



e-Gnosis
E-ISSN: 1665-5745
e-gnosis@cencar.udg.mx
Universidad de Guadalajara
México

Martínez T., Miguel; Cabrera P., José L.; Herrera E., Luis
Las plantas transgénicas: una visión integral
e-Gnosis, núm. 2, 2004, p. 0
Universidad de Guadalajara
Guadalajara, México

Disponible en: <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=73000202>

- Cómo citar el artículo
- Número completo
- Más información del artículo
- Página de la revista en redalyc.org

redalyc.org

Sistema de Información Científica
Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal
Proyecto académico sin fines de lucro, desarrollado bajo la iniciativa de acceso abierto

LAS PLANTAS TRANSGÉNICAS: UNA VISIÓN INTEGRAL

TRANSGENIC PLANTS: A COMPLETE VISION

Miguel Martínez T.¹, José L. Cabrera P.², Luis Herrera E.²
migueltrujilloira@yahoo.com.mx / jcabrera@ira.cinvestav.mx / lherrera@ira.cinvestav.mx

Recibido: diciembre 4, 2003 / Aceptado: enero 30, 2004 / Publicado: febrero 18, 2004

RESUMEN. Se analiza el pasado, presente y las perspectivas de las plantas transgénicas. Se discuten además las principales estrategias utilizadas para resolver problemas en la agricultura, la medicina y la industria, utilizando la tecnología de plantas transgénicas. Rasgos de tipo agronómico y farmacéuticos están siendo actualmente trabajados por ingeniería genética tanto en laboratorios académicos como industriales y la aplicación de nuevas estrategias para mejorar las plantas transgénicas sólo está limitada por nuestro pobre conocimiento de la función de los genes. Las nuevas estrategias de genómica funcional para la identificación y caracterización de los genes prometen una información abundante con un potencial enorme para producir plantas modificadas genéticamente para propósitos específicos.

PALABRAS CLAVE: Tecnología de plantas transgénicas, ingeniería genética, genómica funcional.

ABSTRACT: Review of the past, present, as well as the perspectives of transgenic plants. This paper discusses also the main strategies for problem-solving in agriculture, medicine, and industry using transgenic plant technology. Today genetic engineering manages agronomic and pharmaceutical features in academic and industrial laboratories, and the application of new strategies to improve transgenic plants is limited only by our poor knowledge of gene functions. The new strategies in functional genomics for gene identification and characterization promise plenty of information with an enormous potential to produce genetically modified plants for specific purposes.

KEYWORDS: Transgenic plant technology, genetic engineering, functional genomics.

I. Introducción

A la fecha, la población mundial rebasa los 6,000 millones de personas y se espera que llegue a los 9,000 millones alrededor del año 2050. La población de alimentos se tiene que incrementar a la misma tasa para satisfacer las necesidades de este gran número de personas. Las plantas representan el primer enlace en la cadena alimenticia y capturan la energía del sol y la incorporan en compuestos que indirecta o directamente proveen la comida necesaria para los organismos vivientes. Las plantas han sido mejoradas tradicionalmente mediante la selección de individuos durante varios ciclos y a la fecha se han producido variedades altamente productivas, especialmente en el caso de los híbridos, los cuales han formado la base de la revolución verde. Un desafío que enfrenta la agricultura tradicional es que solamente los individuos de la misma especie pueden ser cruzados para dar descendencia fértil. Si la resistencia natural a un insecto u hongo específico no existe en los individuos de una especie, entonces los genetistas tradicionales no podrán crear esta resistencia en una variedad de interés. Es necesario por lo tanto buscar fuentes alternativas de genes en otras especies de plantas, hongos o microbios. Los genes portados en otras especies pueden ser transferidos en la actualidad a diferentes especies de plantas con las secuencias reguladoras apropiadas, con el propósito de

¹ Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Av. Fco. J. Múgica S/N, 58030, Morelia, Michoacán, México
- www.umich.mx

² Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN, Unidad Irapuato, Km. 9.6 Libramiento Norte de la Carretera Irapuato-León, 36500, Irapuato, Guanajuato, México - www.ira.cinvestav.mx

adicionar un nuevo rasgo o modificar alguno ya existente. Esta tecnología se ha hecho una realidad con el esfuerzo de varios investigadores durante las últimas dos décadas.

Los primeros experimentos que describieron la transferencia exitosa de genes foráneos y su expresión en células vegetales, fueron publicados hace 20 años. Desde entonces las plantas transgénicas han llegado a ser una herramienta esencial para estudiar la fisiología vegetal y para desarrollar nuevas variedades de plantas que han sido cultivadas extensivamente en algunas regiones del mundo. En términos de la producción de alimentos el impacto de las plantas transgénicas ha estado limitado por las controversias que ha generado y por los sistemas reguladores estrictos que han sido adoptados por varios países. En esta revisión discutimos algunos de los aspectos relevantes que han conducido al desarrollo de las plantas transgénicas, algunas de las herramientas que esta tecnología ha proporcionado para estudiar la biología vegetal y algunos de los mayores logros en el mejoramiento de plantas usando esta tecnología.

II. Métodos de Transformación de Plantas

Se han desarrollado diferentes métodos para introducir genes foráneos en plantas. Una característica común es que el ADN transformante tiene que vencer diferentes barreras; primero tiene que entrar a la célula vegetal atravesando la pared celular y la membrana plasmática y posteriormente tiene que llegar al núcleo e integrarse en los cromosomas residentes. Para la mayoría de las especies la transferencia de genes se lleva a cabo usando explantes que son competentes para la regeneración y de esa manera obtener plantas fértiles completas. Esto implica el uso de la tecnología de cultivo de tejidos que frecuentemente llega a ser un arte. Aunque la tecnología de transferencia de genes se ha convertido en una rutina en varias especies, en otras el paso limitante no es propiamente la transformación sino la ausencia de protocolos de regeneración eficientes. Los métodos de transformación más exitosos y más ampliamente utilizados son el de *Agrobacterium tumefaciens* y la transferencia directa mediante el bombardeo con micro partículas. Otros métodos de transformación directa son además mencionados en las siguientes secciones.

1. El sistema de *Agrobacterium*

En 1907 Smith y Townsend demostraron que la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, un miembro de la familia Rhizobiaceae, es el organismo responsable de producir los tumores de la agalla de la corona; la formación de estos tumores ocurre como resultado de la infección bacteriana, usualmente en los sitios dañados, sobre varias plantas dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas [10]. Este descubrimiento no tuvo mayores repercusiones hasta que Armin Braun demostró que las células tumorales son transformadas y que la proliferación no controlada de estas células no fue dependiente de la presencia continua de *Agrobacterium*, implicando la presencia de un principio de inducción de la transformación [18]. En 1974 Ivo Zaenen, Jeff Schell y Marc Van Montagu [136] en la Universidad de Gante en Bélgica identificaron un megaplásmido, el cual solamente estaba presente en las cepas virulentas de *Agrobacterium* y ausente en las cepas no virulentas; Este plásmido fue denominado Ti (plásmido inductor de tumores). Tres años más tarde Eugene Nester, Milton Gordon y Mary-Dell Chilton [19] en la Universidad de Washington demostraron que solamente algunos genes del megaplásmido eran transferidos a los cromosomas de la célula vegetal y eran los responsables de la inducción de tumores. El segmento de ADN transferido a las células vegetales fue nombrado T-ADN y está delimitado por dos bordes, los cuales son directos repetidos imperfectos de 25 pares de bases. Los investigadores razonaron que cualquier pieza de ADN entre estos bordes podía ser transferida al interior de la célula vegetal e integrarse azarosamente en el genoma de la planta. Tomando esto en cuenta, el equipo de investigación en la Universidad de Ghent y posteriormente investigadores de la compañía Monsanto, insertaron genes heterólogos con las secuencias reguladoras apropiadas en la región

del T-ADN y mostraron que los genes foráneos se integraron y se expresaron funcionalmente en células vegetales [59, 60]. Posteriormente, usando plásmidos Ti desarmados, los cuales contienen un T-ADN que carece de los genes implicados en la formación de tumores fue posible regenerar las primeras plantas transgénicas [26].

Desde los primeros años en que se realizaron experimentos con el sistema de *Agrobacterium* y las especies *Nicotiana tabacum* y *Petunia hybrida*, este sistema ha sido utilizado para transformar un amplio rango de especies vegetales y aunque inicialmente la transformación de cereales se consideró como imposible, unos años después de la transformación exitosa de un rango de especies dicotiledóneas, se demostró que cereales tales como el maíz y el arroz podían ser transformados. Recientemente, también se ha demostrado que los hongos pueden ser transformados usando este sistema [14]. Las especies vegetales transformados con este método se muestran en la [tabla 1](#) [49].

El sistema de *Agrobacterium* tiene varias ventajas sobre otros sistemas de transformación y es considerado la primera opción para transformar plantas ([Figura 1](#)). Estas ventajas son las siguientes: 1) Los segmentos de ADN que se integran en las células vegetales se encuentran en una sola copia en un porcentaje importante de los eventos de transformación [22]; 2) Se tienen actualmente numerosos vectores que contienen los bordes de T-ADN y una variedad de genes reporteros y de selección, lo que permite a los investigadores escoger la combinación más apropiada para insertar genes heterólogos y seleccionar las células transformadas en su modelo de estudio; 3) Es posible transferir grandes fragmentos de ADN incluyendo cromosomas artificiales de levadura [50]; 4) La transformación directa *in planta* sin la necesidad de cultivos de tejido es ahora posible en las especies *Arabidopsis thaliana* y *Medicago trunculata* [123].

2. El método de biobalística

El método de biobalística fue desarrollado como una necesidad para transformar especies de plantas originalmente recalcitrantes a la transformación por el sistema de *Agrobacterium*, incluyendo los cereales económicamente importantes. Este método consiste en la introducción de proyectiles, usualmente de tungsteno u oro cubiertos de ADN e impulsados al interior de las células blanco por aceleración. La velocidad de las partículas puede ser generada por la explosión de una pistola convencional ó una descarga por gases a alta presión, tales como helio o bióxido de carbono [108, 51] ([Figura 1](#)). El análisis molecular de plantas transformadas por biobalística revela un patrón complejo de la integración del transgene, sin embargo, ha sido demostrado que las copias múltiples se encuentran arregladas formando un locus simple y segregan siguiendo un patrón mendeliano [68]. Al igual que con *Agrobacterium* un gran numero de especies diversas de plantas han sido transformadas por el método de biobalística [49] ([Tabla 1](#)). Algunas ventajas del método de biobalística son las siguientes: 1) Pueden ser utilizados una amplia variedad de tipos de explantes para ser bombardeados y obtener plantas fértiles; 2) No hay necesidad de utilizar vectores de transformación especializados; y 3) Es el único método confiable para la transformación de cloroplastos.

3. Otros métodos de transformación

La transferencia directa de ADN a protoplastos usando polietilenglicol (PEG), fosfato de calcio o electroporación han demostrado ser una realidad en una variedad de plantas, incluyendo el maíz [37]. Sin embargo, la baja reproducibilidad y la regeneración de plantas fueron los principales problemas, puesto que estos métodos son frecuentemente específicos para ciertos cultivares. La técnica de microinyección utiliza células inmovilizadas en las cuales el ADN es introducido individualmente, sin embargo, la manipulación

tediosa, el equipo sofisticado y la dificultad en la regeneración de plantas, no ha permitido su utilización de manera extensiva.

III. El Uso de Plantas Transgénicas para estudiar la expresión de Genes y su función

Las plantas transgénicas han sido utilizadas extensivamente para estudiar la función de los genes y su función. Con este propósito las plantas son transformadas con construcciones quiméricas de genes donde un gen reportero se encuentra bajo el control de secuencias reguladoras del gen que va a ser analizado. Varios genes reporteros han sido utilizados comúnmente en plantas, incluyendo los que codifican para β -glucuronidasa, luciferasa y antocianinas [130]. El gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) ha llegado a ser un importante gen reportero *in vivo* en plantas ya que cuando este gen es expresado en células vegetales y éstas son iluminadas con luz azul la GFP produce una fluorescencia verde brillante, la cual es fácilmente detectada sin destruir el tejido vegetal [53]. Esto permite visualizar el destino de células transformadas en el transcurso del tiempo y probar rápidamente la influencia de varios factores en la expresión genética. Estas nuevas generaciones de genes reporteros son analizadas fácilmente y permiten la determinación rápida de secuencias importantes en la regulación temporal, espacial y ambiental de un gene con gran detalle. Los genes reporteros han sido instrumentos en el análisis de la expresión genética bajo una miríada de estímulos ambientales, incluyendo luz, daño, temperatura y hormonas del crecimiento en diferentes tejidos vegetales. Estos estudios están conduciendo a desenmarañar las interacciones complejas implicadas en la respuesta de las plantas ante estos estímulos.

La reducción o incremento de la expresión de un gen blanco por las estrategias de sentido, antisentido o co-supresión pueden ser utilizadas para estudiar la función de los genes. El análisis del fenotipo o cambios en los perfiles de ARNm o de metabolitos, pueden proporcionar información importante para estudiar la función genética. La transformación de plantas es ahora utilizada ampliamente como una herramienta para la mutagénesis insercional, ya sea directamente por el T-ADN ó por la movilización de transposones en especies donde estos elementos no han sido caracterizados. Esta estrategia produce una colección de individuos conteniendo transposones ó T-ADN a lo largo del genoma. Estos mutantes por inserción pueden ser sistemáticamente escudriñados para buscar fenotipos interesantes y los genes afectados pueden ser identificados y aislados con relativa facilidad. Esta estrategia ha sido llevada a cabo con éxito en varias especies de plantas incluyendo *Arabidopsis*, tomate y arroz [92, 41, 77].

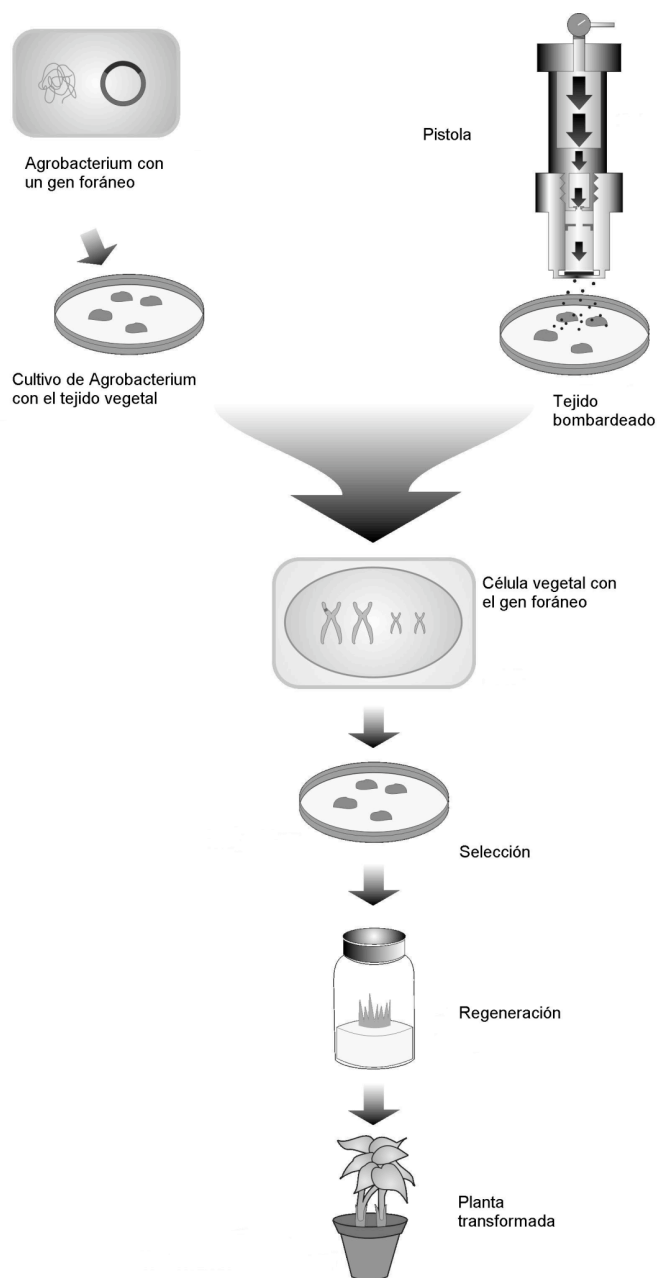


Figura 1. Transformación de plantas por los métodos de *Agrobacterium* o biolística.

La principal diferencia entre estos métodos es la forma de introducción de los genes foráneos al interior de las células vegetales: en el método de *Agrobacterium* los genes necesarios para la transferencia del ADN se encuentran en un megaplásmido y el gen o genes foráneos que serán insertados se proporcionan en un vector separado, con secuencias de transferencia específicas. El proceso de biolística requiere de un dispositivo especial para disparar las partículas, que se encuentran cubiertas por el ADN que contiene las

secuencias de los genes foráneos. La selección de las células transformadas y la regeneración hasta plantas completas usan esencialmente las mismas técnicas en ambos casos.

TABLA 1. Especies vegetales transformadas y métodos de transformación

Nombre común	Nombre Científico	Método de transformación
ANGIOSPERMAS		MONOCOTILEDÓNEAS
MAÍZ	<i>Zea mays</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística, Electroporación, fibras de carbón
TRIGO	<i>Triticum aestivum</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
TRITORDEUM	<i>Hordeum X Triticum</i> <i>anfiploide</i>	Biobalística
CEBADA	<i>Hordeum vulgare</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
ARROZ	<i>Oryza sativa</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística, Electroporación, Microinyección
AVENA	<i>Avena sativum</i>	Biobalística
CENTENO	<i>Secale cereale</i>	Biobalística
CAÑA DE AZÚCAR	<i>Saccharum officinarum</i>	Biobalística
ESPÁRRAGO	<i>Asparagus officinalis</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
AJO	<i>Allium sativum</i>	<i>Agrobacterium</i>
CEBOLLA	<i>Allium cepa</i>	<i>Agrobacterium</i>
PASTO	<i>Dactylis glomerata</i>	Biobalística
PASTO	<i>Panicum virgatum</i>	Biobalística
PASTO BAHÍA	<i>Paspalum notatum</i>	Biobalística
PASTO	<i>Agrostis palustris</i>	Biobalística
PASTO BANDERA	<i>Bouteloua gracilis</i>	Biobalística

ORQUÍDEA	<i>Dendrobium x Jaquelyn Thomas hybrid</i>	Biobalística
PIÑA	<i>Ananas comosus</i>	<i>Agrobacterium</i>
PLATANO	<i>Musa spp.</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
CASSAVA	<i>Manihot esculenta</i>	Biobalística
GINSENG	<i>Panax quinquefolius</i>	<i>Agrobacterium</i>
ANGIOSPERMAS		DICOTILEDÓNEAS
TOBACO	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística, Electroporación, PEG
PAPA	<i>Solanum tuberosum</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
TOMATE	<i>Lycopersicon esculentum</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
PETUNIA	<i>Petunia hybrida</i>	<i>Agrobacterium</i>
SOYA	<i>Glycine max</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
FRIJOL	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Biobalística
ALFALFA	<i>Medicago sativa</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
CACAHUATE	<i>Arachis hypogea</i>	<i>Agrobacterium</i>
ACACIA	<i>Acacia mangium</i>	<i>Agrobacterium</i>
ALGODÓN	<i>Gossypium hirsutum</i>	Biobalística
LINO	<i>Linum usitatissimum</i>	<i>Agrobacterium</i>
GIRASOL	<i>Helianthus annus</i>	<i>Agrobacterium</i>
ARABIDOPSIS	<i>Arabidopsis thaliana</i>	<i>Agrobacterium</i>
ZANAHORIA	<i>Daucus carota</i>	<i>Agrobacterium</i>
REPOLLO CHINO	<i>Brassica campestris ssp. pekinensis</i>	<i>Agrobacterium</i>
CANOLA	<i>Brassica napus</i>	<i>Agrobacterium</i> , Electroporación,

		Microinyección
LECHUGA	<i>Lactuca sativa</i>	<i>Agrobacterium</i>
JUTE	<i>Corchorus capsularis</i>	Biobalística
CAMOTE	<i>Ipomoea batatas</i>	<i>Agrobacterium</i>
PAPAYA	<i>Carica papaya</i>	Biobalística
MANDARINA	<i>Citrus reticulata</i>	<i>Agrobacterium</i>
TORONJA	<i>Citrus paradisi</i>	<i>Agrobacterium</i>
LIMA	<i>Citrus aurantifolia</i>	<i>Agrobacterium</i>
PERA	<i>Pyrus communis</i>	<i>Agrobacterium</i>
CIRUELO	<i>Prunus domestica</i>	<i>Agrobacterium</i>
MANZANO	<i>Malus x domestica</i>	<i>Agrobacterium</i>
ALMENDRO	<i>Prunus dulcis</i>	<i>Agrobacterium</i>
BERRIES	<i>Rubus ideaus</i>	<i>Agrobacterium</i>
FRAMBUESA	<i>Rubus spp.</i>	<i>Agrobacterium</i>
ALERCE EUROPEO	<i>Larix kaempferi</i>	<i>Agrobacterium</i>
PEPINO	<i>Cucumis sativus</i>	Biobalística
MELÓN	<i>Cucumis melo</i>	<i>Agrobacterium</i>
VID	<i>Vitis vinifera</i>	<i>Agrobacterium</i>
CAFÉ	<i>Coffea canephora C.</i> <i>arabica</i>	<i>Agrobacterium</i>
TÉ	<i>Camellia sinensis</i>	<i>Agrobacterium</i>
MENTA	<i>Mentha x piperita L.</i>	<i>Agrobacterium</i>
OPIO	<i>Papaver somniferum</i>	<i>Agrobacterium</i>
ÁLAMO BLANCO	<i>Populus alba</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística

NOGAL	<i>Carya illinoensis</i>	<i>Agrobacterium</i>
NUEZ DE LA INDIA	<i>Juglans regia</i>	<i>Agrobacterium</i>
EUCALIPTO	<i>Eucalyptus</i> <i>camaldulensis</i> <i>E. globulus</i>	<i>Agrobacterium</i> , Biobalística
ÁRBOL DEL HULE	<i>Hevea brasiliensis</i>	Biobalística
GIMNOSPERMAS		
ABETO NORUEGO	<i>Picea abies</i>	Biobalística
ABETO BLANCO	<i>Picea glauca</i>	Biobalística
PINO	<i>Pinus radiata</i>	Biobalística

IV. Producción de plantas transgénicas con aplicaciones importantes en la agricultura, la industria y la medicina

La carrera para obtener mejores plantas por ingeniería genética empezó con resultados satisfactorios con el desarrollo de los métodos de transformación de plantas, el conocimiento de la estructura y la función de ciertos genes y el deseo para resolver algunos de los problemas clásicos en la agricultura tradicional. Las estrategias iniciales consideraron la introducción de un solo gen en las plantas de interés, sin embargo ahora las estrategias implican varios genes de una ruta metabólica. Las principales estrategias utilizadas para producir plantas transgénicas mejoradas con aplicaciones comerciales o bien agrícolas se mencionan en las siguientes secciones:

1. Nutrientes y calidad de las semillas y frutos

Algunos frutos como el tomate, necesitan conservar sus propiedades post-cosecha y el principal problema es el ablandamiento debido al proceso de maduración. Usando genes vegetales en antisentido es posible transformar plantas y bloquear genes importantes en este proceso, tales como aquellos implicados en la degradación de la pared celular o la biosíntesis de etileno [114,13]. A la fecha, los tomates han sido modificados para tener una maduración más lenta y comercializados por tres diferentes compañías [12]. Esta estrategia tiene una aplicación potencial enorme para las cosechas de frutos tropicales, tales como el mango y la papaya que se cultivan en varios países en desarrollo. En varios países la exportación lucrativa no puede ser explotada puesto que los frutos maduran rápidamente y hay una ausencia de condiciones apropiadas de almacenamiento y sistemas de transporte eficientes que permitan llevar el producto al consumidor final [58].

Las semillas representan la fuente de alimento más importante de las plantas, ya que contienen proteínas, lípidos y carbohidratos y pueden ser almacenadas y transportadas sin que sufran daños o cambios considerables en sus propiedades nutricionales. Los humanos y los animales no pueden sintetizar diez de los veinte aminoácidos esenciales y por lo tanto deben obtenerlos como parte de su dieta. La composición de aminoácidos entre las semillas de diferentes especies vegetales es variable y no existe una sola de ellas con la proporción óptima de estos compuestos requeridos en la dieta humana. Las fuentes principales de proteínas para una proporción importante de la población humana son los granos de cereales y las semillas de leguminosas. Sin embargo, una de las características de estas semillas es la deficiencia de lisina en los cereales y de cisteína y metionina en las leguminosas. Una solución obvia para resolver este problema sería el consumo de ambos tipos de semillas en las proporciones adecuadas, sin embargo, en el caso de los humanos existen tradiciones culturales y factores económicos que impiden aplicar esta estrategia. La otra alternativa consiste en cambiar la composición de las proteínas de las semillas de ciertos cultivos. Se han realizado esfuerzos en este sentido, que incluyen la producción de proteínas ricas en metionina en plantas transgénicas de tabaco [4], semillas de canola con un incremento de metionina del 33% [3], la expresión de un gen de albúmina de semilla de girasol en *Lupinus angustifolius* duplicando el contenido de metionina [94] y la expresión en semillas de tabaco de un gen sintético que codifica para una proteína con un contenido de lisina del 43% [67a]. Se logró un incremento de 100 veces en la lisina libre tanto en canola como soya mediante la modificación de las propiedades reguladoras de las enzimas involucradas en la biosíntesis de este aminoácido esencial [31]. La papa es la verdura más importante que se cultiva y ha sido transformada con un gen proveniente de amaranto, el cual codifica para una proteína de semilla no alergénica (AmA1), con una composición de aminoácidos balanceada y que promete mejorar el valor nutricional de esta fuente alimenticia [16]. Recientemente, el gobierno de la India ha autorizado el cultivo de estas papas transgénicas para aliviar los problemas serios de malnutrición que tiene ese país.

La deficiencia en vitamina A es un problema nutricional muy importante en varios países, especialmente en Asia, donde 124 millones de niños sufren de ceguera causada por la deficiencia de esta vitamina. Como una solución potencial a este problema ha sido desarrollada una estrategia para producir vitamina A en arroz. Debido a que este cultivo normalmente no produce vitamina A en la semilla, se introdujeron 3 genes foráneos en plantas de arroz, los cuales codifican para 3 enzimas que permitieron la síntesis de β -caroteno (pro-vitamina A) en el endospermo de las semillas [134] (Figura 2). Considerando que el arroz es un componente importante en la dieta de la población asiática, el consumo del ahora llamado “arroz dorado” ayudará a aliviar la deficiencia de vitamina A en esta región del mundo.

Se considera que los lípidos de plantas tienen mejores cualidades nutricionales que las grasas animales, debido principalmente a que no contienen colesterol y a que son ricos en ácidos grasos poli-insaturados. Un aspecto importante de la calidad de los aceites vegetales es la proporción de ácidos grasos poli insaturados con relación a los saturados, por lo que se han realizado esfuerzos para alterar la composición de aceites vegetales. Una historia exitosa en este sentido ha sido la producción de canola transgénica, la cual acumula un 40% de ácido láurico, debido a la introducción de un gen que proviene del laurel California Bay (*Umbellularia californica*) y que codifica para una enzima tioesterasa [95]. En el futuro será necesario producir más aceites nuevos para satisfacer la demanda en el mercado ya sea para consumo o para uso industrial, considerando que los aceites fósiles no renovables se terminarán un día y los aceites vegetales representan un recurso renovable que puede ser cosechado a una tasa de varios millones de toneladas por año.

La enzima fitoeno sintasa de la bacteria *Erwinia uredovora* se ha sobre expresado de manera específica en frutos de tomate (*Lycopersicon esculentum*) utilizando el promotor de poligalacturonasa de tomate,

incrementando los niveles de fitoeno, licopeno, β -caroteno y luteína 2.4, 1.8 y 2.2 veces, respectivamente [35]. Estos cambios en los coeficientes de flujo han revelado un cambio en el paso regulador de la carotenogénesis, lo cual tiene implicaciones importantes en las estrategias de ingeniería metabólica en el futuro. Además, el alto consumo de tomate en la dieta humana ayudará a reducir la aparición de enfermedades crónicas, tales como enfermedades coronarias del corazón y ciertos cánceres.

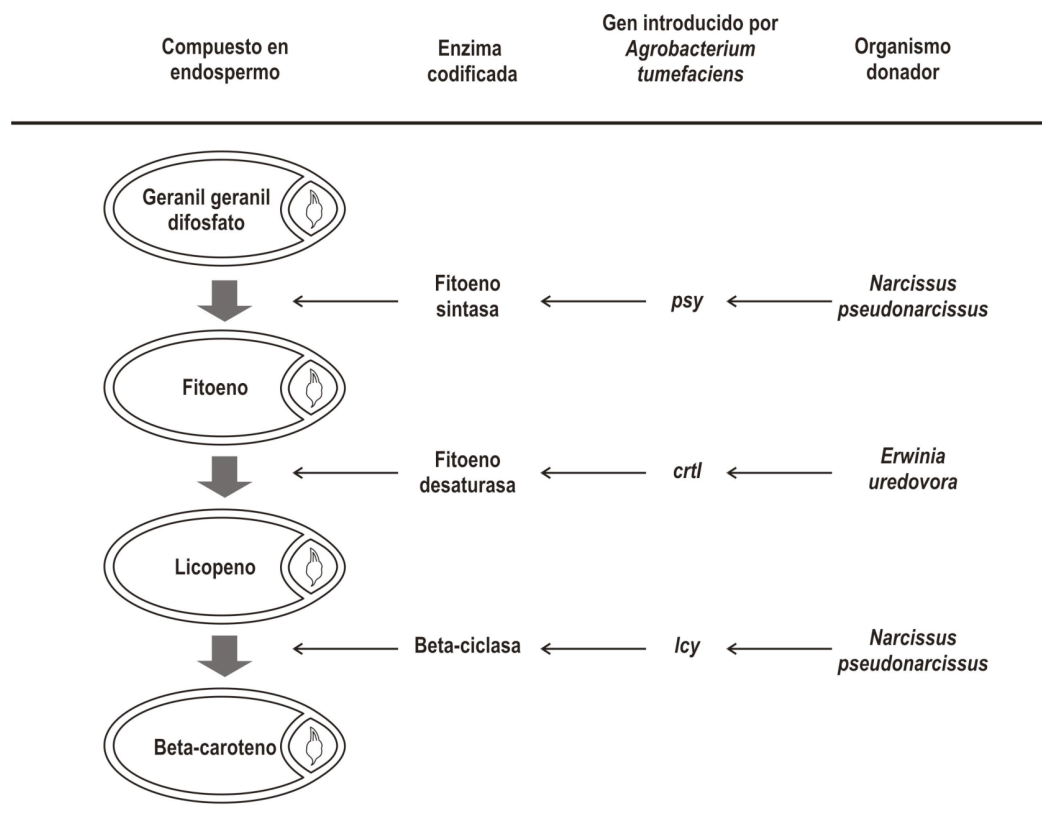


Figura 2. Producción de β -caroteno en arroz transgénico.

La introducción en arroz de tres genes foráneos distintos se efectuó por el método de *Agrobacterium*. Las enzimas codificadas por estos genes convierten el geranilgeranildifosfato a β -caroteno y ocasionan su acumulación en el endospermo. Este compuesto puede ser convertido a vitamina A en el cuerpo humano.

Aunque el consumo de café no juega un papel importante en la dieta humana, éste tiene un papel social y psicológico importante ya que acompaña eventos sociales y reuniones a diferentes niveles. Sin embargo, el consumo de cafeína puede afectar de manera adversa a los individuos sensibles al producirles insomnios y al incrementarles la presión sanguínea, entre otros efectos. Con esto en mente, usando la estrategia de ARN de interferencia se inhibió la expresión del gen *CaMXMT1*, que codifica para la enzima teobromina sintasa involucrada en la síntesis de cafeína en plantas de *Coffea canephora* [97]. El contenido de cafeína de estas plantas se redujo en más de un 70% indicando que será posible producir semillas de café descafeinado. Esta estrategia está siendo aplicada ahora para la especie *Coffea arabica*, la cual contribuye con aproximadamente el 70% del mercado mundial del café.

2. Resistencia a insectos y virus

Uno de los problemas más importantes en la producción agrícola lo representa el daño a los cultivos por causa de los insectos, virus y otros patógenos, por lo que los investigadores se han enfocado al desarrollo de plantas transgénicas resistentes a pestes y enfermedades. El desarrollo de plantas transgénicas resistentes a insectos se ha basado en el conocimiento de proteínas insecticidas. *Bacillus thuringiensis* (Bt) es un microorganismo del suelo que durante la esporulación produce proteínas llamadas δ -endotoxinas. Cuando estas proteínas son ingeridas por insectos, éstas ejercen su toxicidad al unirse a células epiteliales del intestino medio, causando una lisis osmótica [30]. Varias cepas de Bt expresan diferentes δ -endotoxinas, cada una de las cuales tiene su propio espectro de actividad contra diferentes tipos de insectos [112]. Por ejemplo, las proteínas Cry1A y Cry1C son específicas para larvas de lepidópteros, tales como las del barrenador europeo del maíz (*Ostrinia nubilalis*), mientras que la proteína Cry3A es tóxica para larvas de coleópteros tales como las del escarabajo de la papa de Colorado (*Leptinotarsa decemlineata*) [109]. Los genes de δ -endotoxinas han sido manipulados para la expresión en plantas ya sea por la generación de versiones truncadas, disminución en el contenido de bases GC y cambios en el uso de codones [30]. Se han producido a la fecha plantas transgénicas que expresan δ -endotoxinas provenientes de varias cepas de *Bacillus thuringiensis* (conocidas como líneas Bt) y que pueden ser efectivamente utilizadas para el control de insectos en una variedad de especies vegetales, tales como el tabaco [126], el tomate [33] el algodón [104], la papa [103], el maíz [71], la canola [117], la soya [118] y el arroz [133]. En condiciones de presencia de insectos 100 veces mayores con relación a las infestaciones naturales las plantas de maíz Bt muestran excelente protección contra el barrenador europeo de este cultivo (*Ostrinia nubilalis*) y por otro lado las plantas de papa transformadas son resistentes al ataque de larvas del escarabajo de Colorado [30]. Aunque el maíz Bt ha representado uno de los mayores éxitos biotecnológicos, los insectos que atacan a este cultivo difieren dependiendo de la región geográfica, por lo que son necesarios ensayos de campo para evaluar su efectividad para el control de insectos en diferentes ambientes. Se han generado plantas de maíz resistentes a larvas de escarabajos de la raíz mediante la expresión de dos proteínas nuevas de *Bacillus thuringiensis* [99]. Se han producido líneas de arroz Bt híbridas de alta producción, las cuales muestran resistencia a dos de las plagas de insectos más importantes de este cultivo (el barrenador amarillo del tallo y el defoliador), sin disminuir la productividad [124]. Se han desarrollado líneas transgénicas resistentes a insectos en plantas de caña de azúcar, un cultivo importante en algunos países en desarrollo [127].

Aunque la producción de endotoxinas Bt es la estrategia más ampliamente utilizada para producir plantas resistentes a insectos, éstas no son eficientes para todas las plagas, por lo que ha sido necesario utilizar insecticidas alternativos y proteínas nematicidas. De esta manera los investigadores han estudiado además los inhibidores de proteasas (IP), los cuales son parte del sistema de defensa de varias plantas. Varios genes de inhibidores de proteasas de origen vegetal que han sido efectivos contra insectos blanco han sido introducidos en diferentes especies de plantas, tales como canola, papa, alfalfa, lechuga, Petunia y tomate, sin embargo, estas plantas todavía no han sido comercializadas [109]. Se han producido plantas transgénicas de *Arabidopsis* que suprimen el crecimiento y producción de huevos de dos nemátodos de la raíz [79].

Se ha producido la glicoproteína avidina en maíz, la cual previene el desarrollo de insectos que dañan las semillas durante el almacenamiento. Esta toxicidad es causada por la deficiencia en biotina y se sugiere que la avidina podría ser utilizada como un biopesticida en granos almacenados [72]. Se han producido plantas fértiles de tabaco con la expresión de avidina en la vacuola de células de la hoja, y se ha demostrado que estas plantas detienen el crecimiento y causan la mortalidad de larvas de dos tipos de lepidópteros nocturnos *Helicoverpa armigera* y *Spodoptera litura* [15].

Varias plantas transgénicas resistentes a virus se han valido de genes derivados de los mismos virus, en un concepto que ha sido referido como resistencia derivada del patógeno. El primer ejemplo de esta estrategia fue la expresión del gen de la cubierta de la proteína del virus del mosaico del tabaco (VMT) en plantas de tabaco, las cuales mostraron resistencia a este virus [106]. Usando una estrategia similar se han producido plantas de calabacita amarilla resistentes al virus de mosaico amarillo de la calabaza (ZYMV) y plantas de sandía resistentes al virus II del mosaico (VMVII) [112].

El virus de la mancha anular de la papaya (PRV) es transmitido por áfidos y produce una de las enfermedades más destructivas en este cultivo. Los esfuerzos para producir variedades de papaya resistentes al PRV por técnicas de hibridación convencional han fracasado, por lo que fue necesario producir plantas transgénicas con la expresión del gen de la cubierta de la proteína de este virus con resultados exitosos [120]. El futuro de los cultivos de papaya en la región de Hawai descansan por hoy en el desarrollo de plantas transgénicas resistentes a virus [46]. Se han producido además tomates transgénicos resistentes al virus del mosaico del tomate, papas transgénicas resistentes a los virus X y Y (PVX y PVY) y pepinos resistentes al virus del mosaico del pepino [34]. En China se han transformado sandías con el gen de la cubierta de la proteína del virus WMV-2 las cuales han mostrado resistencia a la infección por este virus [129]. Actualmente se han comercializado papayas y calabacitas amarillas transgénicas con resistencia a virus. El mecanismo de protección mediado por el gen de la cubierta de la proteína u otros genes virales funciona a través de una co-supresión de ARN [82].

Debido a que los genomas de los potivirus son traducidos inicialmente en una poli proteína, el mecanismo para producir las diversas proteínas requiere de proteinasas de cisteína. Se ha demostrado que la expresión de un inhibidor de proteinasa de cisteína de arroz en plantas de tabaco, produce resistencia contra dos importantes potivirus, el virus del grabado del tabaco (TEV) y el virus Y de la papa (PVY). Esto representa un método de control alternativo para este importante grupo de virus de plantas transmitidos por áfidos [48].

3. Resistencia a hongos fitopatógenos y bacterias

Los hongos representan el grupo de patógenos más importante de plantas cultivadas y se ha dedicado mucho esfuerzo para producir plantas resistentes, sin embargo, los éxitos en la producción de plantas transgénicas resistentes a estos patógenos han sido limitados. La expresión de genes que codifican enzimas capaces de degradar los constituyentes mayores de la pared celular de los hongos (quitina y β -1,3 glucanos) en plantas transformadas, ha sido utilizada como una estrategia para controlar a estos organismos. La expresión en tomate, de genes que codifican para las dos enzimas mencionadas, generó un nivel de resistencia importante al hongo *Fusarium*, el cual normalmente produce una enfermedad con marchitamiento [112].

La producción de toxinas por algunas bacterias representa un importante factor de virulencia. Así por ejemplo, *Xanthomonas albilineans* produce una toxina que bloquea el desarrollo del cloroplasto, conduciendo a síntomas cloróticos característicos. La introducción y expresión del gen detoxificante *albD* de la bacteria *Protea dispersa* en caña de azúcar, produce una disminución significativa de los síntomas de la enfermedad y una disminución en la multiplicación del patógeno [138]. La bacteria *Pseudomonas syringae* pv *phaseolicola* produce faseolotoxina, la cual inhibe a la carbamoil transferasa (OCTasa), una enzima involucrada en la biosíntesis de citrulina. Considerando que *P. syringae* también produce citrulina, esta bacteria contiene un gen que codifica para una OCTasa resistente a la faseolotoxina, y cuando es introducido en el genoma del tabaco proporciona resistencia contra este patógeno [27].

En el arroz silvestre *Oryza longistaminata* se ha identificado y aislado el gen *Xa21* que confiere resistencia a bacterias [115]. Esta especie es resistente a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*), un agente que causa la destrucción de la hoja y produce pérdidas en la producción en arroz comercial cultivado en Asia. La introducción del gen *Xa21* a cuatro variedades importantes de arroz del tipo Indica confiere una mejora significativa en la resistencia a *Xoo*. Si estas líneas transgénicas muestran resistencia al patógeno en condiciones de campo y mantienen sus cualidades deseables, entonces podrán ser utilizadas como material de hibridación o bien de manera directa para producir plantas resistentes [139]. Otra estrategia que ha sido utilizada es la proteína AP1, que se encuentra implicada en el retraso de la respuesta hipersensitiva a *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* en plantas de arroz no hospederas; una variedad de arroz del tipo Japónica fue transformada con el gen *apl* y varias de las líneas mostraron resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (*Xoo*) [119].

4. Fotosíntesis y metabolismo de azúcares

La fijación de CO₂ en plantas C₃ se lleva a cabo directamente por la enzima RUBISCO, la cual funciona a la vez como una carboxilasa y una oxidasa. Esto genera una pérdida de alrededor del 50% del carbono fijado, en un proceso conocido como fotorespiración. Esta es la situación de plantas económicamente importantes, tales como el trigo, arroz, soya y papa. Por otro lado, las plantas C₄ tales como el maíz y la caña de azúcar, son más eficientes debido a que primero fijan el CO₂ mediante otra enzima, la fosfoenolpiruvato carboxilasa (PEPC), para producir oxaloacetato, el cual es reducido a malato o transaminado a aspartato. Estos compuestos de cuatro carbonos son descarboxilados para generar CO₂ a concentraciones mayores y de esta manera incrementar la actividad de carboxilasa de la RUBISCO. Aunque la mayoría de las plantas C₄ presentan una anatomía particular que separa las actividades de PEPC y RUBISCO, algunas macrofitas acuáticas sumergidas desarrollan metabolismo C₄ en un solo tipo de célula. Las estrategias para introducir el metabolismo C₄ en plantas C₃ se han enfocado en la sobre expresión de PEPC y una enzima descarboxilasa, ya sea NADP-ME (EC 1.1.140) ó PPDK (EC 2.7.9.1); esto se ha logrado en plantas de tabaco y papa [54], las cuales mostraron una menor inhibición de la fijación de CO₂ por efecto del oxígeno. En plantas de arroz transformadas con genes que sobre expresaron PEPC y PPDK se incrementó la capacidad fotosintética en 35% y la producción de grano en 22% [73].

Una enzima clave en la ruta de síntesis de sacarosa es la sacarosa fosfato sintasa (SPS), la cual produce sacarosa fosfato a partir de UDP-glucosa y fructosa 6-fosfato. Esta enzima es regulada ya sea por modificación covalente por fosforilación ó alostéricamente por fosfato inorgánico. Como una manera de modificar la partición de carbono e incrementar la síntesis de sacarosa, se han introducido genes de SPS de algunas especies en otras. El gen que codifica la SPS de maíz ha sido sobre expresado en plantas de tomate incrementando seis veces la actividad de la enzima SPS, duplicando la cantidad de sacarosa [132], e incrementando la tasa de fotosíntesis en un 20% en condiciones de saturación de CO₂ [38]. La diferencia encontrada en los niveles de actividad de la enzima y las cantidades de sacarosa reflejan el hecho de que la vía de síntesis de sacarosa se encuentra altamente regulada a diferentes niveles.

5. Estrategias para producir tolerancia al estrés abiótico

Algunos de los factores abióticos más importantes que disminuyen la producción agrícola son la sequía, la salinidad y la deshidratación, debido a que producen un estrés osmótico. Una manera de incrementar la tolerancia a tal estrés es la producción de compuestos osmoprotectores (osmolitos), tales como azúcares, alcoholes, aminoácidos y compuestos cuaternarios de amonio (glicinbetaína), los cuales incrementan el potencial osmótico de la célula permitiendo la entrada de agua y la estabilización de membranas y

estructuras macromoleculares [61]. Algunas plantas que se encuentran adaptadas de manera natural a las condiciones de estrés producen estos osmolitos, sin embargo, varios cultivos importantes no acumulan estos compuestos osmoprotectores. Se han logrado algunos avances para incrementar la producción de osmolitos en plantas transgénicas. La glicinbetaína ha sido producida en plantas de tabaco mediante la expresión de un gen bacteriano y estas plantas muestran una mejora en la tolerancia al estrés por NaCl [80]. Se han obtenido líneas transgénicas de *Arabidopsis* que contienen en el genoma de sus cloroplastos genes que codifican para enzimas responsables de la síntesis de glicinbetaína, lo que las hace más tolerantes a la sal y el frío y les permite crecer en concentraciones de 100 mM de cloruro de sodio [55] y a altas temperaturas [2].

La sobre producción de trehalosa en tabaco incrementa la tolerancia a sequía tanto en plantas intactas como en hojas separadas [92]. La sobre expresión de trehalosa combinada con el uso de un promotor inducible por ácido abscísico en plantas transformadas de arroz les confiere un crecimiento sostenido, menor daño foto oxidativo y un mejor balance de minerales, en condiciones de estrés ocasionadas por salinidad, sequía y bajas temperaturas [39]. Otros osmolitos tales como el manitol han sido sobre producidos en *Arabidopsis*, donde se ha observado un mejoramiento en la germinación de semillas bajo altas condiciones salinas [122]. Se ha demostrado recientemente que la expresión ectópica en plantas de trigo del gen *mtlD* de *E. coli* el cual permite la síntesis de manitol, mejora la tolerancia a estrés hídrico y salinidad en las plantas [1].

Una estrategia alternativa para la producción de compuestos osmoprotectores es la sobre expresión de genes que codifican para transportadores de iones, tales como el antiport Na^+/H^+ de la vacuola, el cual transporta sodio hacia fuera del citosol y lo introduce en la vacuola manteniendo así un balance osmótico. Plantas transformadas de *Arabidopsis* que sobre producen un antiport Na^+/H^+ han mostrado mejoría en su tolerancia a sal y han mantenido un crecimiento y desarrollo sostenido en suelos saturados de agua que contienen cloruro de sodio 200 mM [5]. Plantas transgénicas de tomate que sobre produjeron el antiport Na^+/H^+ de *Arabidopsis* fueron capaces de crecer, florecer y producir frutos en la presencia de altas concentraciones salinas (200 mM) y mostraron bajo contenido de sodio en el fruto y preservaron las cualidades de este órgano [137]. En plantas de arroz sensibles a sal se introdujo y se expresó el gen *AgNHX1* que codifica para un antiporter Na^+/H^+ de una planta halofítica, lo que les permitió sobrevivir en concentraciones de 300 mM de cloruro de sodio, mientras que las plantas no transformadas murieron [98].

Se han identificado factores de transcripción que regulan la expresión de genes implicados en la tolerancia a frío y sequía, tales como DREB1A, el cual actúa específicamente en el elemento regulador DRE e induce la expresión de genes que confieren tolerancia a estrés. La sobre expresión ectópica de estos factores de transcripción usando promotores constitutivos tales como el 35S del CaMV, han conducido a la tolerancia a sal, frío y sequía, sin embargo, se han producido algunos efectos negativos en el crecimiento y desarrollo. Este problema ha sido resuelto mediante el uso de promotores inducidos por estrés, tales como el promotor *rd29A* que al regular la expresión de DREB1A induce la expresión de genes que confieren tolerancia a estrés sin afectar el crecimiento y desarrollo de plantas de *Arabidopsis* [67]. Otro factor transcripcional, CBF1 (DREB1B), se une al elemento CRT/DRE en la región promotora de genes regulados por frío, el cual responde tanto a bajas temperaturas como al déficit hídrico. Una sobre expresión del factor DREB1B de *Arabidopsis* incrementa la tolerancia al frío en *Brassica napus* [64] y confiere resistencia al déficit hídrico en plantas de tomate transgénicas [63]. Esto significa que este factor se encuentra altamente conservado en plantas con flores y podría ser utilizado en otras especies.

La acidez de los suelos es un problema en las regiones del mundo donde existe alta precipitación, tales como los bosques de coníferas y selvas tropicales y subtropicales, lo cual representa alrededor del 40% de las tierras arables del mundo (68% en América Tropical, 38% en Asia tropical y 27% en África tropical)

[57]. El aluminio es el elemento metálico más abundante en la corteza terrestre y es tóxico para varias plantas cuando se encuentra en solución a bajas concentraciones, lo cual es un problema de los suelos ácidos [78]. El fósforo es asimilado por las plantas en su forma aniónica, el fosfato, el cual es extremadamente reactivo y sólo se encuentra disponible para las plantas en un rango muy estrecho de pH. En los suelos ácidos el fósforo forma moléculas poco solubles con aluminio y hierro, mientras que en suelos alcalinos se combina eficientemente con calcio y magnesio para formar compuestos difícilmente solubles [8].

La producción de ácidos orgánicos y su exudación en los suelos es una estrategia usada por algunas plantas para formar compuestos quelados con el aluminio y eliminar su toxicidad [83]. Las plantas adaptadas a suelos alcalinos (calcícolas) exudan tres a cuatro veces más ácidos orgánicos de bajo peso molecular con relación a las plantas no adaptadas (calcífugas), permitiéndoles mayor capacidad para extraer fosfato y hierro [125]. Se transformaron plantas de tabaco y papaya con el gen de la citrato sintasa de *Pseudomonas aeruginosa* y éstas secretaron cinco a seis veces más citrato de sus raíces con relación a los controles, lo que les confirió tolerancia a niveles tóxicos de aluminio, diez veces mayores que los tolerados por plantas controles [28]. Las plantas de tabaco que sobre produjeron citrato además mostraron mejor crecimiento en suelos alcalinos bajos en fósforo asimilable, demostrando el uso eficiente de formas insolubles, tales como el fosfato de calcio [84] (Figura 3). Un gen mitocondrial de citrato sintasa de *Arabidopsis thaliana* introducido en zanahoria (*Daucus carota*) produjo un incremento en la capacidad para tomar fosfato a partir de fuentes insolubles de fósforo [70]. La manipulación de la síntesis de ácidos orgánicos en plantas transgénicas podría ser usada para la obtención de nuevas variedades de plantas que estuvieran mejor adaptadas para crecer en condiciones de suelo adversas.

La fitoremediación de suelos contaminados con metales es un problema complejo. El uso de plantas que acumulan metales para removerlos selectivamente del suelo y reciclarlos, es una alternativa tecnológica potencial con menores costos con relación al reemplazamiento del suelo y otras estrategias [17]. La expresión de un gen que codifica para una enzima bacteriana (MerA) en *Arabidopsis thaliana*, confiere tolerancia a niveles tóxicos de mercurio reduciéndolo a una forma volátil y no tóxica del elemento, Hg(0) [107]. Otra estrategia consiste en la acumulación de metales pesados en las plantas para posteriormente removerlas del suelo, como se ha realizado en los siguientes casos: a) Un gen de trigo que codifica para una fitoquelatina sintasa (TaPCS1) fue introducido en una variedad silvestre de rápido crecimiento y de alta biomasa, *Nicotiana glauca*, y estas plantas transformadas mostraron un incremento en la tolerancia a Cadmio y Plomo y acumularon el doble de la concentración de este último metal [43]; b) En la mostaza de la India (*Brassica juncea*) una glutatión sintasa ó una gama-glutamilcisteína sintasa fueron sobre producidas y las plantas transformadas acumularon tres veces más cromo, cobre y plomo [9].

6. Las plantas como bioreactores

La producción de proteínas extrañas en plantas tiene varias ventajas puesto que éstas pueden ser producidas de manera protegida en los empaques naturales que representan la semillas y de esta manera pueden ser fácilmente almacenadas y transportadas. La producción en frutos o tubérculos también tiene sus ventajas, ya que pueden ser consumidos directamente o bien procesados para obtener el producto de interés. Larrick y Thomas (2001) han mencionado además algunas otras ventajas: 1) El costo a una escala agrícola es bajo; 2) El uso de plantas ofrece costos de capitalización reducidos en comparación con los métodos de fermentación; 3) La producción puede ser escalada rápidamente, 4) A diferencia de las bacterias las plantas pueden producir proteínas multiméricas complejas que pueden ser ensambladas correctamente, tales como los anticuerpos, y 5) Las proteínas vegetales son consideradas como más seguras, ya que las plantas no sirven de hospederos de patógenos de humanos. Los productos biofarmacéuticos son la mejor elección para

la producción en plantas, por el alto costo de producirlos en otros sistemas, tales como células de mamíferos. Como un ejemplo de esto se ha sido producido el β -interferón en la planta de nabo, el cual podría ser utilizado en el tratamiento de la hepatitis B ó C [44].

SUELOS ÁCIDOS

SUELOS ALCALINOS

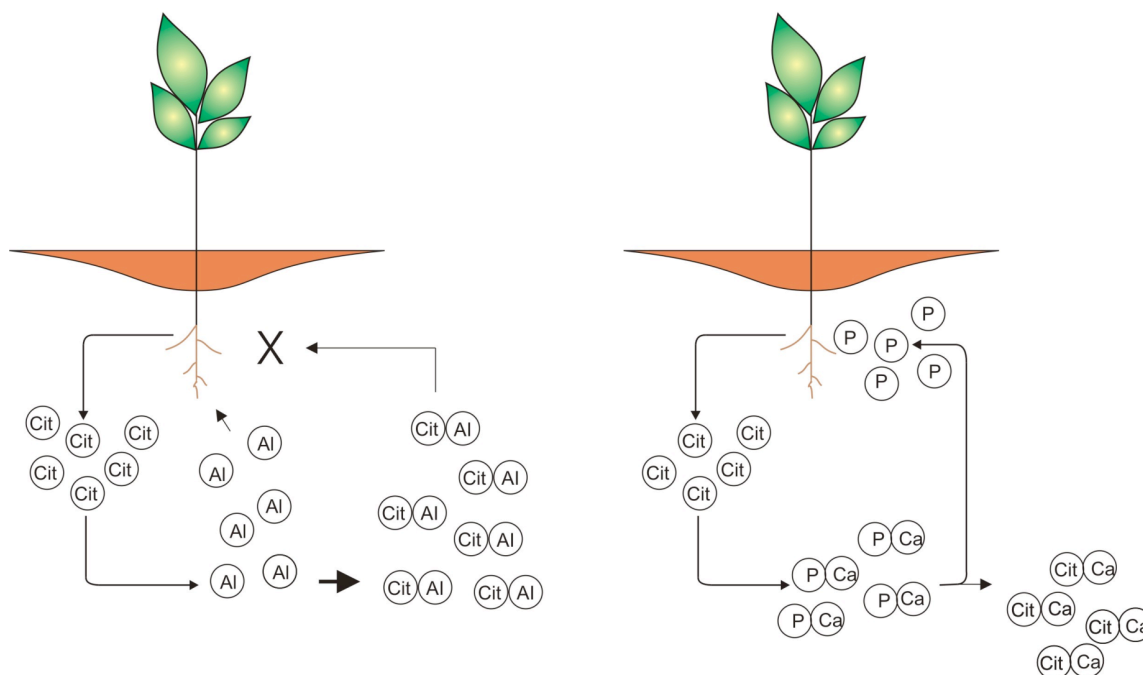


Figura 3. Modelo para el papel benéfico de la excreción de ácidos orgánicos en suelos ácidos y alcalinos.

En suelos ácidos el aluminio (Al) se vuelve soluble e inhibe el crecimiento de las raíces. Varias plantas que de manera natural excretan ácidos orgánicos son tolerantes a aluminio. Las plantas modificadas genéticamente que sobre expresan enzimas implicadas en la biosíntesis de ácidos orgánicos tienen una mayor capacidad para producir y excretar ácidos orgánicos y por lo tanto son más tolerantes al aluminio debido a que este elemento forma compuestos con los ácidos orgánicos. En los suelos alcalinos el fósforo forma compuestos insolubles con el calcio y el hierro y como una consecuencia de este problema la disponibilidad de fósforo es una limitante importante en la producción agrícola. Las plantas transgénicas con niveles altos de excreción de ácidos orgánicos tienen una mejor capacidad para crecer en suelos alcalinos, debido a que pueden aprovechar las formas insolubles del fosfato.

La tripsina de bovino es una enzima ampliamente utilizada de manera comercial para digerir o procesar otras proteínas, incluyendo algunas de tipo terapéutico. La industria biofarmacéutica está tratando de eliminar de sus procesos de manufactura a las proteínas derivadas de animales debido a la posible contaminación de estos productos por patógenos de humanos. Una solución obvia es expresar estas proteínas en plantas. Se ha utilizado maíz transgénico para producir tripsina a niveles comerciales y se ha

demostrado que es funcionalmente equivalente a la tripsina nativa de páncreas de bovino [131]. La disponibilidad de este producto permitirá el reemplazamiento de la tripsina derivada de animales.

La enfermedad de Gaucher es un desorden heredado de manera recesiva y ocasionada por la ausencia de la enzima glucocerebrosidasa. Esta enzima ha sido extraída tradicionalmente de las placentas a un costo elevado. La producción de glucocerebrosidasa ha sido posible en plantas de tabaco lo cual apoya fuertemente su viabilidad comercial para terapias en un futuro [40]. La producción de hirudina, un anticoagulante que permite tratar la trombosis ha sido lograda en plantas de canola y actualmente se produce de manera comercial [11]. La hormona humana somatotropina es utilizada en el tratamiento del enanismo en niños, y aunque ha sido producida en bacterias, recientemente se ha producido en cloroplastos de tabaco a niveles elevados, demostrando el potencial de este organelo como un vehículo altamente eficiente para la producción de proteínas farmacéuticas [116].

Se ha logrado la generación y ensamblaje de anticuerpos de secreción funcionales en plantas de tabaco [52], lo que tiene implicaciones importantes en la inmunoterapia pasiva. Actualmente sólo cuatro anticuerpos se han producido en plantas con un uso potencial en la terapéutica de humanos [24]. De estos sólo uno de ellos ha sido probado en humanos, un anticuerpo quimérico IgG-IgA dirigido contra antígenos de superficie de *Streptococcus mutans*, el agente principal que produce la caries dental. Estos anticuerpos producidos en tabaco fueron aplicados tópicamente en los dientes y se demostró su efectividad. El segundo anticuerpo, dirigido contra el Virus Simple del Herpes ha sido producido en soya y demostró su efectividad en la prevención de la transmisión del HSV-2 en un modelo de ratón. Un tercer anticuerpo, dirigido contra un antígeno carcino embrionario (CEA) se ha expresado recientemente en arroz y trigo. El cuarto anticuerpo ha sido producido en tabaco para el tratamiento de linfomas de células tipo B. Se ha propuesto al maíz como una planta ventajosa para producir anticuerpos, puesto que el sistema del grano permite la acumulación estable de niveles altos de proteína recombinante, lo cual se ha demostrado en el caso de una inmunoglobulina A de secreción [75].

Los antígenos son capaces de activar el sistema mucosal inmune tanto en el tracto respiratorio como en el digestivo. La protección parcial de proteínas vegetales durante la digestión debido a la presencia de las paredes celulares, permite la conservación de antígenos y mantienen su efectividad para así activar el sistema inmune de mucosas del intestino. Sin embargo, un factor que ha limitado el desarrollo de esta tecnología son los niveles de acumulación relativamente bajos de algunas proteínas antigénicas en tejidos vegetales. Se produjo en tabaco [88] y papa [29] un antígeno de la hepatitis B, generando inmunización en ratones en el último caso [69]. Un antígeno para el cólera ha sido producido en tabaco [56] y en papa [7] y en el último caso generaron inmunidad protectora en ratones contra la holotoxina del cólera [6]. Los tomates han sido usados además para producir un antígeno contra el virus de la rabia [91]. Una subunidad de la enterotoxina de *Escherichia* lábil al calor, fue expresada en papa y estos tubérculos indujeron inmunización oral en ratones [52]. La expresión a altos niveles de un gen sintético que codifica para una enterotoxina generó protección en ratones [87]. Se ha obtenido un progreso importante con ensayos humanos usando antígenos de una toxina de *E. coli* lábil al calor (LT), lo que generó incrementos de cuatro veces en los niveles de anticuerpos en el suero capaces de neutralizar a esta toxina [89]. Se obtuvieron resultados similares usando antígenos del virus de la hepatitis B y antígenos del virus Norwalk [89]. Recientemente se aplicaron por vía oral epítopes del virus de la rabia producidos en plantas de espinaca a catorce personas voluntarias y ocho de ellas mostraron un incremento significativo en los anticuerpos específicos dirigidos contra este virus [128].

Las vacunas de humanos producidas en plantas son importantes en los países en desarrollo, donde los costos de producción son altos y el manejo de los programas de vacunación y la conservación de vacunas son un problema. El uso de frutas tropicales representa una opción alternativa por lo que se han hecho esfuerzos para expresar antígenos contra el agente causal de la malaria y contra rotavirus, en frutos de plantas transgénicas tropicales.

Cuando son crecidas en medios altos en carbono, *Alcaligenes eutrophus* y otras bacterias producen polihidroxialcanoatos como reservas de este elemento. Estos compuestos tienen propiedades que van desde plásticos quebradizos hasta materiales parecidos al caucho y debido a su biodegradabilidad representan una fuente alternativa de plásticos y elastómeros no contaminantes para usos especiales [105]. Las plantas se han explorado para producir plásticos biodegradables debido al alto costo de producción por fermentación bacteriana. La introducción de tres genes bacterianos en *Arabidopsis* generó plantas que acumularon polihidroxibutirato (PHB) hasta en un 14% de su peso seco sin mostrar problemas de fertilidad [96]. Esto abre la posibilidad para utilizar plantas y producir PHB a una escala comercial. Con el propósito de modificar las propiedades de las fibras de algodón se logró la producción de PHB en estas plantas y aunque las cantidades producidas de PHB son pequeñas (0.34% del peso de la fibra), se produce una característica de aislante mejorada que puede tener aplicaciones en ropa de invierno [86]. Los cambios positivos en las cualidades de las fibras demuestran el potencial de esta tecnología.

7. Plantas tolerantes a herbicidas

El control de las malezas que compiten por nutrientes y espacio con las plantas cultivadas es manejado con herbicidas que afectan la fotosíntesis o la biosíntesis de compuestos esenciales. Sin embargo, con frecuencia las plantas cultivadas no son tolerantes a herbicidas y esta estrategia no puede ser utilizada eficientemente, por lo que la producción de plantas transgénicas tolerantes a herbicidas consiste en una buena opción. El glifosato es un herbicida que inhibe la biosíntesis de aminoácidos aromáticos al inhibir a la enzima 5-enolpiruvilshikimato 3-fosfato sintasa (EPSPS). La expresión del alelo mutante *AroA* de *Salmonella typhimurium* produce una enzima EPSPS insensible al glifosato y la expresión de este alelo en plantas transformadas produjo tolerancia al glifosato en tabaco [20] y tomate [32]. La sobre expresión de la enzima normal EPSPS en plantas transformadas de *Petunia* también generó tolerancia a este herbicida [111]. Usando estas estrategias, se ha generado la tolerancia al glifosato en plantas de soya [100], canola, algodón y remolacha azucarera [12].

La fosfinotricina (PPT) es el compuesto activo de varios herbicidas e inhibe a la enzima glutamato sintasa (GS). El gen *bar* de *Streptomyces hygroscopicus* codifica una enzima detoxificante que acetila el grupo NH₂ libre de la PPT, y utilizando este gen se han producido plantas transformadas de tabaco, tomate y papa, tolerantes a herbicidas comerciales como Bialaphos y otros con PPT [25]. Las plantas transgénicas con tolerancia al herbicida glufosinato usando estas enzimas detoxificantes incluyen caña de azúcar, arroz, maíz, canola y algodón [12]. Recientemente el trigo fue transformado con el gen *bar*, lo que le confirió una resistencia agronómica al herbicida BASTA [93]. Además, se han producido plantas de canola resistentes tanto a glufosinato de amonio y glifosato [110]. Se han producido plantas de arroz tolerantes al herbicida bromoxinil y se encuentran disponibles en el mercado [23]. Otro gen, derivado de *Bacillus subtilis* y que codifica para una enzima protoporfirinógeno-oxidasa se ha utilizado para transformar plantas de arroz y conferirles resistencia al herbicida difenil-éter-oxifluorfenol [77].

V. Comercialización y bioseguridad

Los tomates de maduración lenta fueron las primeras plantas transgénicas en llegar al mercado en 1994 y en la actualidad se tienen plantas de varias especies que se producen comercialmente con tolerancia a herbicidas y resistencia a pestes (insectos y virus). El área cultivada de plantas transgénicas se incrementó de 1.7 millones de hectáreas en 1996 a 58 millones de hectáreas en el 2002, siendo USA, Argentina, Canadá y China los principales productores, con un 99% del área cultivada [65]. Los principales cultivos transgénicos cultivados fueron la soya, el maíz, el algodón, la canola, la papa, la calabacita y la papaya y los principales rasgos modificados que se encuentran en plantas de uso comercial son la tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos y resistencia a virus (Figura 4A). El cultivo transgénico dominante ha sido la soya tolerante a herbicidas, la cual en el 2002 se cultivó en 7 países (USA, Argentina, Canadá, México, Rumania, Uruguay y Sudáfrica). De manera global, la soya tolerante a herbicida se cultivó en 36.5 millones de hectáreas, lo que representó el 62% del área total cultivada por plantas transgénicas (58.7 millones de hectáreas). El segundo cultivo transgénico con mayor dominancia fue el maíz resistente a insectos, el cual se cultivó en 7.7 millones de hectáreas, equivalentes al 13% del área cultivada por transgénicos, y se cultivó en 7 países (USA, Canadá, Argentina, Sudáfrica, España, Alemania y Honduras). El tercer cultivo dominante fue la canola tolerante a herbicidas, la cual se cultivó en 3 millones de hectáreas, equivalentes al 5% del área global de transgénicos, y se cultivó en dos países, Canadá y USA. Otros 5 cultivos transgénicos ocuparon el 20% del área global cultivada de transgénicos y en orden descendiente de área cultivada fueron el maíz tolerante a herbicida con 2.5 millones de hectáreas, algodón resistente a insectos con 2.4 millones de hectáreas, algodón tolerante a herbicidas con 2.2 millones de hectáreas, algodón resistente a insectos y tolerante a herbicidas con 2.2 millones de hectáreas, maíz resistente a insectos y tolerante a herbicidas con 2.2 millones de hectáreas, papa resistente a insectos (< 0.1%), calabacita resistente a virus (< 0.1%) y papaya resistente a virus (< 0.1%).

Las tasas de adopción global de los 4 principales cultivos en los cuales la tecnología transgénica es utilizada (soya, algodón, canola y maíz), indicaron que en 2002 el 51% de los 72 millones de hectáreas de soya plantada globalmente fueron transgénicas (Figura 4B); de los 34 millones de hectáreas cultivadas con algodón el 20% fueron transgénicas. El área plantada con canola transgénica (3 millones de hectáreas) representó el 12% del total de canola cultivada (25 millones de hectáreas). Del maíz plantado en 2002, el 9% fue transgénico. Si las áreas globales (convencionales y transgénicas) de estos cuatro cultivos se agregan, entonces el área total es de 271 millones de hectáreas, de las cuales el 22% consistieron en cultivos genéticamente modificados, mientras que en el 2001 esta área representó el 19% [65]. Otro producto transgénico comercializado es el maíz que acumula la enzima tripsina en la semilla y es producido por la compañía Prodigene.

No obstante las campañas de grupos ecologistas en contra de las plantas transgénicas, la confianza en los beneficios de esta tecnología se encuentra en aumento entre los agricultores alrededor del mundo. Esto se refleja en el incremento continuo de las áreas globales en las cuales las plantas transgénicas son cultivadas y el aumento en el número de países en desarrollo en donde ese cultivan plantas transgénicas, incluyendo Argentina, México, India, China y Egipto. La transferencia de esta tecnología a países en desarrollo dependerá de la consolidación de instituciones nacionales existentes y la creación de nuevos institutos de investigación y compañías capaces de adaptar esta tecnología a las necesidades de los agricultores locales.

Un análisis de los riesgos y beneficios de las plantas transgénicas debe contemplar ensayos de campo donde las diversas variables ecológicas deben ser analizadas cuidadosamente. Los resultados de un estudio a largo plazo acerca del comportamiento de cuatro cultivos transgénicos (canola, papa, maíz y remolacha azucarera) crecidos en diferentes hábitats y analizados durante un periodo de 10 años, demostraron que en ningún caso las plantas genéticamente modificadas fueron más invasoras o más persistentes que sus contrapartes.

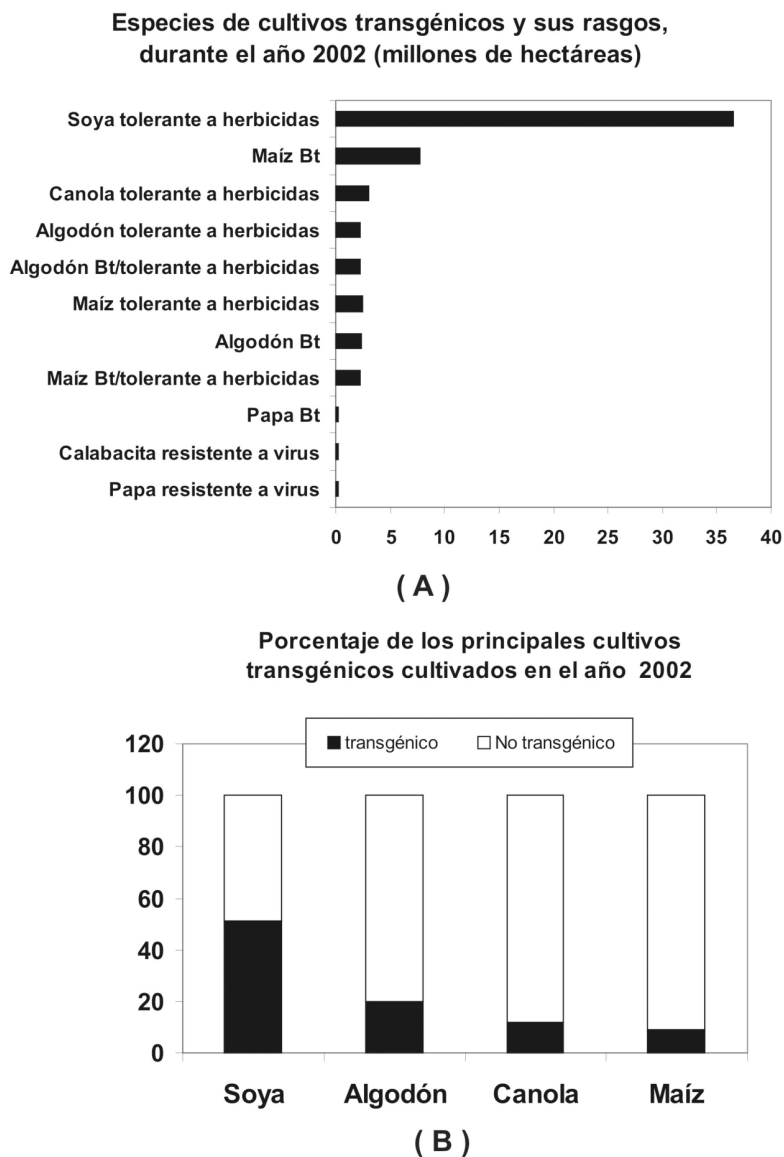


Figura 4. Principales plantas transgénicas cultivadas.

A) Área global de las principales especies cultivadas y sus fenotipos. B) Porcentajes de adopción global de los cuatro principales cultivos transgénicos (soya, algodón, canola y maíz), convencionales [21]. Se puede llegar a una conclusión errónea al extrapolar las condiciones del laboratorio al campo, como es el caso de los estudios de mariposas monarca, los cuales han generado una gran controversia [85, 113]. La inserción de transgenes en el genoma de los cloroplastos en lugar del genoma nuclear ha demostrado ser una estrategia efectiva para incrementar el nivel de tolerancia a herbicida [47] y resistencia a insectos [90] a la vez que se previene la transferencia del transgén a través del polen.

Se ha llegado a un consenso internacional acerca de los principios que permiten la evaluación de la seguridad de los alimentos provenientes de plantas genéticamente modificadas. Como una parte del marco de evaluación de seguridad se ha desarrollado el concepto de **equivalencia sustancial**, el cual se basa en la idea de que los alimentos existentes deben servir como una base para comparar las propiedades de los alimentos genéticamente modificados con su contraparte apropiada. La aplicación de este concepto no es una evaluación segura por sí misma, pero ayuda a identificar similitudes y diferencias entre los alimentos existentes y un nuevo producto, los cuales son sujetos a posteriores investigaciones toxicológicas. Como un ejemplo, está el caso de las proteínas Bt, en las que se han realizado varios estudios sobre la unión de esta proteína a los tejidos del tracto gastrointestinal de roedores y primates e incluso humanos, sin encontrar evidencia de la presencia de receptores específicos en estos organismos. Tampoco se tienen indicaciones de que las proteínas Bt tengan una homología en la secuencia de aminoácidos con proteínas de alimentos de tipo alergénico, así como tampoco se han identificado problemas de toxicidad [74].

VI. Perspectivas

La generación de nuevas variedades de plantas transgénicas ha dependido principalmente de dos factores: primero, el desarrollo de métodos de transformación para plantas cultivadas y segundo, el conocimiento de genes y sus funciones. Como se ha mencionado en la primera sección, existen actualmente protocolos de transformación disponibles para la mayoría de los cultivos importantes.

El conocimiento de la función de genes individuales en plantas ha avanzado inicialmente debido al análisis de genes individuales mediante el estudio de mutaciones. Recientemente el estudio de los genes se ha acelerado con la secuenciación de genomas completos. El genoma de *Arabidopsis thaliana* fue el primero en ser secuenciado para una planta y se encontró que consiste de 125 megabases y 25498 genes [121]. Las secuencias completas del arroz de las subespecies Indica y Japónica también han sido reportadas [135, 45] y consisten de 466 y 420 megabases, respectivamente. Se encontró que el 80.6% de los genes predichos para *Arabidopsis thaliana* tienen un homólogo en arroz, mientras que sólo el 49.4% de los genes predichos para arroz tienen un homólogo en *A. thaliana*. La proporción de genes implicados en las diferentes funciones celulares parecen ser los mismos en arroz y en *Arabidopsis*, lo que ha sido sugerido por un análisis de los factores de transcripción [45]. La secuencia del genoma de arroz como un cereal modelo ayudará a entender el genoma del maíz, que es más grande y complejo y el cual se encuentra actualmente en secuenciación.

Una vez que la información del genoma completo de un organismo se encuentra disponible, el siguiente paso es descifrar la función de todos los genes y la integración de estas funciones como un todo, mediante estrategias que han sido referidas como genómica funcional [45a]. Tradicionalmente, la expresión genética ha sido analizada mediante la abundancia del ARNm, pero sólo para uno o pocos genes a la vez. Con el conocimiento de la secuencia parcial de los genomas de plantas es ahora posible analizar simultáneamente la expresión de miles de genes o genomas completos (perfiles de expresión) bajo diferentes condiciones o a partir de diferentes tejidos, con el propósito de determinar cuáles genes están relacionados a cada proceso o condición y entender la actividad y los papeles biológicos de las proteínas codificadas por estos genes [81]. Este último logro ha sido posible mediante el reemplazamiento de la hibridación tradicional por micro arreglos de secuencias de ADN unidas a un soporte sólido mediante enlaces que permiten un buen acceso para la hibridación. Finalmente, el análisis de proteínas a gran escala ha comenzado y contribuirá al entendimiento de la función de los genes, a través de una micro caracterización, despliegue diferencial e interacciones proteína-proteína [101].

Con la llegada de la genómica funcional, el descubrimiento de nuevos genes y su función en los procesos de plantas, se abre la oportunidad de generar más plantas transgénicas, no solamente basadas en rasgos monogénicos sino en multigénicos. Las vías de transducción para la respuesta a patógenos no se encuentran completamente dilucidadas y su conocimiento será crucial en la lucha contra los patógenos mediante las plantas transgénicas. Considerando la gran cantidad de áreas no cultivadas debido a la alta salinidad y a la falta de agua, el entendimiento de las respuestas de las plantas a la sequía y a altas concentraciones salinas, así como el desarrollo de estrategias transgénicas, serán factores importantes para combatir estos problemas. No obstante el enorme potencial de la genómica funcional para incrementar la capacidad de generar nuevos rasgos manipulados genéticamente, incluyendo los cuantitativos, el futuro comercial de las plantas transgénicas es difícil de predecir. La genómica funcional permitirá identificar los componentes de los rasgos cuantitativos así como también alelos que confieran propiedades específicas para una especie de planta determinada, sin embargo, se cuestiona actualmente si la transferencia de genes por ingeniería genética de una especie vegetal a otra es aceptable. Además, las regulaciones estrictas, en términos de evaluar el impacto potencial de las plantas transgénicas en la salud de humanos y de animales y las consideraciones ambientales y de biodiversidad, han impuesto un costo muy alto a las compañías para cumplir los procesos reguladores y así poder liberar sus productos transgénicos para un uso comercial. Sin embargo, la tecnología de plantas transgénicas continuará y será esencial para el estudio de los procesos reguladores y del desarrollo que determinarán la productividad final de las plantas y entonces serán indispensables para generar estrategias de hibridación en plantas, nuevas y más eficientes.

Referencias

1. Abebe T., Guenzi A.C., Martin B., Cushman J.C. (2003) Tolerance of Mannitol-Accumulating Transgenic Wheat to Water Stress and Salinity. *Plant Physiol.* **131**: 1748-1755.
2. Alia, Hayashi H., Murata N. (1998) Enhancement of the tolerance of *Arabidopsis* to high temperatures by genetic engineering of the synthesis of glycinebetaine. *Plant J.* **16**: 155-162.
3. Altenbach S.B., Kuo C.C., Staraci L.C., Pearson K.W., Wainwrigth C., Georgescu A., Townsend, J. (1992) Accumulation of a brazil nut albumin in seeds of transgenic canola results in enhanced levels of seed protein methionine. *Plant Mol. Biol.* **18**: 235-245.
4. Altenbach S.B., Pearson K.W., Meeker G., Staraci L.C., Sun S.S.M. (1989). Enhancement of the methionine content of seed proteins by the expression of a chimeric gene encoding methionine-rich protein in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **13**: 513-522.
5. Apse M.P., Aarón G.S., Snedden W.S., Blumwald E. (1999) Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiport in *Arabidopsis*. *Science* **285**: 1256-1258.
6. Arakawa T., Chong D.K.X., Langridge W.H.R. (1998) Efficacy of a food plant-based oral cholera toxin B subunit vaccine. *Nat. Biotechnol.* **16**: 292-297.
7. Arakawa T., Chong D.K.X., Merrit J.L., Landgridge W.H.R. (1997) Expression of colera toxin B subunit oligomers in transgenic potato plants. *Transgenic Res.* **6**: 403-413.
8. Bar-Yosef B. (1991) The hidden half. *Plant roots*, (Waisel, Y., Eschel A., Kafkati, V. Eds.), 509-557. Marcel Dekker New York.
9. Bennett L.E., Burkhead J.L., Hale K.L., Terry N., Pilon M., Pilon-Smits E.A. (2003) Analysis of transgenic Indian mustard plants for phytoremediation of metal-contaminated mine tailings. *J Environ. Qual.* **32**: 432-40.
10. Binns A., Campbell A. (2001) *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of plant cells. *Encyclopedia of Life Sciences. Nature Pub. Group.* Pp 1-6.
11. Boothe J.G., Parmenter D.L., Saponja J.A. (1997) Molecular farming in plants: oilseeds as vehicles for the production of pharmaceutical proteins. *Drug Develop. Res.* **42**: 172-181.
12. Briggs S.P., Koziel M. (1998) Engineering new plant strains for commercial markets. *Curr. Opin. Biotechnol.* **9**: 233-235.
13. Brummell D.A., Harpster M.H. (2001) Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant Mol. Biol.* **47**: 311-40.
14. Bundock P., den Dulk-Ras A. Beijersbergen A., Hooykaas P. (1995) Trans-Kingdom T-DNA transfer from *Agrobacterium tumefaciens* to *Saccharomyces cerevisiae* *EMBO J.* **14**: 3206-3214.

15. Burgess E.P., Malone L.A., Christeller J.T., Lester M.T., Murray C., Philip B.A., Phung M.M., Tregidga E.L. (2002) Avidin expressed in transgenic tobacco leaves confers resistance to two noctuid pests, *Helicoverpa armigera* and *Spodoptera litura*. *Transgenic Res.* **2**: 199-214.
16. Chakraborty S., Chakraborty N., Datta A. (2000) Increased nutritive value of transgenic potato by expressing a nonallergenic seed albumin gene from *Amaranthus hypochondriacus*. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **97**: 3724-3729.
17. Chaney R.L., Malik M., Li Y.M., Brown S.L., Brewer E.P., Angle J.S., Baker A.J. (1997) Phytoremediation of soil metals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **8**: 279-284.
18. Chilton M.D. (2001) Agrobacterium. A memoir. *Plant Physiol.* **125**: 9-14.
19. Chilton M.D., Drummond M.H., Merlo D.J., Sciaky D., Montoya A.L., Gordon M.P., Nester E.W. (1977) Stable incorporation of plasmid DNA into higher plant cells: the molecular basis of crown gall tumorigenesis *Cell* **11**: 263-271.
20. Comai L., Facciotti D., Hiatt W.R., Thompson G., Rose R.E., Stalker D.M. (1985) Expression in plants of a mutant *aroA* gene from *Salmonella typhimurium* confers tolerance to glyphosate. *Nature* **317**: 741-745.
21. Crawley M.J., Brown S.L., Hails R.S., Kohn D.D., Rees M. (2001) Transgenic crops in natural habits. *Nature* **409**: 682-683.
22. Crouzet P., Hohn B. (2002) Transgenic plants. *Encyclopedia of Life Sciences. Nature Publishing Group.* Pp 1-7.
23. Culpepper A.S., York A.C. (1997) Weed management in no-tillage bromoxynil-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum*). *Weed Technol.* **11**: 335-345
24. Daniell H., Streatfield S.J., Wycoff K. (2001) Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends Plant Sci.* **6**: 219-226.
25. De Block M., Botterman J., Vandewiele M., Dockx J., Thoen C., Gosselé V., Movva N.R., Thompson C., Van Montagu M., Leemans J. (1987) Engineering herbicide resistance in plants by expression of a detoxifying enzyme. *EMBO J.* **6**: 2513-2518.
26. De Block M., Herrera-Estrella L., Van Montagu M., Schell J., Zambryski P. (1984) Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. *EMBO J.* **3**: 1681-1689.
27. De la Fuente J.M., Mosqueda-Cano G., Alvarez-Morales A., Herrera-Estrella L. (1992) Expression of a bacterial phaseolotoxin-resistant ornithyl transcarbamylase in transgenic tobacco confers resistance to *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*. *Bio/Technology* **10**: 905-909.
28. De la Fuente J.M., Ramírez-Rodríguez B., Cabrera-Ponce J.L., Herrera-Estrella L. (1997) Aluminum tolerance in transgenic plants by alteration of citrate synthesis. *Science* **276**: 1566-1568.
29. Ehsani P., Khabiri A., Domansky N.N. (1997) Polypeptides of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Gene* **190**: 107-111.
30. Estruch J.J., Carozzi N.B., Desai N., Duck N.B., Warren G.W., Koziel M. (1997) Transgenic plants: An emerging approach to pest control. *Nat. Biotechnol.* **15**: 137-141.
31. Falco S.C., Guida T., Locke M., Mauvais J., Sanders C., Ward R.T., Webber P. (1995) Transgenic canola and soybean seeds with increased lysine. *Bio/Technology* **13**: 577-582.
32. Fillatti J.J., Kiser J., Rose R., Comai L. (1987) Efficient transfer of a glyphosate tolerance gene into tomato using a binary *Agrobacterium tumefaciens* vector. *Bio/Technology* **5**: 726-730.
33. Fischhoff D.A., Bowditch K.S., Perlack F.J., Marrone P.G., McCormick S.M., Niedermeyer J.G., Dean D.A., Kusano Kretzmer K., Mayer E.J., Rochester D.E., Rogers S.G., Fraley R.T. (1987) Insect tolerant transgenic tomato plants. *Bio/Technology* **5**: 807-813.
34. Fitch J.H., Beachy R.N. (1993) Genetically engineered protection against viruses in transgenic plants. *Annu. Rev. Microbiol.* **47**: 739-763.
35. Fraser P.D., Romer S., Shipton C.A., Mills P.B., Kiano J.W., Misawa N., Drake R.G., Schuch W., Bramley P.M. (2002) Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **99**: 1092-1097.
36. Fraley R.T., Rogers S.G., Horsch R.B., Sanders P.R., Flick J.S., Adams S.P., Bittner M.L., Brand L.A., Fink C.L., Fry J.S., Galluppi G.R., Goldberg S.B., Hoffmann N.L., Woo S.C. (1983) Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **80**: 4803-4807.
37. Fromm M.E., Taylor L.P., Walbot V. (1986) Stable transformation of maize after gene transfer by electroporation. *Nature* **319**: 791-793.
38. Galtier N., Foyer C.H., Huber J., Voelker T.A., Huber S.C. (1993) Effects of Elevated Sucrose-Phosphate Synthase Activity on Photosynthesis, Assimilate Partitioning, and Growth in Tomato (*Lycopersicon esculentum* var UC82B). *Plant Physiol.* **101**: 535-543.
39. Garg A.K., Kim J.K., Owens T.G., Ranwala A.P., Choi Y.D., Kochian L.V., Wu R.J. (2002) Trehalose accumulation in rice plants confers high tolerance levels to different abiotic stresses. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* **99**: 15898-15903.
40. Giddings G., Allison G., Brooks D., Carter A.. (2000) Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals. *Nat. Biotechnol.* **18**: 1151-1155.

41. Gidoni D., Fuss E., Burbidge A., Speckmann G.J., James S., Nijkamp D., Mett A., Feiler J., Smoker M., de Vroomen M.J., Leader D., Liharska T., Groenendijk J., Coppoolse E., Smith J.J., Levin I., de Both M., Schuch W., Jones J.D., Taylor I.B., Theres K., van Haaren M.J. (2003) Multi-functional T-DNA/Ds tomato lines designed for gene cloning and molecular and physical dissection of the tomato genome. *Plant Mol. Biol.* **51**: 8-98.
43. Gisbert C., Ros R., De Haro A., Walker D.J., Pilar-Bernal M., Serrano R., Navarro-Avino J. (2003) A plant genetically modified that accumulates Pb is especially promising for phytoremediation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **303**: 440-445.
44. Goddijn O.J.M., Pen J. (1995) Plants as bioreactors. *Trends Biotechnol.* **13**: 379-387.
45. Goff S.A. et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science* **296**: 92-100.
- 45a. Goga O., Tilghman S.M. (2000) Exploring genome space. *Nature* **405**: 820-822.
46. Gonsalves D., Ferreira S., Manshart R., Fitch M., Slightom J. (2000) Transgenic virus resistant papaya: New hope for controlling papaya ringspot virus in Hawaii. *Plant Health Progress*, [online] doi : 10.1094/PhP-2000-0621-01-RV.
47. Gray A.J., Raybould A.F. (1998) Reducing transgene escape routes. *Nature* **392**: 653-654.
48. Gutiérrez-Campos R., Torres-Acosta J.A., Saucedo-Arias L.J., Gómez-Lim M.A. (1999) The use of cysteine proteinase inhibitors to engineer resistance against potyviruses in transgenic tobacco plants. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1223-1226.
49. Gutiérrez-Mora, A., Santacruz-Ruvalcaba F., Cabrera-Ponce J.L., Rodríguez-Garay B. (2003) Mejoramiento genético vegetal *in vitro*. e-Gnosis, [online] **1**: 4. www.e-gnosis.udg.mx/vol1/art4
50. Hamilton C.M., Frary A., Lewis C., Tanksley S.D. (1996) Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 997-9979.
51. Hansen G., Wright M.S. (1999) Recent advances in the transformation of plants. *Trends Plant Sci.* **4**: 226-231.
52. Haq T.A., Mason H.S., Clements J.D., Arntzen Ch.J. (1995) Oral immunization with a recombinant bacterial antigen produced in transgenic plants. *Science* **268**: 714-715.
53. Haseloff J., Siemering K.R., Prasher D.C., Hodge S. (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **94**: 2122-2127.
54. Hausler R.E., Rademacher T., Li J., Lipka V., Fischer K.L., Schubert S., Kreuzaler F., Hirsch H.J. (2001) Single and double overexpression of C(4)-cycle genes had differential effects on the pattern of endogenous enzymes, attenuation of photorespiration and on contents of UV protectants in transgenic potato and tobacco plants. *J. Exp. Bot.* **52**: 1785-1803.
55. Hayashi H., Alia, Mustardy L., Deshniem P., Ida M., Murata N. (1997) Transformation of *Arabidopsis thaliana* with the *codA* gene for choline oxidase; accumulation of glycinebetaine and enhanced tolerance to salt and cold stress. *Plant J.* **12**: 133-142.
56. Hein M.B., Yeo T.C., Wang F., Sturtevant A. (1995) Expression of colera toxin subunits in plants. *Ann NY Acad Sci* **792**: 50
57. Herrera-Estrella L. (1999) Transgenic plants for tropical regions: Some considerations about their development and their transfer to the small farmer. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **96**: 5978-5981.
58. Herrera-Estrella L. (2000) Genetically modified crops and developing countries. *Plant Physiol.* **124**: 923-925.
59. Herrera-Estrella L., De Block M., Messens E., Hernalsteens H.P., Van Montagu M., Schell J. (1983a) Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. *EMBO J.* **2**: 987-995.
60. Herrera-Estrella L., Depicker A., Van Montagu M., Schell J. (1983b) Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti- plasmid-derived vector. *Nature* **303**: 209-213.
61. Holmberg N., Bülow L. (1998) Improving stress tolerance in plants by gene transfer. *Trends Plant Sci.* **3**: 61-66.
62. Holström K.O., Mäntylä E., Wellin B., Mandal A., Palva T., Tunnela O.E., Londesborough J. (1996) Drought tolerance in tobacco. *Nature* **379**: 683-684.
63. Hsieh T.H., Lee J.T., Charng Y.Y., Chan M.T. (2002) Tomato Plants Ectopically Expressing *Arabidopsis* CBF1 Show Enhanced Resistance to Water Deficit Stress. *Plant Physiol.* **130**: 618--626.
64. Jaglo K.R., Kleff S., Amundsen K.L., Zhang X., Haake V., Zhang J.Z., Deits T., Thomashow M.F. (2001) Components of the *Arabidopsis* C-Repeat/Dehydration- responsive element binding factor cold-response pathway are conserved in *Brassica napus* and other plant species. *Plant Physiol.* **127**: 910-917.
65. James C. (2002) Global status of commercialized transgenic crops: 2002. *ISAAA Briefs No. 23:Preview*. ISAAA:Ithaca, NY.
66. Jeon J.S., Lee S., Jung K.H., Jun S.H., Jeong D.H., Lee J., Kim C., Jang S., Yang K., Nam J., An K., Han M.J., Sung R.J., Choi H.S., Yu J.H., Choi J.H., Cho S.Y., Cha S.S., Kim S.I., An G. (2000) T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice. *Plant J.* **22**: 561-570.
67. Kasuga M., Liu Q., Miura S., Yamaguchi-Shinozak K., Shinokazi K. (1999) Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat. Biotechnol.* **17**: 287-291.
- 67a. Keeler S.J., Maloney C.L., Webber P.Y., Patterson C., Hirata L.T., Falco S.C., Rice J.A. (1997) Expression of the novo high-lysine alpha-helical coiled-coil proteins may significantly increase the accumulated levels of lysine in mature seeds of transgenic tobacco plants. *Plant Mol. Biol.* **34**: 15-29.
68. Kohli A., Leech M., Vain P., Laurie D.A., Christou P. (1998) Transgene organization in rice engineered through direct DNA transfer supports a two fase integration mechanism mediated by the establishment of integration hot spots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **95**: 7203-7208.

69. Kong Q., Richter L., Yang Y.F., Arntzen C.J., Mason H.S., Thanavala Y. (2001) Oral immunization with hepatitis B surface antigen expressed in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **98**: 11539-11544.
70. Koyama H., Takita E., Kawamura A., Hara T., Shibata D. (1999) Over expression of mitochondrial citrate synthase gene improves the growth of carrot cells in Al-phosphate medium. *Plant Cell Physiol.* **40**: 482-488.
71. Koziel M.G., Beland G.L., Bowman C., Carozzi N.B., Crenshaw R., Crossland L., Dawson J., Desai N., Hill M., Kadwell S., Launis K., Lewis K., Maddox D., McPearson K., Meghji M., Merlin E., Rhodes R., Warren G.W., Wright M., Evola S.V. (1993) Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology* **11**: 194-200.
72. Kramer K.J., Morgan T.D., Throne J.E., Dowell F.E., Bailey M., Howard J.A. (2000) Transgenic avidin maize is resistant to storage insect pests. *Nat. Biotechnol.* **18**: 670-674.
73. Ku M.S., Cho D., Li X., Jiao D.M., Pinto M., Miyao M., Matsuoka M. (2001) Introduction of genes encoding C4 photosynthesis enzymes into rice plants: physiological consequences. *Rice Biotechnology: Improving yield, stress, tolerance and grain quality* **236**: 100-116.
74. Kuiper H.A., Kleter G.A., Noteborn H., Kok J.K. (2001) Assessment of the food safety issues related to genetically modified foods. *Plant J.* **27**: 505-528.
75. Lamphear B.J., Streatfield S.J., Jilka J.M., Brooks C.A., Barker D.K., Turner D.D., Delaney D.E., Garcia M., Wiggins B., Woodard S.L., Hood E.E., Tizard I.R., Lawhorn B., Howard J.A. (2002) Delivery of subunit vaccines in maize seed. *J. Control Release* **85**: 169-80.
76. Larrick J.W., Thomas D.W. (2001) Producing proteins in transgenic plants and animals. *Curr. Opin. Biotechnol.* **12**: 411-418.
77. Lee H.J., Lee S.B., Chung J.S., Han S.U., Han O., Guh J.O., Jeon J.S., An G., Back K. (2000) Transgenic rice plants expressing a *Bacillus subtilis* protoporphyrinogen oxidase gene are resistant to diphenyl ether herbicide oxyfluorfen. *Plant Cell Physiol.* **41**: 743-749.
78. Lee J.A. (1998). The calcicole-calcifuge problem revisited. *Adv. Bot. Res.* **29**: 2-30.
79. Lilley C.J., Devlin P., Urwin P.E., Atkinson H.J. (1999) Parasitic nematodes, proteinases and transgenic plants. *Parasit. Today* **15**: 414-417.
80. Lillus G., Bülow L. (1996) Enhanced NaCl stress tolerance in transgenic tobacco expressing bacterial choline dehydrogenase. *Bio/Technology* **14**: 177-180.
81. Lockhart D.J., Winzler E. (2000) Genomics, gene expression and DNA arrays. *Nature* **405**: 827-836.
82. Lomonosoff G.P. (1995) Pathogen-derived resistance to plant viruses. *Annu. Rev. Phytopathol.* **33**: 323-343.
83. López-Bucio J., Guevara-García A., Ramírez-Rodríguez V., Nieto M.F., De la Fuente J.M., Herrera-Estrella L. (2000a) Agriculture for marginal lands: plants toward the third millenium. *Plant Genetic Engineering: Towards the Third Millenium*, (Arencibia, A.D., Ed.), 159-170. Elsevier, London and New York.
84. López-Bucio J., Martínez-De la Vega O., Guevara-García A., Herrera-Estrella L. (2000b) Enhanced phosphorous uptake in transgenic tobacco plants that overproduce citrate. *Nature Biotechnol.* **18**: 450-453.
85. Losey J.E., Rayor L.S., Carter M.E. (1999) Transgenic pollen harms monarch larvae. *Nature* **399**: 214.
- 85a. Ma J., Hiatt A., Hein M., Vine M.D., Wang F., Stabila P., van Dolleweerd C., Mostov K., Lehner T. (1995) Generation and assembly of secretory antibodies in plants. *Science* **268**: 716-719.
86. Maliyakal E.J., Keller G. (1996) Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **93**: 12768-12773.
87. Mason H.S., Haq T.A., Clements J.D. (1998) Edible vaccine protects mice against *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin (LT): potatoes expressing a synthetic *LT-B* gene. *Vaccine* **16**: 1336-1343.
88. Mason H.S., Lam D.M., Arntzen C.J. (1992) Expression of hepatitis B surface antigen in transgenic plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **89**: 11745-11749.
89. Mason H.S., Warzecha H., Mor T., Arntzen C.J. (2002) Edible plant vaccines: applications for prophylactic and therapeutic molecular medicine. *Trends Mol. Med.* **8**: 324-229.
90. McBride K.E., Svab Z., Schaaf D.J., Hogan P.S., Stalker D.M., Maliga P. (1995) Amplification of a chimeric *Bacillus* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technology* **13**: 362-365.
91. McGarvey P.B., Hammond J., Dienelt M.M., Hooper D.C., Fu Z.F., Dietzschold B., Kiprowski H., Michaels F.H. (1995) Expression of the rabies virus glycoprotein in transgenic tomatoes. *Bio/Technology* **13**: 1484-1487.
92. Meinke D.W., Cherry M., Dean C., Rounsley S.D., Koornneek M. (1998) *Arabidopsis thaliana*: A model plant for genome analysis. *Science* **282**: 662-682.
93. Melchiorre M.N., Lascano H.R., Trippi V.S. (2002) Transgenic wheat plants resistant to herbicide BASTA obtained by microprojectile bombardment. *Biocell* **26**: 217-223.
94. Molving L., Tabe L.M., Eggum B.O., Moore A.E., Craig S., Spencer D., Higgins T.J. (1997) Enhanced methionine levels and increased nutritive value of seeds of transgenic lupinus (*Lupinus angustifolius* L.) expressing a sunflower seed albumin gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **94**: 8393-8398.

95. Murphy D.J. (1999) Production of novel oils in plants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **10**: 175-180.
96. Nawrath C., Poirier Y., Somerville C. (1994) Targeting of the polyhydroxybutyrate biosynthetic pathway to the plastids of *Arabidopsis thaliana* results in high levels of polymer accumulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **91**: 12760-12764.
97. Ogita S., Uefuji H., Yamaguchi Y., Koizumi N., Sano H. (2003) Producing decaffeinated coffee plants. *Nature* **423**: 823-824.
98. Ohta M., Hayashi Y., Nakashima A., Hamada A., Tanaka A., Nakamura T., Hayakawa T. (2002) Introduction of a Na⁺/H⁺ antiporter gene from *Atriplex gmelini* confers salt tolerance to rice. *FEBS Lett.* **532**: 279-282.
99. Ostlie K. (2001) Crafting crop resistance to corn rootworms. *Nat. Biotechnol.* **19**: 624-625.
100. Padgett S.R., Taylor N.B., Nida D.L., Bailey M.R. MacDonald J., Holden L.R., Fuchs R.L. (1996) The composition of glyphosate-tolerant soybean seeds is equivalent to that of conventional soybeans. *J.Nutr.* **126**: 702-716.
101. Pandey A., Mann M. (2000) Proteomics to study genes and genomes. *Nature* **405**: 837-846.
102. Peferoen M. (1997) Progress and prospects for field use of *Bt* genes in crops. *Trends Biotechnol.* **15**: 173-177.
103. Perlack F.J., Stone T.B., Muskopf Y.M., Peterson L.J., Parker G.B., McPherson S.L. Wyman J., Love S., Reed G., Biever G., Fischhoff D.A. (1993) Genetically improved potatoes: protection from damage by Colorado potato beetles. *Plant Mol. Biol.* **22**: 313-321.
104. Perlack F.J., Deaton R.W., Armstrong T.A., Fuchs R.L., Sims S.R., Greenplate J.T., Fischhoff D.A. (1990) Insect resistant cotton plants. *Bio/Technology* **8**: 939-943.
105. Poirier Y., Nawrath Ch., Somerville Ch. (1995) Production of polyhydroxyalkanoates, a family of biodegradable plastics and elastomers, in bacteria and plants. *Bio/Technology* **13**: 142-150.
106. Powell A.P., Nelson R.S., Barun D., Hoffman N., Rogers S.G., Fraley R.T., Beachy R.N. (1986) Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* **232**: 738-743.
107. Rugh C.L., Wilde H.D., Stack N.M., Thompson D.M., Summers A.O., Meagher R.B. (1996) Mercuric ion reduction and resistance in transgenic *Arabidopsis thaliana* plants expressing a modified bacterial *merA* gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 3182-3187.
108. Sanford J.C. (1988) The biolistic process. *Trends Biotechnol.* **6**: 299-302.
109. Schuler T.H., Poppy G.M., Kerry B.R., Delhom I. (1998) Insect-resistant transgenic plants. *Trends Biotechnol.* **16**: 168-175.
110. Senior I.J., Moyes C., Dale P.J. (2002) Herbicide sensitivity of transgenic multiple herbicide-tolerant oilseed rape. *Pest Manag. Sci.* **58**: 405-412.
111. Shah D.M., Horsch R.B., Klee H.J., Kishore G.M., Winter J.A., Tumer N.E., Hironaka C.M., Sanders P.R., Gasser C.S., Aykent S., Siegel N.R., Rogers S.G., Fraley R.T. (1986) Engineering herbicide tolerance in transgenic plants. *Science* **233**: 478-481.
112. Shah D.M., Rommens C.M., Beachy R.N. (1995) Resistance to diseases and insects in transgenic plants: progress and applications to agriculture. *Trends Biotechnol.* **13**: 362-368.
113. Shelton A.M., Sears M.K. (2001) The monarch butterfly controversy: scientific Interpretations of a phenomenon. *Plant J.* **27**: 483-488.
114. Smith C.J., Watson C.F., Morris P.C., Bird C.R., Seymour G.B., Gray J.E., Arnold C., Tucker G.A., Schuch W., Harding S. (1990) Inheritance and effect on ripening of antisense polygalacturonase genes in transgenic tomatoes. *Plant Mol. Biol.* **14**: 369-79.
115. Song W.Y., Wang G., Chen L., Kim H., Pi L.Y., Holsten T., Gardner J., Wang B., Zha W., Zhu L., Fauquet C., Ronald P.A. (1995) A receptor kinase-like protein encoded by the rice disease resistant gene *Xa21*. *Science* **270**: 1804-1806.
116. Staub J.M., García B., Graves J., Hajdukiewicz P., Hunter P., Nehra N., Paradkar V., Schittler M., Carroll J.A., Spatola L., Ward D., Ye G., Russell D.A. (2000) High-yield production of a human therapeutic protein in tobacco chloroplasts. *Nat. Biotechnol.* **18**: 333-338.
117. Stewart C.N., Adang M.J., All J.N., Ramachandran S., Parrot W.A. (1996a) Insect control and dosage effect in transgenic canola containing a synthetic *Bacillus thuringiensis cryAc* gene. *Plant Physiol.* **112**: 115-120.
118. Stewart C.N., Adang M.J., All J.N., Ramachandran S., Parrot W.A. (1996b) Genetic transformation, recovery and characterization of fertile soybean transgenic for a synthetic *Bacillus thuringiensis cryIac* gene. *Plant Physiol.* **112**: 121-129.
119. Tang K., Sun X., Hu Q., Wu A., Lin C., Lin H., Twyman R.M., Christou P., Feng T. (2001) Transgenic rice plants expressing the ferredoxin-like protein (AP1) from sweet pepper show enhanced resistance to *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Plant Sci.* **160**: 1035-1042.
120. Tennant P.F., Gonsalves C., Ling K.S., Fitch M., Manshardt R., Slightom J.L., Gonsalves D. (1994) Differential protection against papaya ringspot virus isolates in coat protein gene transgenic papaya and classically cross-protected papaya. *Phytopathol.* **84**: 1359-1366.
121. The *Arabidopsis* Genome Initiative. (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* **408**: 796-815.

122. Thomas J.C., Sepahi M., Arendall B., Bonhert H.J. (1995) Enhancement of seed germination in high salinity by engineering mannitol expression in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ.* **18**: 801-806.
123. Trieu A.T., Burleigh S.H., Kardailsky I.V., Maldonado-Mendoza I.E., Versaw W.K., Blaylock L.A., Shin H., Chiou T.J., Katagi H., Dewbre G.R., Weigel D., Harrison M.J. (2000) Transformation of *Medicago truncatula* via infiltration of seedlings or flowering plants with *Agrobacterium*. *Plant J.* **22**: 531-541.
124. Tu J., Zhang G., Datta K., Xu C., He Y., Zhang Q., Krush G.S., Datta S.K. (2000) Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* δ -endotoxin. *Nat. Biotechnol.* **18**: 1101-1104.
125. Tyler G., Ström L. (1995) Differing organic acid exudation patterns explain calcifuge and acidifuge behavior of plants. *Ann. Bot.* **75**: 75-78.
126. Vaeck M., Reynaerts A., Höfte H., Jansens S., De Beuckeleer M., Dean C., Zabeau M., Van Montagu M., Leemans J. (1987) Transgenic plants protected from insect attack. *Nature* **382**: 33-37.
127. Vázquez-Padrón R.I. (2000) Insect-resistant tropical plants and new assessment about Cry proteins. *Plant genetic engineering: Towards the third millennium*, (Arencebia A.D., Ed.), 96-99 Elsevier, London and New York.
128. Walmsley A.M., Arntzen C.J. (2003) Plant cell factories and mucosal vaccines. *Curr. Opin. Biotechnol.* **14**: 145-150.
129. Wang H.Z., Zhao P.J., Xu J.C., Zhao H., Zhang H.S. (2003) Virus resistance in transgenic watermelon plants containing a WMV-2 coat protein gene. *Yi Chuan Xue Bao.* **30**: 70-75.
130. Wilmink A., Dons J.J.M. (1993) Selective agents and marker genes for use in transformation of monocotyledonous plants. *Plant Mol. Biol. Rep.* **11**: 165-185.
131. Woodard S.L., Mayor J.M., Bailey M.R., Barker D.K., Love R.T., Lane J.R., Delaney D.E., McComas-Wagner J.M., Mallubhotla H.D., Hood E.E., Dangott L.J., Tichy S.E., Howard J.A. (2003) Maize-derived bovine trypsin: Characterization of the first large-scale, commercial product from transgenic plants. *Biotechnol. Appl Biochem.* [online] doi:10.1042/BA20030026.
132. Worrell A.C., Bruneau J.M., Summerfelt K., Boersig M., Voelker T.A. (1991) Expression of a maize sucrose phosphate synthase in tomato alters leaf carbohydrate partitioning. *Plant Cell* **10**: 1121-1130.
133. Wün J., Klöti A., Burkhardt P.K., Gadab C., Biswas G., Launis K., Iglesias V.A., Potrykus I. (1996) Transgenic *Indica* rice breeding line IR58 expressing a synthetic *cryIA(b)* gene from *Bacillus thuringiensis* provides effective insect pest control. *Bio/Technology* **14**: 171-176.
134. Ye X., Al-Babili S., Klöti A., Zhang J., Lucca P., Beyer P., Potrykus I. (2000) Engineering the provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science* **287**: 303-305.
135. Yu J. et al. (2002) A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science* **296**:79-92.
136. Zaenen I., Van Larebeke N., Teuchy H., Van Montagu M., Schell J. (1974) Supercoiled circular DNA in crown-gall inducing *Agrobacterium* strains *J. Mol. Biol.* **86**: 109-127.
137. Zhang H.X., Blumwald E. (2001) Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nat. Biotechnol.* **19**: 765-768.
138. Zhang L., Xu J., Birch R. (1999) Engineered detoxification confers resistance against a pathogenic bacterium. *Nat. Biotechnol.* **17**: 1021-1024.
139. Zhang S., Song W.Y., Chen L., Ruan D., Taylor N., Ronald P., Beachy R., Fauquet C. (1998) Transgenic elite *Indica* rice varieties resistant to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Mol. Breed.* **4**: 551-558.