



Eliminación de genes marcadores de selección de las plantas transgénicas mediante recombinasas específicas de sitio

Apellidos, nombre	Carmelo López del Rincón ¹ (clopez@upvnet.upv.es) María Ferriol Molina ² (mafermo@upvnet.upv.es)
Departamento	¹ Departamento de Biotecnología ² Departamento de Ecosistemas Agroforestales
Centro	Universitat Politècnica de València

1 Resumen de las ideas clave

Los genes marcadores de selección (GMS) y los agentes de selección son extraordinariamente útiles durante la transformación de plantas ya que facilitan la selección de las células transformadas de una matriz que consta principalmente de células no transformadas. La mayoría de los GMS expresan productos proteínicos que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas, y posteriormente permanecen en las plantas genéticamente modificadas (GM). La presencia de estos genes y sus productos en las plantas GM y, posteriormente, en los alimentos, los piensos y el medio ambiente, son motivo de preocupación para el público en general y están sujetos a regulaciones gubernamentales especiales en muchos países. En los últimos años, la eliminación de los GMS de las plantas transgénicas, especialmente de los productos comerciales, ha recibido una gran atención. Son varias las tecnologías disponibles, siendo una de las más populares la que elimina los GMS mediante el empleo de recombinasas específicas del sitio.

2 Introducción

¿Qué son los GMS? Son secuencias de ADN que permiten a los investigadores identificar rápidamente las células transformadas y los tejidos y brotes regenerados durante su crecimiento en un medio de cultivo, en presencia del agente selectivo correspondiente.

¿Por qué son necesarios los GMS en el proceso de obtención de plantas transgénicas? Son necesarios debido a la baja eficiencia de los métodos de transformación y permiten el crecimiento selectivo de células transformadas.

¿Cuáles son los GMS más usados? La mayoría de estos genes son de origen bacteriano y han sido equipados con secuencias reguladoras específicas para su expresión en células vegetales. Los usados con mayor frecuencia son los genes *nptII* y *hpt* que confieren resistencia a los antibióticos kanamicina e higromicina, respectivamente, y los genes *EPSP* sintasa y *bar* que confieren resistencia a los antibióticos glifosato y fosfinotricina, respectivamente. Los antibióticos y herbicidas matan las células no transformadas, que son la mayoría, por diversos mecanismos, mientras que las células transformadas con GMS pueden sobrevivir.

¿Por qué los GMS generan rechazo entre la población? Aunque ni estos genes ni sus productos han mostrado hasta la fecha efectos adversos para los humanos, animales o seguridad para el medio ambiente, la persistencia es indeseable o inaceptable para el público



en general. Los riesgos que podría acarrear la comercialización de plantas que llevan GMS en sus genomas son: (i) la transferencia horizontal de genes de resistencia a antibióticos de una planta transgénica a la microflora intestinal animal y humana, con su expresión futura; y (ii) la transferencia vertical de genes resistentes a herbicidas desde la planta transgénica a cultivares convencionales y sus parientes silvestres, con la consecuente dispersión del GMS y la creación de supermalezas.

¿Cuándo es necesario eliminar los GMS de las plantas transgénicas? Técnicamente, es posible obtener plantas transgénicas sin la utilización de GMS, pero el procedimiento es incómodo y tedioso. Además, la legislación europea permite la comercialización de plantas transgénicas con GMS no basados en resistencia a antibióticos o herbicidas. Sin embargo, no se permite la comercialización de plantas GM en caso de llevar genes de selección basados en herbicidas o selección de antibióticos, por lo que es necesario eliminarlos del genoma del hospedador después de la regeneración de las plantas transgénicas.

¿Cuáles son las estrategias disponibles para obtener plantas libres de GMS? Las estrategias más habituales son: (i) **co-transformación**, es decir, transformación separada del GMS y gen de interés (GI) y eliminación del GMS por cruzamiento y segregación en la siguiente generación; (ii) sistemas de expulsión basados en **transposones** (p. ej., el transposón Ac/Ds de maíz); (iii) escisión basada en la **recombinación intracromosómica**; y (iv) eliminación del GMS por **recombinasas específicas del sitio** (p. ej., los sistemas Cre/loxP, FLP/FRT y R/RS), estrategia que se describe en este artículo docente.

3 Objetivos

Una vez que el alumno lea con detenimiento este documento, será capaz de:

- Entender cómo obtener plantas transgénicas libres del GMS mediante el empleo de las recombinasas específicas de sitios más populares.

4 Desarrollo

Uno de los sistemas para eliminar los GMS se basa en el empleo de recombinasas específicas de sitio. Estos sistemas de recombinación son comunes en procariontes y eucariontes inferiores como la levadura

y tienen la capacidad de cortar el ADN en un sitio específico y unirlo al ADN escindido en una segunda secuencia diana. La escisión del ADN foráneo flanqueado por dos sitios específicos de reconocimiento orientados en la misma dirección se puede usar para eliminar material transgénico no deseado (en este caso el GMS). Los sistemas de recombinación más utilizados son: (i) el sistema Cre/loxP del bacteriófago P1, donde la recombinasa Cre reconoce los sitios de recombinación LoxP; (ii) el sistema FLP/FRT de *Saccharomyces cerevisiae*, donde la recombinasa FLP actúa sobre los sitios FRT; y (iii) el sistema de recombinación R/RS de *Zygosaccharomyces rouxii* donde R y RS son la recombinasa y los sitios de recombinación, respectivamente. Después de la reacción, únicamente un sitio de recombinación (loxP, FRT o RS) permanecerá en el genoma (Figura 1).

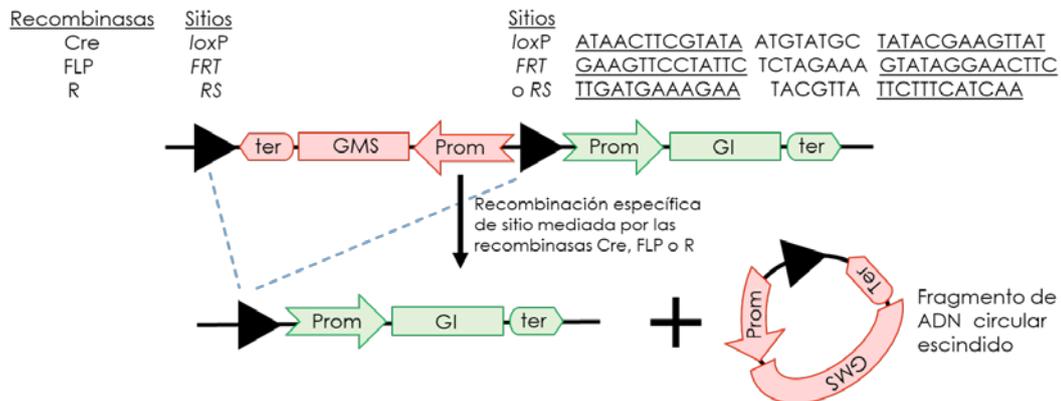


Figura 1. Eliminación del gen marcador de selección (GMS) a través de recombinasas específicas de sitio. En el casete de ADN que se construye para transformar las plantas, el GMS se coloca entre los dos sitios de reconocimiento de la recombinasa (loxP, FRT o RS) repetidos directamente (triángulos negros, la secuencia de los sitios se muestra en la parte superior). La presencia de la enzima recombinasa relacionada, Cre, FLP o R, respectivamente, dirige la escisión del GMS. Prom: promotor. Ter: terminador. GI: gen de interés. Esquema adaptado de Chong-Pérez y Angenon (2013).

Estos sistemas pueden dividirse en dos categorías según la posición del gen de la recombinasa (GR). En una primera categoría de estrategias, el GR y el GMS están en fragmentos de ADN diferentes y el GR se administra a la planta que contiene el GMS por retransformación, por hibridación (cruces sexuales), o mediante expresión transitoria. En la segunda categoría de estrategias, el GR y el GMS están en el mismo fragmento de ADN.

4.1 Expresión constitutiva del gen de la recombinasa mediante cruzamiento con otra planta o mediante retransformación

En los experimentos iniciales para la eliminación del GMS de las plantas transgénicas se empleó una estrategia de hibridación, o una estrategia de transformación. Para la estrategia de hibridación, la planta transgénica con el gen de interés (GI) y el GMS flanqueado por los sitios de reconocimiento se hibrida con una planta transgénica que expresa la recombinasa, para que en las plantas híbridas F1 se pueda escindir el GMS (Figura 2). Las plantas transgénicas con eventos de recombinación se retrocruzan con plantas de tipo silvestre para obtener mediante segregación plantas transgénicas con el GI, pero sin el GR.

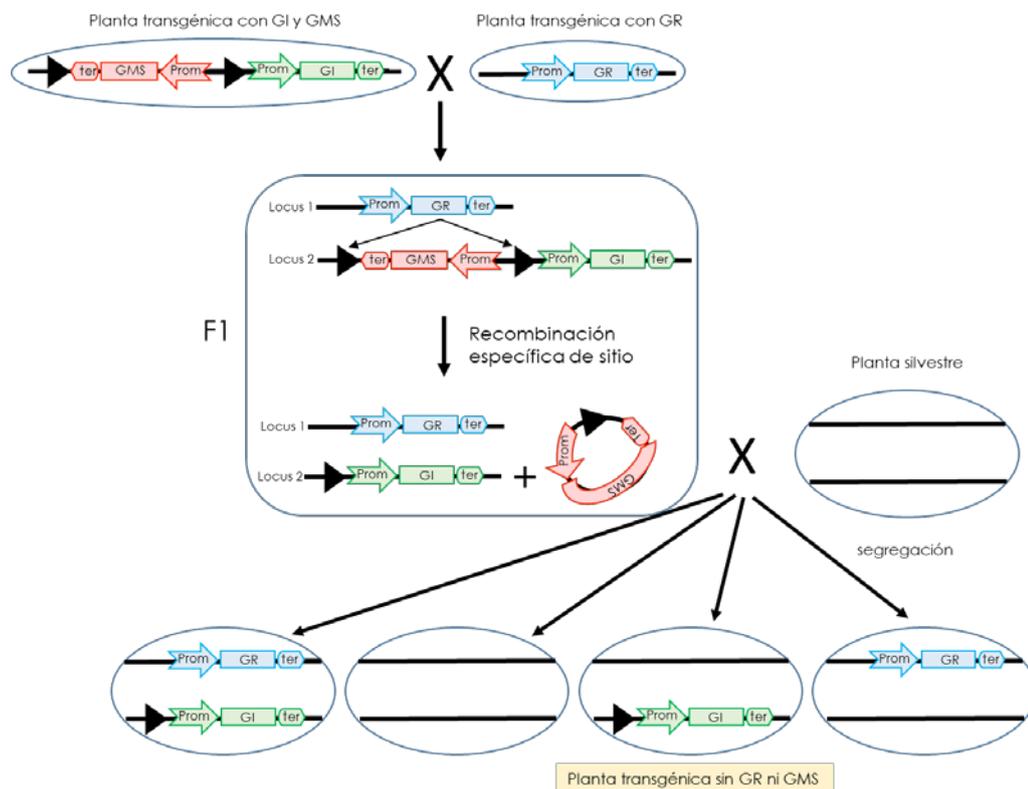


Figura 2. La planta transgénica con el gen de interés (GI) y el gen marcador de selección (GMS) flanqueado por los sitios de reconocimiento (triángulos negros) se hibrida con una planta transgénica que expresa la recombinasa (GR). En el híbrido F1 resultante los dos casetes de ADN se localizan en locus diferentes. Cuando se expresa la recombinasa se escinde el GMS colocado entre los dos sitios de reconocimiento. Como el locus 1 (con el gen de la recombinasa, GR) y el locus 2 (con el gen de interés, GI) están desvinculados, se pueden obtener plantas transgénicas libres del GMS y sin el GR después del cruzamiento con una planta silvestre y de la segregación en la siguiente generación. Prom:

promoter. Ter: terminador. Esquema adaptado de Chong-Pérez y Angenon (2013) y de Yau y Stewart (2013).

Para la estrategia de retransformación, las plantas transgénicas con el casete portador del GI y el GMS se vuelven a transformar con un casete que lleva el GR (para lo cual se necesita un GMS diferente). Las líneas retransformadas son cultivadas hasta la producción de semillas, y las plantas derivadas de estas semillas son testadas para determinar la transmisión en la línea germinal del GI, pero con el GMS escindido. El GR puede luego eliminarse de las líneas con el GI (sin SMG) por segregación genética como en la estrategia anterior.

Aunque es posible obtener plantas transgénicas libres de marcadores, estas estrategias están restringidas a las especies de propagación sexual. Para plantas propagadas vegetativamente o para árboles, los tiempos tan largos de cada generación hacen que los esquemas de cruce sean poco prácticos. Por otro lado, el método de re-transformación es largo y requiere dos veces la exposición del tejido a cultivo *in vitro* con hormonas que podrían aumentar el riesgo de variación somaclonal. Además, la expresión constitutiva de la recombinasa puede dar lugar a fenotipos aberrantes y causar anomalías en las plantas transgénicas. Para evitar los efectos secundarios, la recombinasa puede expresarse de forma transitoria o inducible.

4.2 Expresión transitoria del gen de la recombinasa

Este enfoque consiste en la expresión transitoria del gen de la recombinasa (sin integración en el genoma) mediante el empleo de vectores de virus de plantas (ver artículo docente titulado “**Desarrollo de vectores virales para la expresión de proteínas recombinantes en plantas**”) y vectores de ADN-T de *Agrobacterium*. Así, se ha conseguido eliminar el GMS en plantas transgénicas de *N. benthamiana* tras la expresión transitoria del gen de la recombinasa empleando un vector viral basado en el Virus X de la Patata (PVX) y mediante la técnica de la agroinfiltración. Este método puede aplicarse a plantas de propagación vegetativa y plantas de ciclo de vida largo.

4.3 Expresión inducida del gen de la recombinasa

Con el fin de controlar el proceso de escisión del GMS, el GR se coloca bajo el control de promotores inducibles (por choque térmico, agentes químicos, etc). Activando los promotores con los

agentes inductores (calor o productos químicos), la expresión del GR puede controlarse en un momento determinado. En esta estrategia, el GMS, el GR y el GI se clonan en una sola construcción. El GR, bajo el control de un promotor inducible, y el GMS se colocan en el casete flanqueados por los dos sitios de recombinación orientados en la misma dirección, mientras que el GI se coloca fuera de los sitios de reconocimiento. Después de la transformación y del análisis molecular, las plantas transgénicas se tratan con los agentes inductores para favorecer la expresión de la recombinasa, dando como resultado la escisión tanto del GR como del GMS (Figura 3). Este sistema a menudo denominado "autoescisión" es versátil y flexible debido al estricto control espacial y temporal puesto que puede aplicarse en etapas de desarrollo tempranas (por ejemplo, embriones somáticos), tardías (por ejemplo, floración o plántula) y en todas las especies, tanto en las de propagación vegetativa como en plantas de ciclo de vida largo como árboles perennes.

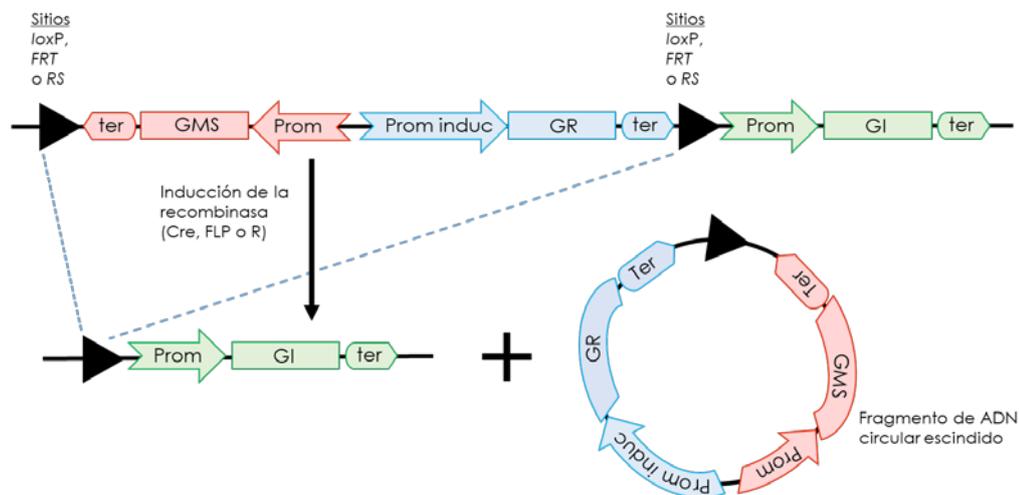


Figura 3. Sistema de autoescisión basado en recombinasas específicas del sitio. El gen de la recombinasa (GR) está bajo el control de un promotor inducible (indProm) y se coloca junto con el gen marcador de selección (GMS) entre los sitios de reconocimiento de la recombinasa repetidos directamente (triángulos negros). La inducción de la expresión génica de la recombinasa lleva a la escisión tanto del GMS como del GR. Prom: promotor. Ter: terminador. GI: gen de interés. Esquema adaptado de Chong-Pérez y Angenon (2013).

Aunque los promotores inducibles ofrecen control sobre el tiempo de expresión de la recombinasa, los promotores específicos de tejido pueden usarse para controlar la escisión en las etapas claves del desarrollo. Se han empleado promotores específicos de polen u otros promotores específicos de tejido para dirigir la



expresión del GR. Por ejemplo, se ha usado el promotor NTM19 específico de microesporas de tabaco para la expresión del GR, de forma que la escisión del GM y GR tuvo lugar durante la microsporogénesis en el 100% de las semillas de tabaco producidas.

5 Cierre

Para producir plantas transgénicas en la biotecnología actual se usan genes marcadores que facilitan la selección inicial de las células transformadas de las no transformadas. Sin embargo, después de que se ha producido el evento transgénico la presencia de estos genes en el genoma de las plantas no es útil y son motivo de preocupación para el público en general. Por ello, se han desarrollado diferentes estrategias que permiten obtener plantas libres de genes marcadores de selección.

De todas ellas, la estrategia más popular es la que emplea las recombinasas microbianas específica del sitio para llevar a cabo la escisión de los GMS, habiéndose demostrado ya su eficacia tanto en plantas monocotiledóneas como en eudicotiledóneas.

6 Bibliografía

6.1 Referencias de fuentes electrónicas:

D. Gidoni, D., Srivastava, V. y Carmi, N (2008). Site-specific excisional recombination strategies for elimination of undesirable transgenes from crop plants. IN VITRO CELLULAR & DEVELOPMENTAL BIOLOGY – PLANT, 44:457–467. DOI 10.1007/s11627-008-9140-3.

Chong-Pérez, B. y Angenon, G. (2013). Strategies for Generating Marker-Free Transgenic Plants, *Genetic Engineering*. Prof. Idah Sithole-Niang (Ed.), InTech, DOI: 10.5772/55573.

Yau, Y. Y. y Stewart, C. N. Jr. (2013). Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants. BMC BIOTECHNOLOGY 13, 36. <https://doi.org/10.1186/1472-6750-13-36>.

Sekan, A. S., Isayenkov, S. V. y Blume, Y. B. (2015). Development of Marker-Free Transformants by Site-Specific Recombinases. CYTOLOGY AND GENETICS 49, 397-407. <https://doi.org/10.3103/S0095452715060080>.