

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

I-El plásmido Ti. Construcciones génicas

Apellidos, nombre	Gisbert Doménech, Carmina (cgisbert@btc.upv.es)
Departamento	Departamento de Biotecnología
Centro	ETSIAMN-Universidad Politécnica de Valencia

1 Resumen de las ideas clave

En este artículo se va a explicar en qué se basa la transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*), las características del plásmido Ti y cómo se modifica éste para construir vectores que utilizamos en la transformación de plantas.

2 Introducción

La introducción de genes o la modificación de los genes intrínsecos de la planta utilizando métodos de transformación genética se conoce como transformación genética y puede realizarse con distintos fines, entre ellos, la mejora vegetal y el estudio de la función génica.

Entre los métodos de transformación genética disponibles, la transformación mediada por la bacteria *A. tumefaciens* es el más extendido. *A. tumefaciens* actualmente clasificada como *R. radiobacter*, es una bacteria Gram negativa que está en el suelo y que es capaz de infectar a numerosas especies de plantas dicotiledóneas y a algunas monocotiledóneas y gimnospermas. Tras la infección, es capaz de transferir una parte de la información genética que contiene en un plásmido y de integrarla en el genoma de la planta. Al plásmido se le conoce como plásmido Ti (inductor de tumores) y a la región que se transfiere como T-DNA (DNA transferido).

Como consecuencia de la infección por *A. tumefaciens* se producen en la planta tumores que son consecuencia de la expresión de genes de síntesis de auxinas y citoquininas que están en el T-DNA. Además de estos genes, también se transfieren otros presentes en el T-DNA que codifican la síntesis de opinas (nopalina, octopina, manopina, agropina). Las opinas son el resultado de la condensación de un aminoácido y un cetoácido. Estos compuestos no los metaboliza la planta y sirven a la bacteria como fuente de carbono y nitrógeno.

El hombre ha modificado los plásmidos de esta bacteria patógena de plantas para utilizarlos como vectores de inserción de genes de su interés como por ejemplo, un gen que confiera resistencia a insectos.

3 Objetivos

El objetivo de este artículo docente es que los alumnos conozcan la base de la transformación mediada por *A. tumefaciens*:

- La estructura del plásmido Ti.
- La base para construir vectores que permiten la transferencia de genes de interés.

4 Desarrollo

El plásmido Ti

Los plásmidos Ti son plásmidos de DNA circular de doble cadena y de gran tamaño (200-800 Kb).

En un plásmido de este tipo (Figura 1) podemos distinguir:

- Un origen de replicación que le permite mantenerse de forma estable en la bacteria.
- La región *vir* que está constituida por distintos genes de virulencia (hasta 25 descritos); dos de ellos (*virA* y *virG*), de expresión constitutiva y necesaria para la activación transcripcional de otros genes como *virB*, *virC*, *virD* y *virE*.
- La región de transferencia (T-DNA) delimitada por dos bordes (de 24-25 pares de bases) que se conocen como borde derecho (RD; right border) y borde izquierdo (LD; left border) que están muy conservados entre los distintos plásmidos Ti. En esta región se localizan un grupo de genes (*iaaM*, *iaaH* e *ipt*) que codifican enzimas para la síntesis de auxinas y citoquininas (hormonas vegetales implicadas en la división y otros procesos del desarrollo vegetal) y algún gen de síntesis de opinas como el gen *ocs* que codifica la octopina-sintasa, el gen *nos* que codifica la nopalina-sintasa o el gen *acs* que codifica la agropina-sintasa.
- Genes que codifican enzimas para el catabolismo de las opinas que se sintetizan y que le sirven de alimento a la bacteria.

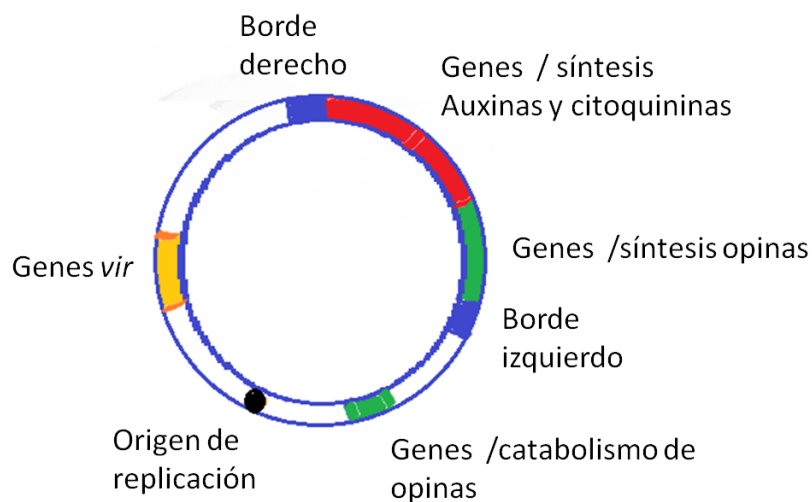


Figura 1. Estructura de un plásmido Ti

La transferencia del T-DNA

La transferencia del T-DNA al genoma de la planta es un proceso complejo conocido sólo en parte. Para que se de este proceso es necesario que estén presentes los bordes flanqueantes del T-DNA, los genes *vir* (activados) y también otros genes codificados por el cromosoma bacteriano (i.e. *ros*, *ivr*) que son necesarios para que se realice la unión de la bacteria a la célula vegetal dañada.

De una manera muy simplificada podemos decir que la transferencia se produce así. Los compuestos fenólicos como por ejemplo la acetosiringona que generalmente exuda la planta como consecuencia de una herida, son reconocidos por *virA* que se autofosforila en un residuo de histidina específico y que se transmite posteriormente a *virG*, siendo éste el que activa la transcripción de otros genes *vir*. Los productos resultantes de la activación del gen *virD*; VirD1 (topoisomerasa) y VirD2 (endonucleasa), realizan dos muescas en la cadena de DNA en la zona comprendida entre los bordes del T-DNA. Tras el corte, VirD2 permanece covalentemente unida al extremo 5' de la hebra de DNA impidiendo la delección de este extremo. El DNA de simple cadena que se libera se recubre por proteínas VIRE2, que protegen al DNA de la degradación por nucleasas a la vez que lo dirigen hacia el genoma de la célula vegetal. En el transporte a través de la membrana bacteriana están implicados los productos del operón *virB*. En algún momento del proceso, el T-DNA es convertido a su forma bicatenaria y el hueco que queda monocatenario en el plásmido Ti es reparado por sistemas celulares. La bacteria produce un *pillus* (tubo proteico) a través del cual es conducido el T-DNA ("T-strand") al citoplasma celular. Además de los genes presentes en el plásmido Ti, se han descrito distintos loci cromosómicos que también afectan a la expresión de los genes *vir* y son partícipes del proceso.

La integración del T-DNA en el genoma de la planta se realiza aparentemente al azar, aunque parece ser que con mayor probabilidad en aquellas zonas ricas en genes y en regiones transcripcionalmente activas. El proceso de transferencia no es del todo preciso puesto que es frecuente la inserción de la zona que contiene el extremo 5' pero no es raro encontrar el extremo izquierdo acortado.

Vectores para la transferencia de genes de interés

A partir del plásmido Ti se han desarrollado distintos vectores que permiten su utilización para la transformación de plantas con el fin de introducir genes de nuestro interés.

En general, el primer paso para el desarrollo de estos vectores ha sido la eliminación de los oncogenes (genes responsables de la formación de tumores) de los plásmidos Ti. A los plásmidos resultantes se les denomina desarmados. Normalmente, además de eliminar los genes que codifican enzimas para la síntesis de hormonas vegetales, se eliminan aquellos que codifican opinas.

A partir de los vectores desarmados se pueden construir distintos tipos de vectores que podríamos dividir en dos bloques:

- **Vectores cointegrados.** Se obtienen vía recombinación homóloga entre el plásmido desarmado y otro preparado en el laboratorio (Figura 2A). Este último será el portador de un T-DNA que contendrá el gen de interés (i.e. un gen que codifique una proteína que confiera resistencia a insectos) y, en la mayoría de los casos, otro gen que facilite la selección de las células transformadas (i.e. un gen que confiera resistencia a un antibiótico).

- Vectores binarios.** En este caso, el plásmido de laboratorio se elabora de manera que contenga una región portadora de los bordes derecho e izquierdo y entre ambos, los genes de interés (como en el caso anterior en la mayoría de construcciones, el gen de interés y otro de selección). Este plásmido se introduce en una cepa de *Agrobacterium* que contiene un plásmido desarmado es decir, que no contiene los genes de su región de transferencia. De este modo, la bacteria es portadora de dos plásmidos de pequeño tamaño (Figura 2B). Puesto que la transferencia del T-DNA puede realizarse en trans, los genes *vir* del plásmido desarmado se encargarán de realizar el corte y la transferencia del T-DNA del plásmido elaborado.

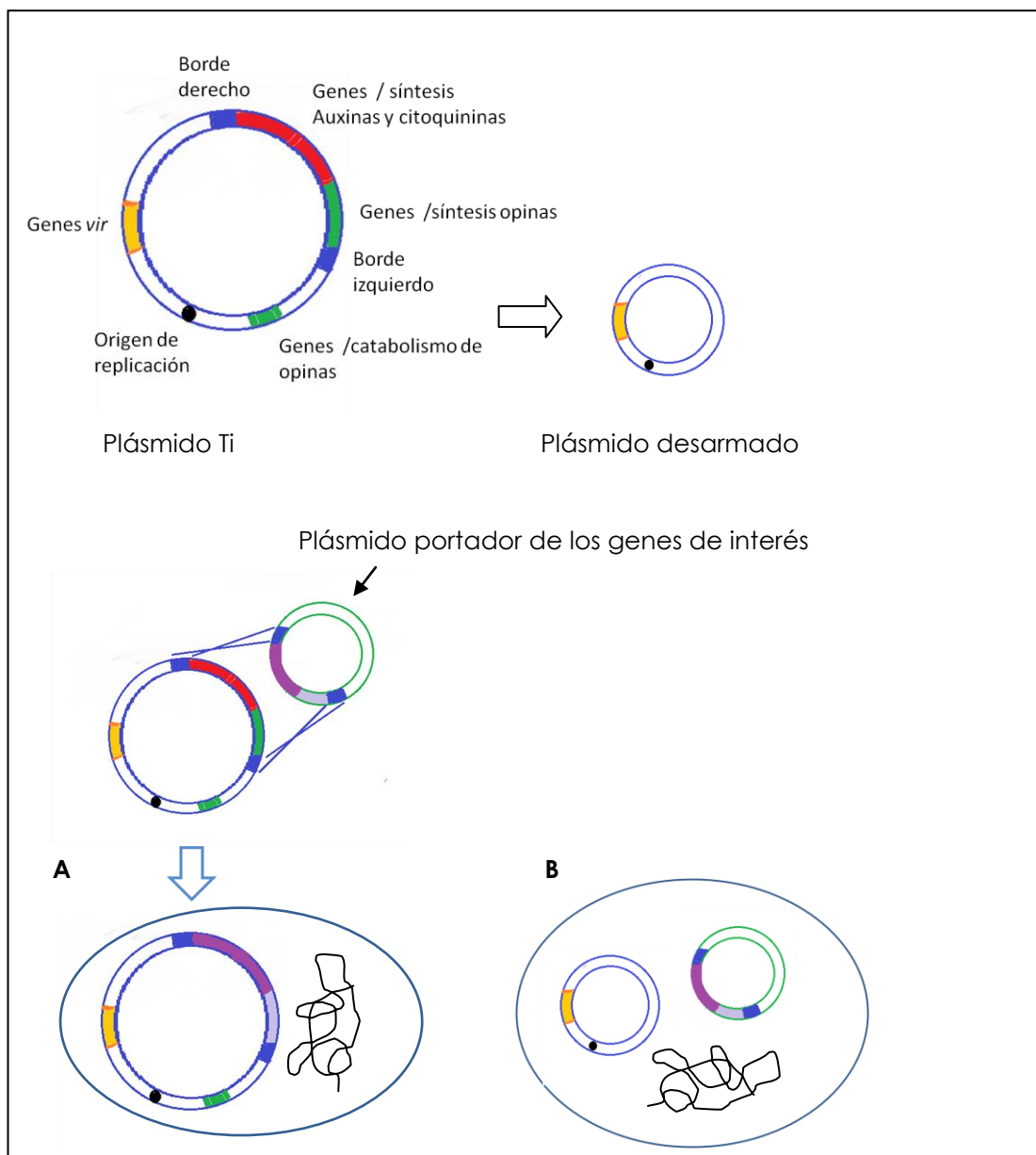


Figura 2. Representación esquemática de una bacteria portadora de un plásmido cointegrado (A) y de un plásmido binario (B).

5 Cierre

En los apartados de introducción y desarrollo se ha pretendido aclarar distintos conceptos y procesos que se resumen en el siguiente esquema. Comprueba al leerlo si estos conceptos te han quedado claros.

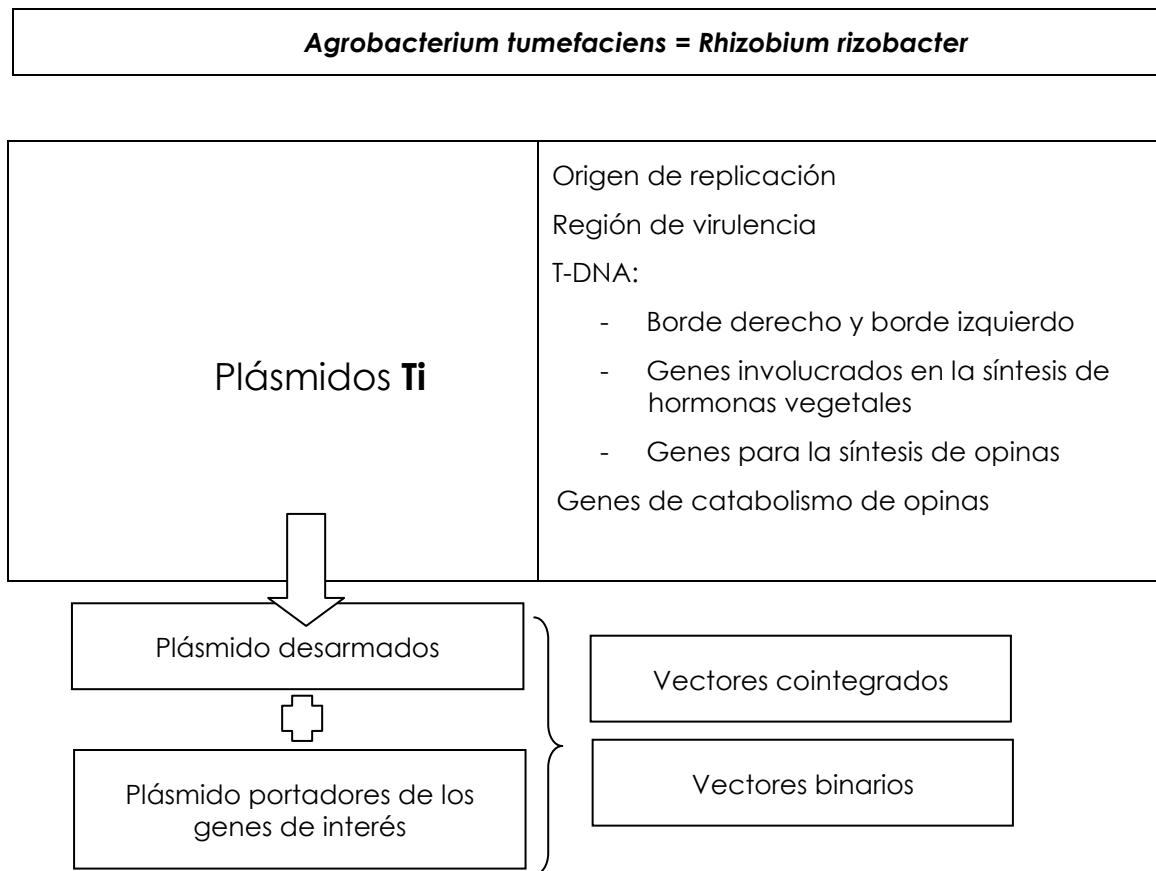


Figura 3. Esquema

Bibliografía

- GISBERT, C., FITA, A., DÍEZ, M.J. “Prácticas de cultivo in vitro y transformación genética de plantas”. Editorial UPV, Valencia 2008.
- NEAL, C. Plant Biotechnology and Genetics: Principles, Technique, and Applications. Editorial Wiley, New Jersey 2008.
- PERERA, J., TORMO, A., GARCÍA, J.L. “Ingeniería Genética” Vol.II. Editorial Síntesis, Madrid 2002.