración de las semillas a menudo implica su desecación, situación en la que permanecerán hasta que se re-hidraten como paso previo a la germinación. Este paso es necesario pero no suficiente, ya que puede darse sin que siga de modo inmediato el proceso germinativo. Esto se debe al fenómeno de la 'dormancia', un sutil mecanismo cuyo significado adaptativo es el de evitar la germinación simultánea de un conjunto de semillas en condiciones que no aseguran que se complete el ciclo biológico. La dormancia se rompe en respuesta a distintos estímulos ambientales. En ciertas semillas es la luz la que dispara la germinación, otras requieren una determinada duración del día, y todavía en otras se necesita una exposición intermitente a la luz. Generalmente, en las plantas cuya germinación depende de la luz, la dormancia viene impuesta por las cubiertas de la semilla, de modo que si se eliminan éstas, los embriones germinan al embeber agua sin mostrar dormancia.

En general, las plantas son sensibles a la cantidad, calidad (longitud de onda) y dirección de la luz, y muchos aspectos del crecimiento y el desarrollo de la planta están regidos por luz, lo que implica que para responder a ella deben disponer de un amplio abanico de receptores. La moderna genómica ha desvelado la enorme complejidad del sistema de recepción de la luz por la planta.

El desarrollo vegetal transcurre por vías distintas en la luz y en la oscuridad. Distintos foto-receptores detectan luces de diferentes longitudes de onda. Así por ejemplo, los fitocromos pasan de inactivos a activos por efecto de la luz roja y distintas clases de fitocromos tienen funciones distintas, tales como la de evitar la sombra. Otro tipo de receptores viene representado por los criptocromos, que son receptores de luz azul que desempeñan diversas funciones, algunas de ellas solapantes. Las fototropinas son también receptores de luz azul involucrados en el fototropismo, la apertura de los estomas, que regula el intercambio gaseoso de la planta, y la migración de los cloroplastos.

El desarrollo reproductivo, la floración, también está regido en muchas plantas por la luz, más concretamente por el fotoperiodo, la duración día/noche. Sin embargo, la influencia ambiental no se restringe a los distintos juegos de la luz sino que incluye otros agentes. Así por ejemplo, el etileno, un gas con acción hormonal, rige diversos procesos importantes, tales como el desarrollo de la plántula o la maduración del fruto; y la fuerza de la gravedad actúa como estímulo externo tanto en el desarrollo del tallo como en el del sistema radicular.

Estrés abiótico

El exceso de luz, las temperaturas extremas, el déficit hídrico, la salinidad excesiva, la anaerobiosis y las moléculas reactivas de oxígeno (ambiente oxidativo) provocan distintas situaciones de estrés para la planta a las que debe responder sin moverse de su sitio. La planta dispone en primer lugar de diversos mecanismos para detectar las situaciones concretas y, una vez detectadas, pone en operación los mecanismos de adaptación apropiados. Distintos tipos de estrés están relacionados funcionalmente entre sí. Así por ejemplo, el déficit hídrico puede producirse no sólo por sequía sino también por la salinidad del suelo, por exceso de calor o por el de frío.

Las temperaturas altas, por ejemplo, inducen la producción de las llamadas proteínas del choque térmico; hay unas proteínas denominadas chaperonas que aseguran el correcto plegamiento de las demás proteínas en condiciones térmicas desfavorables. En general, distintas familias de proteínas del choque térmico desempeñan distintas funciones en la respuesta al estrés térmico en diferentes especies.

Las plantas usan el ácido abscísico, una de las hormonas vegetales, para inducir la respuesta al déficit hídrico, pero también usan otros mecanismos independientes de dicha hormona en respuesta al mismo reto. Entre otros procesos, el ácido abscísico controla el cierre de estomas para reducir las pérdidas de agua por la planta. Muchas especies vegetales adoptan una considerable adaptación metabólica a la sequía y aquellas que están adaptadas a condiciones áridas no sólo tienen adaptado el metabolismo de los azúcares sino que también muestran adaptaciones morfológicas apropiadas.

Finalmente, en las regiones desérticas, las plantas acortan su ciclo para poder completarlo en los esporádicos y breves periodos húmedos: se trata del fenómeno del 'desierto florido'.

La salinidad excesiva perturba drásticamente el equilibrio hídrico y la distribución de iones. La adaptación a este tipo de estrés depende en buena medida del secuestro interno de sales, mecanismo al que se suman otros de secreción de sales. El frío induce respuestas parecidas a las de la sequía y el mecanismo más distintivo asociado a él es la capacidad de adaptación de las especies de clima templado a resistir los daños por congelación si previamente han sido expuestas a bajas temperaturas por encima de 0°C.

El encharcamiento reduce la disponibilidad de oxígeno para las raíces, causando situaciones de hipoxia o incluso anoxia. Distintas especies difieren en su capacidad para adaptarse a estas situaciones. Así por ejemplo, un trigo no prosperaría en las condiciones de encharcamiento en que se cultiva el arroz. La situación contraria consiste en la presencia de cantidades excesivas de especies reactivas de oxígeno en el ambiente inmediato de la planta. Este sería el caso de los excesos de ozono que tan frecuentemente se detectan en nuestras ciudades. El agua oxigenada es la señal del estrés oxidativo y el metabolismo del ácido ascórbico (vitamina C) es la principal vía de respuesta a este reto.

Patógenos, plagas y parásitos vegetales

Entre las relaciones de las plantas con su entorno ocupan un lugar prominente las relativas a otros organismos vivos que pueden causarles efectos adversos, lo que se llama el estrés biótico. Nos referimos a patógenos microbianos, virus, viroides, insectos, nematodos e incluso planta parásitas y malezas o malas hierbas.

Los patógenos pueden entrar en la planta por diversas rutas y se suelen clasificar en biotrofos y necrotrofos, según la manera de interactuar con la planta. Muchos patógenos generan moléculas efectoras que influyen su relación con la planta, y algunas de estas moléculas son reconocidas por la planta e inducen en ella una respuesta de defensa, ya sea actuando

externamente o internamente. La elucidación de cómo actúan estas moléculas constituye uno de los campos más activos de la biología molecular vegetal en la actualidad.

Los mecanismos basales de defensa de la planta se ponen en marcha por patrones moleculares asociados al patógeno (PAMPs; pathogen associated molecular patterns). Existen también familias de proteínas llamadas *R*, codificadas por genes *R*, que están involucradas en el reconocimiento del patógeno y en la transducción de señales. Una característica común de estas proteínas es la de tener tramos ricos en leucina que están repetidos. Existe un considerable polimorfismo que configura la resistencia o susceptibilidad de distintos genotipos de una especie a cada raza de un patógeno dado, restringiéndose así la enfermedad en las poblaciones naturales.

Las variantes alélicas de los genes *R* han sido objeto de selección inconsciente por los agricultores a lo largo de milenios. La insensibilidad a toxinas microbianas es importante en la defensa de las plantas frente a ciertos patógenos. Las plantas también sintetizan péptidos y otros compuestos antibióticos que las hacen resistentes frente a patógenos y herbívoros. Un papel central en el mecanismo de defensa lo desempeña a menudo la muerte celular localizada, fenómeno que dispara todo un mecanismo de defensa sistémica más allá del punto de ataque. En términos prácticos, es posible 'inmunizar' la planta provocando artificialmente la muerte celular localizada.

Si causamos una herida localizada en una planta o ésta sufre la mordedura de un insecto, se desencadena una respuesta sistémica protectora que afecta a toda la planta. Los mecanismos moleculares de transducción de señales propios de esta respuesta se han dilucidado en buena parte durante los últimos años. Como parte de la interacción de un insecto masticador con una hoja se producen también compuestos volátiles que son percibidos por otros insectos e incluso, tal vez, por otras plantas.

Consideraciones finales

Lo que antecede no es sino un incompleto inventario casi telegráfico de algunas de las áreas en las que los recientes avances de la biología molecular

han cambiado radicalmente el panorama de nuestro conocimiento. Al lector que esté interesado en profundizar en el tema no cabe sino proponerle la tarea más ardua de estudiar alguno de los excelentes textos de Biología Vegetal que se están publicando actualmente, en especial los disponibles en inglés. En la redacción de esta lección ha sido de particular utilidad el titulado *Plant Biology*, un libro multiautor (A M Smith et al.) publicado por Garland Science en 2009.

