Journal de Ciencia e Ingeniería

Journal de Ciencia e Ingeniería, Vol.4, No.1, Agosto de 2012, pp. 17 - 26
Revisión - Monografía

Fundamentos Teóricos de la Transformación en Células Vegetales

Theoretical Foundations of Transformation in Plant Cells

Ricardo Espinosa Silva [a]

[a] *Instituto de Física de Líquidos y Sistemas Biológicos (IFLYSIB), CONICET, Universidad Nacional de la Plata, 59 -789, B1900. La plata, Argentina.*

Recibido: 10/01/2012; revisado: 27/02/2012; aceptado: 30/07/2012.

Resumen

La transformación genética es un método que en las ultimas décadas ha logrado una importancia y aplicación relevante en muchos sectores que competen a la biotecnología e ingeniería genética. Este método tiene por fundamento la inclusión de ADN foráneo al organismo de interés a transformar y dicho proceso de inclusión puede ser por medio de técnicas fisicoquímicas o biológicas, donde esta última utiliza las características de transformación que evolutivamente han desarrollado otros organismos y así lograr el mejoramiento de plantas, aumentando sus niveles de producción, mejorando sus valores nutritivos o actuando como bioreactores de proteínas, vitaminas, vacunas y anticuerpos.

En esta revisión se prentende dar a conocer los métodos de transformación más utilizados en platas, haciendo una importante relevancia en el mecanismo de transferencia de ADN por Agrobacterium tumefaciens, como los mecanismos químicos de interacción y reconocimiento celular, actividad virulenta del proceso, caracterización del reconocimiento y transferencia de los complejos proteína-proteína y proteína-ADN por el sistema de genes virulentos Vir.

***Palabras Claves*:** Agrobacterium Tumefaciens, Genes Vir, Transformación.

Abstract

Genetic transformation is a method that in the last few decades has achieved an important and relevant application in many sectors which are pertinent to the biotechnology and genetic engineering.This method is based on the inclusion of exogenous DNA to the agency of interest to transform and this process of inclusion can be through physico-chemical or biological techniques, where the latter uses the features of transformation that evolutionarily have developed other agencies to achieve the improvement of plants, increasing their levels of production, improving their nutritional values or acting as bioreactors of proteins, vitamins, vaccines and antibodies.

In this review is seeking to publicize the processing methods used in more silverware, making an important relevance in the mechanism of transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens, such as the chemical mechanisms of cellular recognition and interaction, activity of the virulent process, characterization of the recognition and transfer of complex protein-protein and protein-DNA by the system of virulent genes Vir.

***Keywords*:** Agrobacterium Tumefaciens, Genes Vir, Transformation.

1. Introducción

Como es bien sabido la biotecnología conjuga una serie de técnicas y procesos que permiten la utilización de la materia viva o sus componentes para generar bienes y servicios. Los procesos y las técnicas biotecnológicas han sufrido cambios a través del tiempo estableciéndose técnicas de ADN recombinante o ingeniería genética que permiten introducir y expresar genes entre organismos no emparentados filogenéticamente, lo que ha permitido burlar las barreras reproductivas establecidas por la evolución [5].

La transformación de un organismo requiere el transporte e inserción del ADN foráneo en su genoma. En la actualidad existe una gran variedad de métodos disponibles de transporte e inserción de ADN en plantas que permiten que la transformación celular no represente un obstáculo [1].

En los últimos años se ha observado un incremento en la mejora de vectores de transformación aumentando las metodologías eficaces de expresión de transgenes en plantas, donde uno de los mejores sistemas de transformación e integración de transgenes es el llevado acabo por el plásmido Ti de Agrobacterium tumefaciens, ya que este presenta un sistema de integración natural que lo diferencia de otros métodos de transformación que ocasionan daño en la célula como por ejemplo la biobalística, o que requieran la remoción total de la pared celular, protoplastos, y no aseguran una interacción fiel del inserto en el genoma de la planta [2,44].

Así mismo, los métodos de transformación son muy importantes en el ámbito económico ya que permiten el mejoramiento de plantas aumentando sus niveles de producción, mejorando sus valores nutritivos o actuando como bioreactores de proteínas, vitaminas, vacunas y anticuerpos [5,14]. En esta revisión se pretende dar a conocer los mecanismos de transformación vegetal más representativos y utilizados en la actualidad.

2. Métodos de Transformación en Plantas

Gracias a la Ingeniería Genética de plantas se han creado plantas transgénicas a las que se les ha podido introducir ADN foráneo (Exógeno) que puede ser no sólo de origen vegetal, también de origen animal o de microorganismos. La obtención de plantas transgénicas depende de la introducción (normalmente en cultivos de tejidos) de ADN foráneo en su genoma, seguido de la regeneración de la planta completa y la subsiguiente expresión de los genes introducidos (transgenes) [17].

Normalmente, para que un transgén pueda funcionar en la planta, hay que efectuar in Vitro una "construcción genética artificial", para lo cual se utiliza un promotor de transcripción que se suele colocar justo antes de la parte codificadora de interés. Podemos incluso escoger los promotores según nuestro interés, algunos de ellos inducen la expresión en casi todos los tejidos de la planta, de forma continua (promotor constitutivo); en cambio, otros logran que el transgén se exprese sólo en determinados órganos o tejidos, o bajo el efecto inductor de alguna sustancia química (promotor inducible) [3,16].

2.1. *Transformación por Agrobacterium Tumefaciens*

Uno de los métodos más empleados para la transgénesis es el uso de vectores genéticos derivados de una bacteria del suelo denominada Agrobacterium tumefaciens, que permite transportar la construcción genética de interés al genoma de la planta que se pretende mejorar [13,30].

A. tumefaciens es una bacteria gram-negativa patógena de plantas que pertenece a las α- proteobacterias, capaz de producir un tumor conocido como *agalla de cuello* [33]. Penetra en los tejidos vegetales de manera natural debido a daños presentes en la planta que rompen sus paredes celulares. Durante el contacto con las células vegetales la bacteria transfiere a las células vegetales un plásmido llamado Ti (inductor de tumores) [10,13,24].

2.1.1. *Plásmido Ti y T-ADN*

El plásmido Ti se integra en el ADN del cromosoma de la célula vegetal. La región génica transferida contiene los genes oncogénicos cuya expresión provoca una mayor producción de hormonas de crecimiento, estas son las que inducen las divisiones celulares que dan origen a la formación del tumor o agalla. La capacidad de A. tumefaciens para producir tumores le confiere una clara ventaja, ya que estos tumores son una fuente de comida (Opinas) para la bacteria [3,4,6,13,24].

El plásmido Ti posee una región de unas 200 Kb con dos regiones esenciales para la movilización e integración del T-ADN (ADN transferido, monocatenario) en las células vegetales. En el interior de la célula huésped sólo penetra el T-ADN, que tiene un tamaño de entre 12 y 24 Kb, dependiendo de la cepa bacteriana. Las regiones indispensables para la integración corresponde a los extremos izquierdo y derecho del T-ADN (TL y TR respectivamente) que son repeticiones directas casi perfectas de 25 pb (5'TGACAGGATATATTGGCGGGTAAAC3'), la segunda región, la región Vir (virulen-

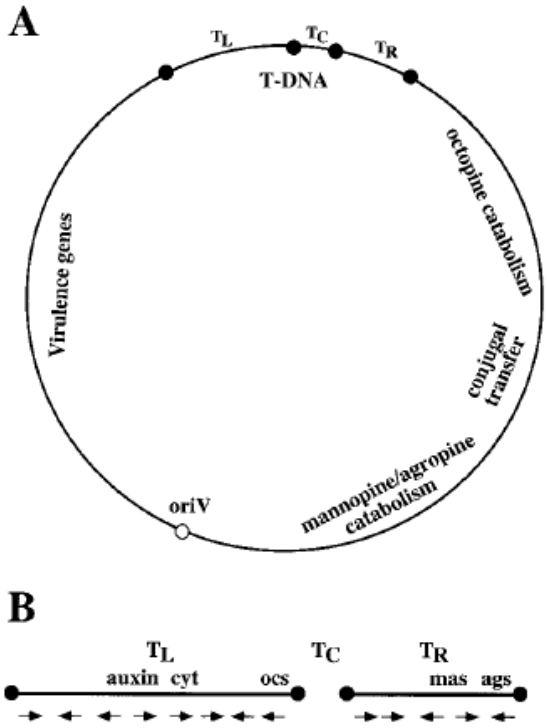

Figura 1. Representación esquemática del plásmido Ti de Agrobacterium tumefaciens. (A) se presenta la división del T-ADN en tres regiones TL (T-ADN izquierda), TC (T-ADN central), áTR (T-ADN derecha), los círculos negros representa las secuencias repetidas del T-ADN, el círculo blanco esquematiza el origen de replicación del plásmido Ti, oriV. Así mismo se indican la región de los genes de virulencia. (B) Las fechas indican la dirección de la transcripción de los genes contenidos en el T-ADN involucrados en la síntesis de: auxinas (Auxin), citoquinas (cyt), y la familia de la opinas, octopinas (acs), manopinas (mas) y agropinas (ags) (Tomado de [14])

.

cia) se requiere para que la escisión, transferencia e integración del T-ADN sean efectivas (Ver Figura 1) [4,6,14,17,31,36].

2.1.2. *Mecanismo de Transformación*

El modelo de transformación celular llevado a cabo por A. tumefaciens, puede ser divido en las siguientes etapas. (a) Reconocimiento químico del hospedero y activación de la expresión de los genes de virulencia, (b) Reconocimiento físico en interacción entre la bacteria y el hospedero, (c) Producción de sustratos y transferencia de maquinaria, (d) Transferencia de sustratos fuera de la bacteria hacia la célula hospedera (e) Movimiento de sustratos hacia el núcleo, (f) Integración del T-ADN en el genoma de la célula hospedera (g) Expresión del T-DNA [27,41].

2.1.3. *Reconocimiento del Hospedero y Expresión de Genes Vir*

Para la inducción de los genes de virulencia en la planta, no es necesaria la unión entre células pero si la interacción molecular entre las mismas. Así el reconocimiento celular llevado acabo por A. tumefaciens es requerido para la activación de los genes de virulencia [10,27,14].

La activación de los genes vir, una vez ocurrida la interacción bacteria-hospedero, requiere los genes virA y virG [8]. Estos genes presentan una expresión constitutiva a niveles muy bajos, pero son capaces de autorregularse favorablemente. virA y virG presentan una alta homología con aquellos genes que codifican para los sistemas de regulación de dos componentes, donde un sensor de quinasas responde a la señales de entrada y media la activación de un regulador de respuesta que controla los estados de fosforilación. Así el sensor de quinasas, VirA, ubicado en el espacio periplasmático y anclado en la membrana interna autofosforila un residuo de histidina y transfiere este fosfato a un residuo de aspartato conservado en el regulador citoplasmático de respuesta VirG (Ver figura 2). El complejo VirG- PO4 se une a una secuencia específica de 12pb del promotor vir (Caja vir) en el ADN bacteriano y activa la transcripción de los genes de virulencia [14,27,41].

Son las señales procedentes del hospedero las responsables de la activación del sistema virA/G, tales como fenoles, monosacáridos de aldosa, bajo pH y baja concentración de PO4. Pero son los fenoles los ampliamente requeridos para inducir la expresión de los genes vir, aunque se presentan otro tipo de señales que ocasionan que la célula bacteria sintetice compuestos fenólicos y active la expresión de los genes vir [10,21,27].

La regulación por pH del promotor vir es llevada a cabo por el sistema sensible al pH ChvG/ChvE, el cual es requerido para expresión y virulencia de los genes vir [14,27].

Por otra parte, los azucares juegan un importante papel en la inducción de los genes vir, ya que es requerida cuando las concentraciones de fenol son demasiado bajas para inducir el sistema VirA/G, o cuando por el contrario el sistema vir se satura debido al incremento en la concentración de fenol [14,27].

2.1.4. *Transducción de señales: Sistema VirA/G y Loci ChvE*

VirA es una proteína dimérica de membrana, cada monómero contiene un pequeño dominio N- Terminal citoplasmático, dos dominios transmenbranales (TM), un dominio periplasmático compuestos de 180 aminoácidos y un dominio citoplasmático. Las secuencias funcionales están compuestas por el dominio de unión (L) ubicado en medio de TM2; el dominio de quinasa (K) que incluye una histidina conservada que es fosforilada por ser un sitio de unión a ATP; y el dominio receptor (R) que posee homología- incluyendo el aspartato conservado- con la región N- terminal de VirG [8,20,27].

La inducción de la activación de los genes vir por azúcares ocasiona la expresión de la proteína periplasmática ChvE, que presenta homología con un amplio rango de proteínas periplasmáticas de unión a azúcar. ChvE se une al dominio periplasmático de VirA induciendo su activación cuando hay presencia de azúcar. Para el caso de la percepción física del fenol los análisis genéticos sugieren que los dominios L y K (VirALK) son los responsables de la interacción con fenol. Otra señal de entrada mediada por VirA se da por bajo pH (Ej. pH 5.5), demostrándose qué cepas de A. tumefaciens en las cuales se ha delecionado una parte de la región periplasmática de VirA (de reconocimiento de fenoles) induce la expresión de los genes vir. Pero para un adecuado control por pH es indispensable un dominio periplasmático en buenas condiciones y la presencia del complejo ChvE/azúcar (ver figura 2) [8,27].

Así mismo, el dominio quinasa purificado tiene la capacidad de fosforilar in Vitro a VirG, de tal manera que la expresión del dominio VirAK en A. tumefaciens activa la expresión de los genes vir; de igual forma la adición de un dominio de unión, VirALK, hace que este exhiba, in vivo, la actividad de inductor constitutivo estimulado por fenol [27].

La insensibilidad hacia el azúcar por parte de VirA, debido a la deleción de una amplia región periplasmática y en presencia de pH neutro, ocasiona un aumento en los niveles de expresión en los genes vir debido a la respuesta a fenoles. Esto sugiere que el dominio periplasmático ejerce un efecto representativo en la porción citoplasmática de VirA; que el azúcar y el pH modulan la interacción entre ChvE y VirA y su represión ocasiona una máxima sensibilidad en la respuesta de fenoles [8,27].

La proteína VirA presenta un sensor de histidina-quinasa y se cree que uno de los monómeros VirA fosforila al otro, mientras que la formación del complejo VirG-PO4, dependiente de aspartado conservado, se da gracias a la inducción por fenol que ocasiona la reorganización de VirA-PO4 [2].

2.1.5. *Genes de Virulencia e Infección*

Las heridas presentes en la planta hospedera son indispensables para la transformación con A.tumefaciens, ya que estas facilitan la entrada del T-ADN, debido al aumento en la actividad de la vía fenilpropanoica, la disminución del pH y el aumento en la síntesis de azúcares asociadas con la reparación de la pared, ocasionando la inducción de los genes Vir. Sin embargo, existen referencias que indican la infección sin la presencia de heridas [14,9,27].

La integración de A. tumefaciens con las células de planta hospedera presenta dos tipos de interacción, una no específica y no saturable donde su interacción puede ser removida con una solución buffer salina y otra específica y saturable donde actúan de 200- 1000 bacterias por célula vegetal así la remoción por lavado no es eficaz. Además, el ataque específico de A. tumefaciens no es dependiente del plásmido Ti, sino de una región del cromosoma bacteriano que codifica para los genes chvA, chvB y pcsA involucrados en la síntesis y localización periplasmática del 1- 2 glucan requerido en el ataque por A. tumefaciens [14,27].

Para poder llevar acabo la infección celular, A. tumefaciens, requiere un transportador de ADN y proteínas que dirijan su paso a través de la membrana interna, el espacio periplasmático, el peptidoglicano de la pared, la pared y membrana de la célula hospedera, para lo cual es indispensable el complejo proteico VirB y

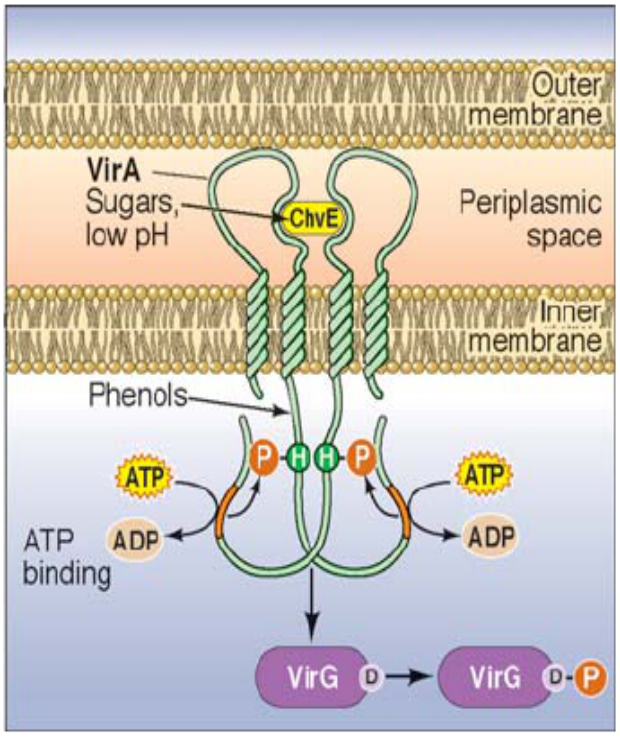

Figura 2. Sistema de transducción de señales. Este sistema VirA/G, ubicado en la membrana interna, activa la expresión de los genes de virulencia de A. tumefaciens (Tomado de [27]).

VirD4 [9,27,41].

El complejo VirB pertenece al sistema de secreción tipo IV (T4SS), una clase de transportadores encontrados en un amplio rango de bacterias gram-negativa implicado en la conjugación y transferencia de plasmidos entre bacterias, así como de la translocación de factores de virulencia durante la infección (ver figura 3) (45). El complejo VirB esta comprendido por lo menos de 12 proteínas: VirB1-11 y VirD4 que forman una unidad multiproteica transportadora de sustratos al interior de la célula huésped donde intervienen VirD2, VirE2, VirE3, VirF y VirD5 [27,38].

Una de las funciones más relevantes es llevada a cabo por VirD2, que se une a la región 5 del T-ADN de cadena sencilla transportándolo al interior de la célula huésped y consecutivamente al interior del núcleo, integrando el T-ADN en el genoma de la célula vegetal [48]. Se ha identificado que VirE2 se une y recubre el complejo T-ADN-VirD2 una vez este se encuentre en el citoplasma de la célula huésped, ayudando en la integración del T-ADN al genoma vegetal [45,46]. Por su parte se piensa que VirF puede estar involucrada en la degradación de factores celulares durante la infección [9].

Lo anterior se puede sintetizar en un modelo hipotético de transferencia del T-ADN de A. tumefaciens en células de plantas, donde las 11 proteínas de virulencia VirB y VirD4 forman un canal integrado en la membrana interna y externa que comunica el citoplasma bacteriano con el exterior, permitiendo el paso del T-ADN fuera de la célula [20,23]. El T-ADN es transportado y dirigido fuera de la célula gracias a la unión de VirD2 con la región 5. El complejo T-ADN- VirD2 es indispensable para la integración del T-ADN en el núcleo de la célula vegetal. Así mismo, VirE2 funciona como un translocador que se integra en la membrana de las células de la planta e ingresa en el citoplasma de la célula vegetal y cubre el complejo T-ADN- VirD2 permitiendo su paso el interior del núcleo [19,33,49]. La regulación de la etapa de infección se lleva a cabo en el citoplasma bacteriano por medio de la chaperona VirE1 que previene la unión de VirE2 al ADN y la formación del canal en la membrana de la célula vegetal (Ver figura 4) [7,9,10,28,35,46].

2.1.6. *Integración al Genoma de la Célula Huésped*

Una vez se encuentre el T-ADN en el núcleo este es convertido a su forma de doble cadena gracias al desacople de VirE2; ya ocurrida la conversión el dsT-ADN se recombina por homología de secuencias con

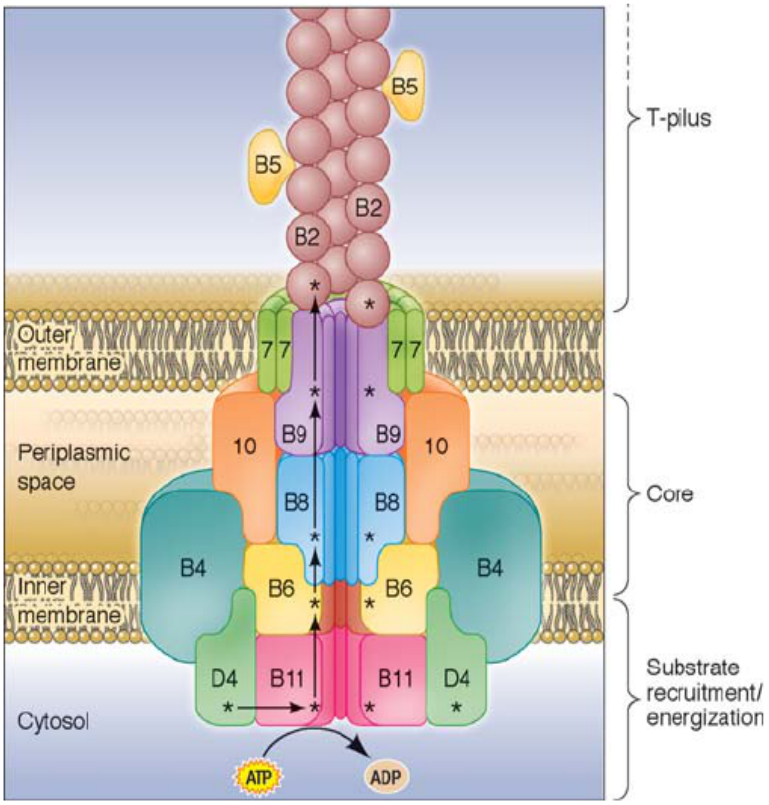

Figura 3. Esquema representativo del complejo VirB/D4. Los asteriscos indican las proteínas implicadas en el transporte de T-ADN y las fechas el orden de transferencia. VirD4 y VirB11 están implicados en la obtención de energía por ATP (Tomado de [27]).

el ADN cromosomal de la planta, lo que conlleva a la inserción del T-ADN con la ayuda de factores celulares de integración presentes en la célula hospedera. Por otra parte estudios han determinado que la secuencia homóloga de recombinación no supera los 5 nucleótidos (microhomología), para lo cual se propone un sistema de recombinación ilegítima como modelo de integración del T-ADN. Se cree que la precisión de reconocimiento de los bordes del T-ADN esta mediada por VirD2 que liga la posición 5' del T-ADN con la 3-OH del ADN de la planta [12,14,41,49,50].

Debido a que el sistema de Agrobacterium no es eficaz en las plantas monocotiledoneas, precisamente las de mayor interés agrícola como los cereales, se han desarrollado alternativas para introducir ADN en las células vegetales basadas en métodos físicos [4]. Los cuales se mencionan a continuación.

2.2. *Transformación por Protoplastos*

Debido a que la célula vegetal posee una rígida pared celular que representa un obstáculo físico para el ingreso del ADN foráneo, es indispensable la obtención de protoplastos -los cuales son células desprovistas de pared - esto se consigue utilizando enzimas (celulasa y pectinasa) que destruyen la lámina media y desorganizan la celulosa. Se suelen emplear líneas celulares desde embriones inmaduros, inflorescencias inmaduras, mesocótilos y la base de las hojas inmaduras o enteras [2].

Los protoplastos al estar desprovistos de la pared externa facilitan la penetración de moléculas de ADN exógeno que es mediada por una permeabilización química debido a la adición de polietilenglicol en el buffer, o bien mediante la incorporación de cepas de A. tumefaciens, electroporación, permeabilización con ultrasonido o tratamiento con liposomas [25].

Los factores que se deben controlar para la preparación de protoplastos son: el pH, indispensable para la óptima función enzimática y regulación osmótica; la temperatura, que regula la actividad enzimática y mantiene la viabilidad del protoplasto; y por último la concentración de enzima la cual varía según la cantidad de protoplastos presentes en el medio y que debe ser óptima para mantener estable la presión osmótica [47].

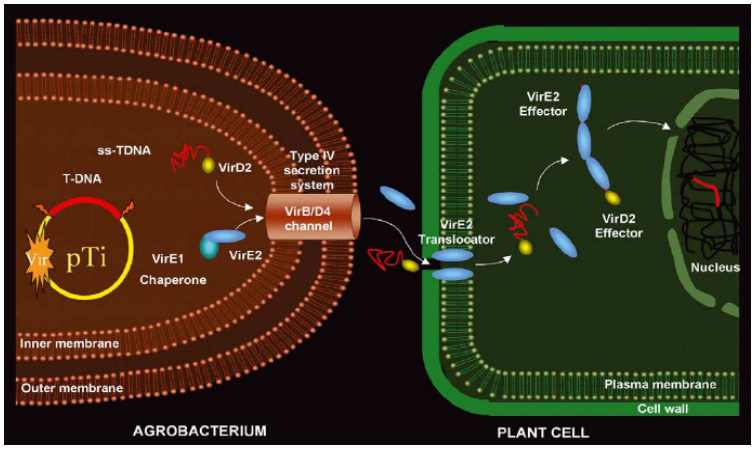

Figura 4. Modelo hipotético de trasferencia de T-ADN por Agrobacterium tumefaciens. En el citoplasma bacteriano la chaperona VirE1 controla la unión de VirD2 al ADN de cadena sencilla, VirD2 se une a la región 5 del ADN y es exportada fuera de la célula junto con VirE2 a través de un sistema de secreción tipo IV formado por el complejo VirB4/D4. El complejo T-ADN VirD2 es transportado al citoplasma de la planta por medio de un complejo formado por las moléculas VirE2 en la membrana celular de la planta, permitiendo a si mismo la integración del complejo T-ADN VirD2 al núcleo de la planta (Tomado de [7]).

Posteriormente, el protoplasto puede regenerar la pared celular en un medio sólido con los nutrientes y señales adecuadas, en un proceso que dura entre cinco y diez días, tras lo cual, la célula comienza a dividirse y puede formar acúmulos indefinidos de células (Callo) e incluso regenerar la planta completa [22].

Ya para 1979, se notifica la fusión de protoplastos por la aplicación de pulsos eléctricos, originando una técnica denominada electrofusión. Esta técnica posee una desventaja que radica en la combinación de los dos genomas presentes en cada protoplasto originando un híbrido con un número cromosomal poliploide, requiriendo así la estabilización de los cromosomas híbridos. Así la base biofísica que presenta esta técnica permite la aplicación de una técnica más sensible que le confiere una mayor estabilidad al genoma, la electroporación [43].

2.3. *Transformación Mediada por Electroporación*

Consiste en la apertura de poros en la membrana por tratamiento con pulsos eléctricos controlados, utilizando campos de entre 200 y 600 V/cm. Lo que permite la incorporación del ADN exógeno. La modificación de moléculas de membrana por la aplicación de pulsos eléctricos provoca la formación de dominios lipídicos debido a la migración de subunidades proteicas en la membrana celular, ocasionando su ruptura en la zona de contacto [43].

Uno de los problemas más frecuentes en este método de transformación es de la regeneración de la planta y la tendencia de esta técnica a insertar copias múltiples del transgén en el genoma de la planta [22,44].

De igual forma, la electroporación no sólo permite una inclusión de ADN, también ofrece la posibilidad de introducir ARN, proteínas, medicamentos y tintes, que proporcionan un rápido y conveniente método de análisis para índices de expresión de ARN, análisis bioquímico de proteínas o visualización de células en sistemas in vivo [43].

Un protocolo optimizado para la electroporación se basa en la transfección por protoplastos en donde se consigue una frecuencia de expresión de los transgenes del 90 %. Su eficacia depende de la viabilidad de los protoplastos, concentración, pureza y topología del ADN, fuerza iónica y eléctrica del buffer de electroporación y la duración de sus pulsos [11].

2.4. *Transformación por Biobalística*

Estas técnicas se basan en la utilización de microesferas de metales, como oro o tungsteno, de 0,4 a 4 m de diámetro, recubiertas del ADN que se desea introducirle cual es precipitado sobre ellas con cloruro cálcico, y que se disparan sobre las células, o bien el uso de microproyectiles que llevan dentro gotas del ADN a transfectar en solución [39]. El mecanismo de disparo es un dispositivo eléctrico de aceleración y descarga (ACELLTM), aunque también son muy utilizados aquellos dispositivos de aceleración basados en gas de helio (PDS-1000/He) [37,44]. Estos aceleradores lanzan las partículas a más de 400 m/s sobre las células de forma que penetran sin destruir la membrana, todo el sistema funciona en un vacío moderado para evitar el rozamien-

to con el aire; condiciones que las células vegetales soportan durante uno o dos minutos. Tras el bombardeo, las células son colocadas en condiciones adecuadas para crecer y regenerar la planta [32]. La desventaja que presenta este método es la múltiple inserción del transgén en el genoma de la planta, lo que conlleva al silenciamiento e inestabilidad del mismo [22].

Las ventajas que presenta este sistema de transformación son: (1) transformar plantas que no pueden ser infectadas por A. tumefaciens, (2) se puede transferir ADN sin el uso de vectores especializados, (3) la introducción de múltiples fragmentos de ADN se logra por un co-bombardeo, eliminándose la necesidad de construir grandes plásmidos, (4) se elimina la expresión de genes reporteros que pueden ocasionar falsos positivos, (5) la transformación de organelos sólo se logra por este método de transformación [37,44].

2.5. *Identificación de Células Vegetales Transformadas.*

Por último para la identificación de las células vegetales que han incorporado un determinado gen exógeno, es decir que han sido transformadas, es factible mediante el uso simultáneo de algún otro gen que codifique para alguna actividad fácilmente detectable y que se inserta junto con el de interés actuando de testigo por lo que se suele llamar gen marcador [18].

Los primeros marcadores de selección utilizados se apoyan en la resistencia a antibióticos por parte de los tejidos transformados. Algunos de estos sistemas como kanamicina e higromicina inhiben la función de los ribosomas inhibiendo el crecimiento de las células de la planta, así la transfección de los componentes de resistencia de la bacteria a la planta (neomicina fosfotransferasa e higromisina transferasa, respectivamente) son un indicador de la transformación [22,29,44].

Son utilizados también aquellos marcadores de resistencia a herbicidas que detienen los procesos de inhibición de la síntesis de aminoácidos aromáticos. Los procesos que inhabilitan la actividad herbicida se pueden dar por una sobre expresión de las enzimas de la planta que reduzca el impacto herbicida; por la modificación del blanco herbicida (mutante) o por la expresión de enzimas que modifiquen o metabolicen los compuestos herbicidas [22].

Los tipos de selección basados en resistencia a herbecidas y antibióticos son conocidos como estrategias de selección negativas ya que las células que no posean los agentes de selección, es decir los tejidos no transformados, mueren en lugar de promover el crecimiento de los tejidos transformados. Por lo anterior, actualmente se cuenta con marcadores positivos de selección que no ocasionan la muerte de los tejidos [22].

Uno de los marcadores positivos más empleados en vegetales es el gen gus, procedente de la bacteria E. Coli que codifica para la β-glucuronidasa, la cual se expresa en los tejidos transformados, liberando al medio benciladenina indispensable para la proliferación y regeneración del tejido vegetal cuando el medio carece de citoquinas. Esta actividad enzimática se puede valorar histoquímicamente sobre un compuesto coloreado [44].

Otra estrategia de selección positiva esta basada en la inhabilidad de las plantas para utilizar xilosa como fuente de carbón, así la conversión de la xilosa por la enzima xilosa isomerasa codificada por el gen xylA obtenido de Thermoanaerobacterium thermosulfurogenes es un importante marcador utilizado en la transformación del tomate [44].

Un gen marcador muy utilizado es el de la luciferasa, una enzima que en presencia de ATP degrada la luciferina emitiendo luz y que puede valorarse con ayuda de un luminómetro, placa o película fotográfica sensible a esta. Igualmente, el gen gfp que codifica para la proteína fluorescente verde, GFP, obtenida de la medusa Aequorea victoria, es muy utilizada como gen reportero en los sistemas biológicos. A diferencia del sistema luciferasa/luciferina, la GFP no necesita activación media por sustrato y se puede visualizar con alta definición incluso a niveles subcelulares [26].

3. Algunas Aplicaciones Biotecnológicas

Entre las aplicaciones de la biotecnología vegetal podemos encontrar la mejora genética de plantas con fin alimentario, como el maíz (Zea mays), el cual incluye entre sus principales componentes la amilasa y la amilopectina, que son el componente principal del almidón. Los estudios realizados indican que de 10 a 25 días después de realizada la polinización incrementa el porcentaje de amilasa contenido en los granos de maíz lo cual es consistente con un incremento en la actividad del gen GBSS. Por tanto, un aumento en la expresión del gen GBSS y su inducción en variedades carentes de este gen, aumentan el contenido de amilasas [5].

Otro ejemplo clásico lo presentan las plagas de insectos que perjudican al maíz, destacándose la especie de gusano Diatraea saccharalis. La alimentación de los gusanos produce una reducción del crecimiento de la planta, reducción del tamaño del grano y pérdidas en la cosecha debido a rotura de las plantas. Otros riesgos asociados con la alimentación de los gusanos están

constituidos por infecciones secundarias de hongos y bacterias [34]. Bacillus thurigiensis, una bacteria que normalmente habita el suelo y cuyas esporas contienen proteínas tóxicas para ciertos insectos, denominadas Cry, se activan en el sistema digestivo del insecto y se adhieren a su epitelio intestinal, alterando el equilibrio osmótico del intestino. Esto provoca la parálisis del sistema digestivo del insecto el cual deja de alimentarse y muere a los pocos días. Las toxinas Cry son consideradas inocuas para mamíferos, pájaros e insectos no-blanco. El maíz Bt es un maíz transgénico que produce en sus tejidos proteínas Cry. Así, cuando las larvas de insecto intentan alimentarse de la hoja o del tallo del maíz Bt, mueren [34,40]. El análisis de zonas adecuadas para la implantación de cultivos trae consigo la erradicación de la maleza, la cual es un potente competidor de los recursos que permiten el desarrollo de las plantas. De esta forma por medio de herbicidas se ha estado tratando de eliminar esta problemática surgiendo irónicamente otra, el empobrecimiento del cultivo. La introducción y expresión de genes foráneos en plantas representa una alternativa novedosa para el mejoramiento genético de los cultivos. Utilizando herbicidas con glufosinato de amonio como agente activo, una vez transformados segmentos de tallos con el vector pCAMBIA, la evaluación de la resistencia al herbicida en condiciones de crecimiento confirma que las plantas obtenidas por esta vía presentan altos niveles de resistencia al herbicida, con excelentes características moleculares que permiten el control de malezas [4].

Así mismo, la caracterización de genes de resistencia ha permitido crear variedades comerciales de plantas capaces de soportar enfermedades bacterianas y ambientes extremos, llevando consigo la creación de un inventario de genes de resistencia pertenecientes a diversas especies [40].

4. Conclusiones

Como se ha venido tratando en esta revisión, la biotecnología actualmente ha desarrollado métodos moleculares de ADN recombinante que han permitido adelantos en diversos ámbitos de las ramas de la ciencia. Así la estandarización de métodos se ha diversificado de acuerdo al tipo celular y los requerimientos científicos de interés utilizando microorganismos.

Los métodos de transformación que se aplican en plantas representan un importante adelanto biotecnológico, ya que incorporan ADN foráneo por mecanismos de transfección natural, tal como A. tumefaciens entre otras técnicas físicas de transporte, siendo esta la mejor alternativa de transporte e inserción para la transformación de plantas.

Referencias

[1] Arias, R.S., S. A. Filichkin, &, S. H. Strauss. Divide and conquer: development and cell cycle genes in plant transformation. TRENDS in Biotech. 24: 267-273, 2006.

[2] Bent, A. F. Arabidopsis in Planta Transformation. Uses, Mechanisms, and Prospects for Transformation of Other Species. Plant. Phys. 124: 1540-1547, 2000.

[3] Binns, A. N. T-DNA of Agrobacterium tumefaciens: 25 years and counting. TRENDS in Plan. Sci. 5: 231-233, 2002.

[4] Broothaerts, W., H. J. Mitchell, B.Weir, S. Kaines, L. M. Smith, W. Yang, J. E. Mayer, C. Rodriguez & R. A. Jefferson. 2005. Gene transfer to plants by diverse species of bacteria. Nature.433: 629-633, 2005.

[5] Chilton M.D. 2005. Adding diversity to plant transformation. Nature. 23: 309- 310, 2005.

[6] Ditt, R. F., E. Nester, L. Comai. The plant cell defense and Agrobacterium tumefaciens. FEMS Microb. Lett. 247: 207 - 213, 2005.

[7] Duckely, M., &, B. Hohn. The VirE2 protein of Agrobacterium tumefaciens: the Yin and Yang of T-DNA transfer. FEMS Micro. Letters. 223:1-6, 2003.

[8] Dye, F., &, F. M. Delmotte. Purification of a protein from Agrobacterium tumefaciens strain A348 that binds phenolic compounds. Biochem. J. 321: 319- 324, 1997.

[9] Eckardt, N. A. Host Proteins Guide Agrobacterium Mediated Plant Transformation. The Plant Cell.16: 2837-2839, 2004.

[10] Escobar, M. A., & A. M. Dandekar. Agrobacterium tumefaciens as an agent of disease. TRENDS in Plan. Scien. 8:380-386, 2003.

[11] Fisk, H.J., &, Dandekar, A.M. . Electroporation: introduction and expression of transgenes in plant protoplasts. Meth. Mol Biol. 286:79-90, 2005.

[12] Frenkiel-Krispin, D., S. G. Wolf, S. Albeck, T. Unger, Y. Peleg, J. Jacobovitch, Y. Michael, S. Daube, M. Sharon, C. V. Robinson, D. Svergun, D. Fass, T. Tzfira, &, M. Elbaum. Plant Transformation by Agrobacterium tumefaciens Modulation Of Single-Stranded DNA-VirE2 Complex Assembly By VirE1. Jour. Of Biol. Chem. 282: 3458-3464, 2007.

[13] Gelvin, S.B. Gene exchange by design. Nature. 433: 583-584, 2005.

[14] Gelvin, S.B. Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the Gene-Jockeying Tool. Microbiol. Mol. Biol. Rev.67: 16-37, 2003.

[15] Guo, S., J. Li, W. Qiao, &, X. Zhang. Analysis of Amylose Accumulation During Seed Development in Maize. Acta Gen. Sinica, 33: 1014-1019, 2006.

[16] Hansen, G. A. Das, &, M.D. Chilton. Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by Agrobacterium. Proc. Nati. Acad. Sci. 91: 7603-7607, 1994.

[17] Jacobs, M. Developing the Agrobacterium Ti plasmids a vector for plant genetic engineering: the 2002 Benjamin Franklin Medal in life sciences presented to Mary-Dell Chilton. Jour. of the Frank Ins. 340: 213-219, 2003.

[18] Kojima M, H. Shioiri, M. Nogawa, M. Nozue, D. Matsumoto, A. Wada, Y. Saiki, & K. Kiguchi. In Planta Transformation

of Kenaf Plants (Hibiscus cannabinus var. aokawa No. 3) by Agrobacterium tumefaciens. Jour. Of Biosc. And Bioeng. 98: 136-139, 2004.

[19] Krishnamohan A., V. Balaji, &, K. Veluthambi. Efficient vir Gene Induction in Agrobacterium tumefaciens Requires virA, virG, and vir Box from the Same Ti Plasmid. Jour. Of Bact. 183: 4079-4089, 2001.

[20] Kumar, V. S., M.V. Rajam. Polyamines enhance Agrobacterium tumefaciens vir gene induction and T-DNA transfer. Plant Scien. 168:475-480, 2005.

[21] Latham, J.R., Al. K.Wilson, &, R. A. Steinbrecher. The Mutational Consequences of Plant Transformation. Tour. Of. Biomed. And Biotech. 17:1-7, 2006.

[22] Lessard P. A., H. Kulaveerasingam, G.M. York, A. Strong, &, A. J. Sinskey. Manipulating Gene Expression for the Metabolic Engineering of Plants. Met. Engine. 4: 6779, 2002.

[23] Liu, P., &, E. W. Nester. Indoleacetic acid, a product of transferred DNA, inhibits vir gene expression and growth of Agrobacterium tumefaciens C58. PNAS. 103: 4658-4662, 2006.

[24] Lopez, J. S., R. Raj Kumar, P.K. Pius and N. Muraleedharan. Agrobacterium tumefaciens Mediated Genetic Transformation in Tea (Camellia sinensis [L.] O. Kuntze). Plant Mol. Bio. Rep. 22: 201a-201j, 2004.

[25] Maheshwari, N., K. Rajyalakshmi, k. Baweja, &, S. K. Dhir. In vitro culture of wheat and genetic transformation- retrospect and prospect. Crit. Rev. plant. Sci. 14:149-178, 1995.

[26] Mankin, S. L., &, W.F. Thompson. New Green Fluorescent Protein Genes for Plant Transformation: Intron-Containing, ER-Localized, and Soluble-Modified. Plant Mol. Bio. Rep. 19: 13-26, 2001.

[27] McCullen, C. A., &, A. N. Binns. 2006. Agrobacterium tumefaciens and Plant Cell Interactions and Activities Required for Interkingdom Macromolecular Transfer. Annu. Rev. Cell Dev. Biol. 22:101-127, 2001.

[28] Michielse, C.B., A.F. Ram, P.J. Hooykaas, &, C.A. van den Hondel.2004. Role of bacterial virulence proteins in Agrobacterium-mediated transformation of Aspergillus awamori. Fung. Gen. and Biol. 41: 571-578, 2001.

[29] Miki, B., & S. McHugh. Selectable marker genes in transgenetic plants: applications, alternatives and biosafety. J. Biotech. 107: 193-232, 2004.

[30] Obermeyer, G., R. Gehwolf, W. Sebesta, N. Hamilton, G. Gadermaier, F. Ferreira, U.Commandeur, R. Fischer, &, F. W. Bentrup. Over-expression and production of plant allergens by molecular farming strategies. Methods 32: 235-240, 2003.

[31] Pappasand, K.M., &, S. C. Winans. Plant Transformation by Coinoculation with a Disarmed Agrobacterium tumefaciens Strain and an Escherichia coli Strain Carrying Mobilizable Transgenes. Appl. Environ. Microbiol. 69: 6731-6739, 2003.

[32] Ranadolph, A. B., J.E. Boynton, J. Dawson, E. Dunder, R. Eskes, N.W. Gilham, A. Johnson, P. S. Perlman, J. Suttie, &, W. C Heiser. Sub-micron gold particles are superior to larger particles for efficient biolistic transformation of organelles and some cell types. BioRad Bull. 2015: 1-4, 1995.

[33] Rosen, R., A. G. Matthysse, D. Becher, D. Biran , T. Yura , M. Hecker, &, E. Z. Ron. Proteome analysis of plant-induced proteins of Agrobacterium tumefaciens. FEMS Micro. Ecol. 44: 355-360, 2003.

[34] Schnepf, E., N. Crickmore, J. van Rie, D. Lereus, J. Baum, J. Feitelson, D.R. Zeigler, &, D. H. Deam. Bacillus thuringiensis and its pesticidal crystal proteins. Micro. And Mol. Bio. Rew. 62: 775-806, 1998.

[35] Schrammeijer, B., A. Beijersbergen, K. B. Idler, & L.S. Melchers. Sequence analysis of the vir-region from Agrobacteruim tumefaciens octopine Ti plasmid pTi15955. Jour. Of Exp. Bot. 347: 1167-1169, 2000.

[36] Suzuki, K., K. Iwata, &, K. Yoshida. Genome Analysis of Agrobacterium tumefaciens: Construction of Physical Maps for Linear and Circular Chromosomal DNAs, Determination of Copy Number Ratio and Mapping of Chromosomal Virulence Genes. DNA Research 8:141-152, 2001.

[37] Taylor, N.J, &, C. M. Fauquet.Microparticle Bombardment as a Tool in Plant Science and Agricultural Biotechnology. DNA and Cell Bio. 21:963-977, 2002.

[38] Terradot, L., R. Bayliss, C. Oomen, G. A. Leonard, C. Baron, &, G. Waksman. Structures of two core subunits of the bacterial type IV secretion system, VirB8 from Brucella suis and ComB10 from Helicobacter pylori. PNAS. 102: 4596-4601, 2005.

[39] Tian, L., &, A. Seguin. Microprojectile Particle Effect on Stable Transformation of Black Spruce Via Bombardment. Plant Mol. Bio. Rep. 22: 199a-199f, 2004.

[40] Toenniessen, G.H., J. C. O'Toole, &, J. DeVries. Advances in plant biotechnology and its adoption in developing countries. Curr. Opi. In Plant Bio. 6:191-198, 2003.

[41] Tzfira, T., &, V.Citovsky. The Agrobacterium-Plant Cell Interaction. Taking Biology Lessons from a Bug. Plant. Phys. 133: 943-947, 2003.

[42] Usami, S., S. Okamoto, I. Takebe, &, Y. Machida. Factor inducing Agrobacterium tumefaciens vir gene expression is present in monocotyledonous plants. PNAS. 85:3748-3752, 1988.

[43] Van Wert , S. L., &, J. A. Saunders. Electrofusion and Electroporation of Plants. Plant Physiol. 99: 365-367, 1992.

[44] Veluthambi, K., A. K. Gupta, &, A. Sharma. The current status of plant transformation technologies. Curr Sci. 84: 368-380, 2003.

[45] Vergunst, A.C., C.M. van Lier, A. Dulk-Ras, &, J.J. Hooykaas. Recognition of the Agrobacterium tumefaciens VirE2 Translocation Signal by the VirB/D4 Transport System Does Not Require VirE11.Plant Phys. 133: 978-988, 2003.

[46] Ward, D. V., &, P. C. Zambryski. The six functions of Agrobacterium VirE2. PNAS. 98:385-386, 2001.

[47] Zhao, K., D. Zhou, W. Ping, J. Ge. Study on the Preparation and Regeneration of Protoplast from Taxol-producing Fungus Nodulisporium sylviforme. Nat. And Sci. 2: 52-59, 2004.

[48] Ziemienowicz, A., B. Tinland, J. Bryant, V. Gloeckler, &, B. Hohn. Plant Enzymes but Not Agrobacterium VirD2 Mediate T-DNA Ligation In Vitro. Mol. Cell. Biol. 20: 6317-6322, 2000.

[49] Ziemienowicz, A., T. Merkle, F. Schoumacher, B. Hohn, &, L. Rossi. Import of Agrobacterium T-DNA into Plant Nuclei: Two Distinct Functions of VirD2 and VirE2 Proteins. The Plant Cell. 13: 369-383, 2001.

[50] Zupan, J., T.R, Muth, O. Draper, &, P. Zambryski. The transfer of DNA from Agrobacterium tumefaciens into plans: a feast of fundamental insights. The plant Jour. 23: 11-28, 2000.