

---

# Introducción al uso de *Bacillus thuringiensis* para la producción de plantas transgénicas

*Jorge Evelio Angel D., BSc., M Sc., PhD.\**

En la actualidad, el mayor renglón productivo en el mercado mundial de biopesticidas se basa en la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). La diversidad de cepas naturales de Bt ha posibilitado la aplicación biopesticida para el control de insectos plaga. La biología molecular ha permitido comprender los mecanismos de acción a nivel molecular de expresión de genes que tienen efectos como bioplaguicidas. Cuando un insecto susceptible consume tejido fumigado con Bt, la endotoxina es digerida en el intestino del insecto y convertida en pequeñas moléculas tóxicas, las cuales se adhieren a las paredes del intestino provocando un efecto paralizante de la función intestinal, lo que causa que el insecto detenga su alimentación y en pocos días muera. A pesar de su alto nivel de toxicidad sobre los insectos, se ha encontrado que las toxinas de Bt no afectan ni a mamíferos ni a otros organismos diferentes de la plaga. El uso de Bt para el control de insectos se inició en los años 30 para el control del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*). El primer producto comercial estuvo disponible en Francia en 1938 bajo el nombre de Sporcine, el cual se extendió rápidamente a otros países.

La tecnología de ADN recombinante posibilitó la transferencia de genes de Bt con propiedades de bioinsecticidas dentro del genoma de plantas (plantas

transgénicas), las cuales desarrollaron resistencia a insectos. La actividad biológica de proteínas de Bt que tienen efecto adverso en insectos está constituida por proteínas conocidas como d-endotoxinas, las cuales poseen características muy particulares; algunas son tóxicas para insectos, poseen alto nivel de expresión, su ubicación intracelular forma una inclusión paresporal cristalina y poseen baja residualidad ambiental.

Las d-endotoxinas de Bt son codificadas por genes localizados en plásmidos contenidos dentro de la bacteria. Las secuencias que codifican para endotoxinas de cepas de Bt se han ubicado en varios grupos para facilitar su clasificación y naturaleza. Algunos de estos grupos son CryI, CryII, CryIII, CryIV y CryV; a su vez, cada una de estas categorías se ha subdividido en nuevas categorías, por ejemplo CryIA, la cual puede tener otras subcategorías CryIA(a), dependiendo de que aparezcan nuevas secuencias que codifican para endotoxinas de Bt. Las secuencias de estos genes Cry varían en rangos de similitud de la secuencia de aminoácidos, desde un alto porcentaje (por ejemplo 80% para miembros del grupo CryIA) hasta un porcentaje bajo 25% entre CryII y el grupo CryI. Los estudios de las secuencias de los genes Cry revelan que la secuencia de uno de estos genes puede tener efecto sobre un insecto o gru-

---

\* Coordinador Unidad de Diagnóstico Molecular Vegetal. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA

---

po de ellos pero no en todos los insectos. Por ejemplo, la toxina CryIII afecta ciertos coleópteros (escarabajos) y algunos lepidópteros (orugas); CryIA(a) es altamente tóxico para *Bonbyx mori* (lepidóptera) y CryIA(c) es altamente tóxico para *Heliothis virescens* (lepidóptera), pero nada tóxica para *Bonbyx mori*. La mayoría de genes para el control de insectos en plantas transgénicas se han derivado de Bt. En Estados Unidos, la primera prueba de campo de plantas transgénicas que expresaban endotoxinas de Bt se realizó en 1990, y en 1996 se sembró más de un millón de hectáreas de maíz y algodón expresando endotoxinas de esta bacteria. Sin embargo, algunos de estos cultivos han tenido que ser suplementados con insecticidas para obtener un control más efectivo.

Aunque el uso de cultivos transgénicos se ha extendiendo a varias regiones del planeta, algunos países aún no están preparados para la llegada de éstos, con el agravante de que no existe una legislación para recibir, controlar y difundir dichos cultivos. Este hecho se complica más cuando los gobiernos, investigadores, empresas comercializadoras de semillas transgénicas, organizaciones regionales, productores y consumidores desconocen los riesgos y beneficios potenciales de esta tecnología. En Norteamérica, el uso de cultivos transgénicos se ha extendido a otros cultivos como canola y maíz.

Entre las ventajas potenciales que se le atribuyen a los cultivos transgénicos transformados con genes de Bt está la reducción del uso de insecticidas; un caso típico y bien documentado es el del algodón transformado con genes de Bt, lo que se ha visto particularmente en la reducción de gastos en agroecología, protección del medio ambiente y salud pública y el ahorro de millones de dólares cada año. Un segundo beneficio es la facilidad agronómica de su implementación, sin apartarse obviamente de las medidas de bioseguridad necesarias.

En lo referente a las desventajas y amenazas de cultivos transgénicos, se encuentran aún en discusión, en lo que se refiere a aceptación y seguridad alimentaria, por ejemplo; el tema de plantas transformadas con genes Bt ha sido revisado y aprobado en los Estados Unidos, pero en Latinoamérica, Europa y Japón, aún hay escepticismo sobre el hecho de que los cultivos transgénicos no representan una amenaza para la salud. Sin embargo, el más grande temor lo representa el peligro ecológico, por la generación de nuevas malezas y la erosión de la diversidad genética debido al intercambio genético entre plantas transgénicas y plantas silvestres nativas. Estudios recientes han mostrado que los genes incorporados en un culti-

vo pueden moverse rápidamente hacia sus parientes, creando así nuevas variedades genéticas. Por ejemplo, es posible el flujo genético entre el maíz y el teocintle; esto ha provocado preocupación en México, por lo que actualmente se realizan estudios en el Centro Internacional para el Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

En los Estados Unidos ha surgido preocupación por la posibilidad del desarrollo de resistencia en poblaciones de plagas a las toxinas de Bt expresadas en plantas transgénicas. Esto conduciría no sólo a la ineficiencia de las plantas transgénicas sino a la pérdida del uso de aspersiones con Bt como biocontrolador. Estudios recientes con algunos insectos han demostrado su capacidad de superar los efectos de muchas toxinas a través de cambios evolucionarios en su constitución química. Por ejemplo, poblaciones de *Plutella xylostella* han desarrollado resistencia al gen de Bt que se ha usado para su control.

Existen además dos preocupaciones latentes en lo que respecta al tema de resistencia transgénica en plantas. La primera se refiere a que la resistencia a una plaga en particular, en un territorio determinado, no necesariamente podría ser la misma resistencia de esa plaga en otra región diferente, debido a las variantes genéticas que pueden existir en un organismo. La segunda preocupación se refiere a la propiedad intelectual, ya que muchos de los genes que poseen propiedades benéficas proceden de países en vía de desarrollo; pero debido a que los procesos tecnológicos de transformación de cultivos se realizan en países desarrollados, tanto las patentes como los beneficios económicos de estas transformaciones tecnológicas se quedan en estos últimos.

## **Pasos básicos involucrados en la producción de plantas transgénicas mediante el uso de *Agrobacterium tumefaciens* en el laboratorio**

Uno de los pasos más importantes en la producción de plantas transgénicas es la escogencia del gen o los genes que van a ser introducidos en la planta a transformar. Este paso requiere análisis y evaluación preliminar de los genes que van a ser introducidos en la planta blanco y determinar su efectividad para controlar la característica deseada. Algunas plantas resultan particularmente difíciles de trans-

formar, especialmente plantas de origen leñoso, por lo que *Nicotiana tabacum* se ha convertido en el modelo más ampliamente difundido para el estudio de genes en plantas transgénicas. Esta especie vegetal puede ser relativamente fácil de transformar mediante el uso de *A. tumefaciens* y de esta forma poder estudiar las características del gen introducido. Una vez determinado si los genes introducidos en *N. tabacum* cumplen con los requerimientos deseados, se procede a transformar la planta de interés agronómico con la característica deseada (resistencia a insectos, virus u otra característica).

Los genes identificados como benéficos para la característica deseada deben ser clonados en un vector (plásmido) para el análisis de su secuencia, y posteriormente subclonados en otro plásmido denominado vector de expresión, el cual permite expresar la proteína de interés en la planta transformada. Los vectores de expresión generalmente contienen un cassette de expresión, el cual a su vez consta de un potente promotor de expresión (en plantas el más usado es el promotor 35 S derivado del virus del mosaico del pepino, CMV), un sitio de clonaje, una secuencia de iniciación y terminación de transcripción del gen y marcadores moleculares de transformación que generalmente codifican para resistencia a antibióticos. En el caso de transformación con *Agrobacterium*, el vector debe contener las secuencias de los bordes derecho e izquierdo del T-DNA de *Agrobacterium*. Otros medios de transformación como biobalística o electroporación no requieren este último componente (T-DNA).

Cuando el gen ha sido clonado en el vector de expresión, generalmente es introducido en *A. tumefaciens* por conjugación. La presencia del gen de interés en *Agrobacterium* se confirma por PCR o análisis con enzimas de restricción y luego se procede a transformar los tejidos vegetales con la bacteria recombinante en un medio de cultivo *in vitro*. Para este propósito, se preparan, en condiciones de total asepsia, pequeños discos de tejido de la planta que se quiere transformar y se co-cultivan con *A. tumefaciens* recombinante, el cual por un proceso ampliamente estudiado transfiere e introduce al azar la secuencia correspondiente al gen(s) de interés en los cromosomas de las células vegetales.

Aproximadamente después de cinco días de la infección con *A. tumefaciens*, los cortes de tejido son transferidos a un nuevo medio de cultivo que contiene un antibiótico (por ejemplo kanamicina), dicho medio permite seleccionar aquellas plantas que han sido transformadas, debido a que el gen de resistencia al antibiótico es transferido por *A. tumefaciens* junto con el gen de interés e incorporados dentro del genoma de las células vegetales. El tejido transformado generalmente se desarrolla hasta formar plantas *in vitro* en presencia del antibiótico.

Las plantas *in vitro* resistentes al antibiótico son transportadas al invernadero donde se practica un análisis para determinar la presencia de la secuencia del gen introducido en las plantas por PCR o Southern blot, la transcripción del gen por Northern blot y la expresión del mismo por ELISA o Western blot.

Finalmente, cuando se trata de pruebas de resistencia a una plaga, se procede a elaborar las pruebas biológicas mediante un diseño experimental. Estas permitirán evaluar la efectividad de control del gen introducido en las plantas. Una vez las plantas transgénicas son evaluadas en invernadero y se ha determinado la efectividad del gen de interés introducido en las plantas, éstas deben ser evaluadas en el campo, en condiciones de estricta bioseguridad y siguiendo las normas vigentes para este propósito, antes de ser liberadas como semillas transgénicas al medio ambiente.

## Bibliografía

- GOULD, F. Y HRUSKA, A.J. 1997. *Plantas transgénicas en la agricultura mesoamericana*. 1<sup>o</sup> Edición. Honduras (Centro América). Zamora Academic Press.
- MONTOYA, R.M. Y ORDUZ. 1998. *Bacillus thuringiensis: Legado para el siglo XXI*. Revista Colombiana de Biotecnología. 1: 11-27.
- ANGEL, J.E. 1997. *Biotechnological approaches to the control of raspberry bushy dwarf disease*. Tesis de grado de doctorado. Scottish Crop Research Institute, University of Dundee, Scotland, UK.