



Eliminación de genes marcadores de selección de las plantas transgénicas mediante co-transformación de un gen marcador y el gen de interés seguida de segregación

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

Para producir plantas transgénicas en la biotecnología actual, se utilizan genes marcadores de selección (GMS) ya que facilitan la selección de las plantas transformadas de las no transformadas. Sin embargo, después de que se haya producido el evento transgénico, el GSM en el genoma de las plantas transgénicas no sirve de nada. Además, la presencia de este tipo de genes que, por lo general, expresan productos proteínicos que confieren resistencia a antibióticos o herbicidas, genera una gran preocupación social si estas plantas son comercializadas, debido a su presencia en los alimentos, los piensos y el medio ambiente. Por ello, la eliminación de los GSM de las plantas transgénicas, especialmente de los productos comerciales, ha recibido una gran atención en los últimos años. Son varias las tecnologías disponibles, siendo una de las más empleadas la de la **co-transformación**, es decir, transformación separada del GSM y del gen de interés (GI) y la posterior eliminación del GSM por cruzamiento y segregación en la siguiente generación.

2 Introducción

¿Por qué son necesarios los GSM 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 las células transformadas. Su presencia permite 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.

¿Cuáles son los GSM 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 herbicidas glifosato y fosfinotricina, respectivamente. Los antibióticos y herbicidas matan las células no transformadas, que son la mayoría, mientras que las células transformadas con GSM pueden sobrevivir.

¿Por qué los GSM 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 GSM 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 GSM 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 genéticamente modificadas 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) eliminación del GMS por **recombinasas específicas del sitio** (p. ej., los sistemas Cre/loxP, FLP/FRT y R/RS); (ii) sistemas de expulsión basados en **transposones** (p. ej., el transposón Ac/Ds de maíz); (iii) escisión basada en la **recombinación intracromosómica**; y (iv) **co-transformación**, es decir, transformación separada del GMS y del GI y eliminación del GMS por cruzamiento y segregación en la siguiente generación, estrategia que se describe en este artículo docente.

3 Objetivo

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

- Entender cómo obtener plantas transgénicas libres del GMS mediante las diferentes versiones de **co-transformación** con un GMS y un GI.

4 Desarrollo

En la actualidad, se aplican varias estrategias para la creación de plantas transgénicas sin marcadores de selección. Mediante la estrategia de la co-transformación, el GI y el GMS se clonan en dos moléculas diferentes de ADN. Posteriormente, ambos genes se transfieren a los tejidos de las plantas utilizando la transformación mediada por *Agrobacterium* o el bombardeo de partículas. El fundamento de este enfoque consiste en que los dos genes se integren en diferentes regiones del genoma de la planta. Inicialmente, se seleccionarán en medio selectivo las plantas transgénicas resistentes al antibiótico (o herbicida) y luego entre ellas se identificarán las plantas que contengan también el GI. Las plantas transgénicas que hayan integrado los dos genes se cruzarán con plantas no transgénicas para la eliminación del GMS por segregación en la siguiente generación. El GMS y el GI pueden ser introducidos en la planta mediante el empleo de diferentes enfoques:

1- Dos ADNs de transferencia (ADN-T) en dos vectores binarios. En el ADN-T de un vector está clonado el GI y en del otro el GMS. Para la co-transformación mediante *Agrobacterium* se pueden emplear dos métodos: (1) El **método de la mezcla**, en el que se emplean dos cepas diferentes de



Agrobacterium cada una con un vector (Figura 1A), y (2) el **método de la cepa única**, en el que se emplea una única cepa de *Agrobacterium* que lleva los dos vectores binarios (Figura 1B).

2- Dos ADN-T en un vector binario (vector superbinario). También es posible utilizar una única cepa de *Agrobacterium* que contiene un único vector binario con dos ADN-T separados (Figura 1C), con la intención de que los dos ADN-T se integren independientemente.

3- Co-transformación utilizando bombardeo de partículas. El método del co-bombardeo es análogo al método de transformación mediado por *Agrobacterium* con dos ADN-T. Mediante el uso de co-bombardeo (Figura 1D), los ADN lineales portadores del GI y del GMS son depositados sobre partículas de oro y disparados a las células del tejido vegetal con el objetivo final de que se integren en diferentes regiones del genoma de la planta.

Aunque se han obtenido numerosas plantas transgénicas libres del GMS, la estrategia de la co-transformación tiene algunas limitaciones. Con frecuencia se observa la co-integración de ambos ADN-T en el mismo *locus* genómico, lo que conlleva la unión entre el GMS y el GI, que hace imposible su segregación. Este fenómeno se ha observado con mayor frecuencia cuando se emplea la transformación mediada por bombardeo de partículas. Otra limitación es que estos métodos no pueden aplicarse a plantas estériles y especies de propagación vegetativa, y no son prácticos en plantas con un ciclo de vida largo como los árboles. Este enfoque requiere una alta frecuencia de transformación, que la inserción del GI y del GMS se produzca en diferentes *loci*, y la realización de cruzamientos adicionales para eliminar el GMS, lo que lo convierte en un trabajo que requiere mucha mano de obra.

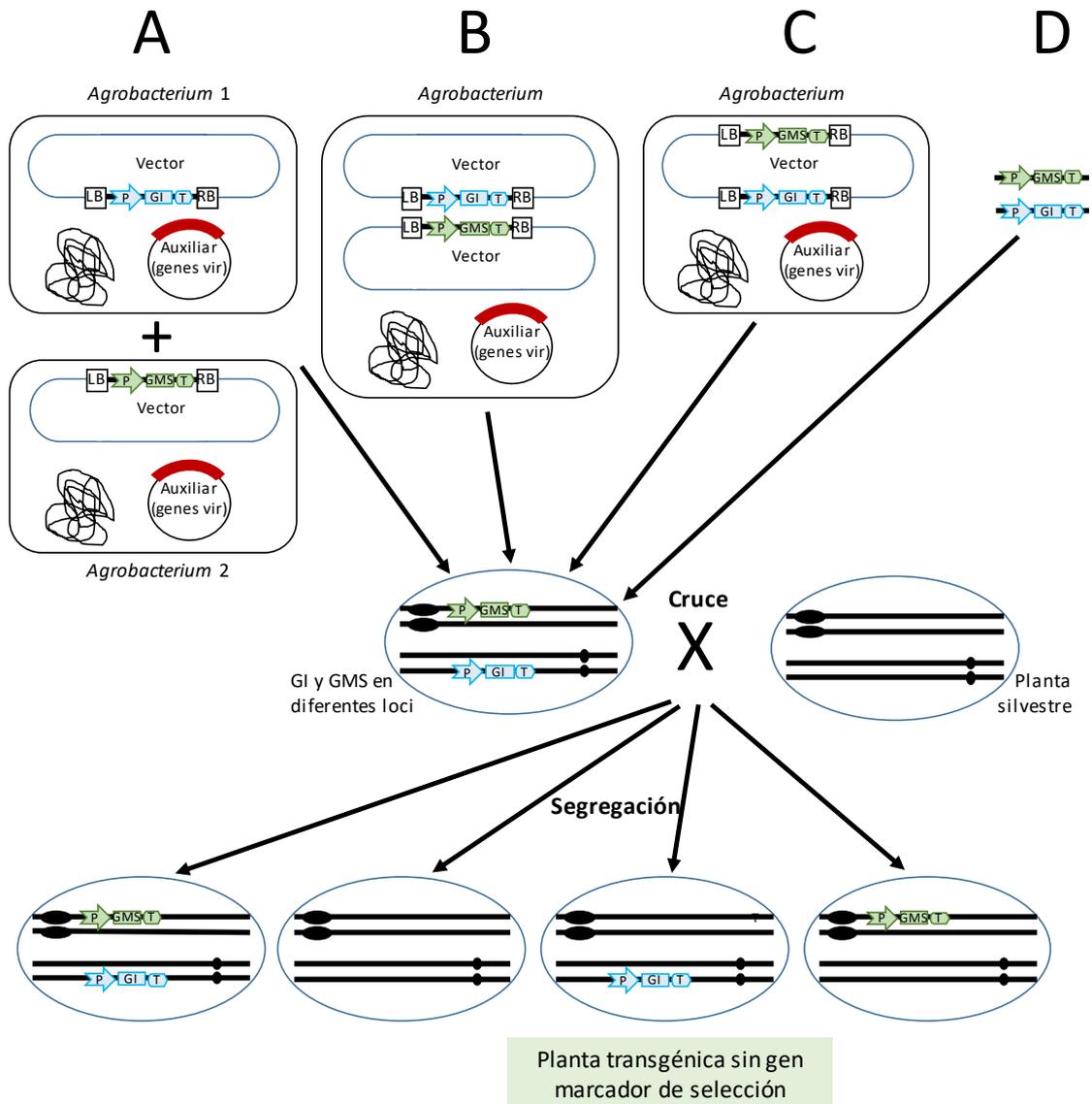


Figura 1. Estrategias de co-transformación/segregación para obtener plantas transgénicas libres del gen marcador de selección (GMS). Cuando el GI y el GMS se integran por separado en diferentes *loci*, se pueden obtener plantas transgénicas sin el GMS en la siguiente generación tras el cruzamiento con una planta no transgénica y segregación genética. **(A)** Co-transformación con *Agrobacterium* mediante el método de la mezcla de cepas. Dos cepas de *Agrobacterium* contienen cada una un vector de transformación. Un vector lleva el GI y el otro el GMS, las cuales se usan juntas para co-transformar plantas. **(B)** Co-transformación con *Agrobacterium* mediante el método de una sola cepa. Una cepa de *Agrobacterium* contiene dos vectores de transformación; uno con el GI y el otro con el GMS. **(C)** Co-transformación mediante el empleo de un vector superbinario. El vector contiene separadas las dos construcciones de ADN-T; una con el GI y la otra con el GMS. **(D)** Los dos genes también pueden ser introducidos mediante un método de transferencia directa de genes, como el bombardeo de partículas. Abreviaturas: **LB**, borde izquierdo del ADN-T; **RB**, borde derecho del ADN-T; **P**, promotor; **T**, terminador; **GI**, gen de interés; **GMS**, gen marcador de selección.



Estrategias mejoradas de co-transformación para la eliminación del GMS

Aunque el uso de la co-transformación para la eliminación del GMS no es complicado, la caracterización de las plantas por PCR puede requerir mucho tiempo y ser tediosa. Por ello, se han desarrollado otras estrategias para aumentar la eficiencia. Incluyen (1) el uso combinado de un marcador de selección negativa con el marcador de selección positiva; (2) selección transitoria de las plantas transgénicas mediante el GMS; y (3) el uso de androgénesis junto con la técnica de la co-transformación.

4.1 Co-transformación mediante el empleo del sistema de selección positiva-negativa

En un experimento de co-transformación, se usa un GMS positiva (tales como los genes *nptII* o *bar*) para co-transformarse con un GI. Las plantas T_0 seleccionadas (ya sea solo con el GMS o con ambos; GMS y GI) se cruzan con plantas no transgénicas y en la siguiente generación (T_1) se pueden seleccionar plantas transgénicas sólo con el GI. Sin embargo, sin la ayuda de marcadores de selección negativa, esta práctica requiere un cribado basado en PCR a gran escala para aislar de la población segregante las plantas transgénicas libres del GMS. Los marcadores de selección negativa se utilizan para optimizar la eficiencia de la transformación; al contrario de los GMS positiva, los negativos matan las células transformadas. En este método de selección positiva-negativa se coloca en la construcción un GMS negativa junto a un GMS positiva. El GMS positiva se usa para la selección de las plantas transgénicas T_0 , y el GMS negativa se usa luego para eliminar las plantas que aún albergan el casete " GMS negativa" de la subsiguiente población segregante T_1 , con lo que se reduce considerablemente el número de plantas transgénicas en las que los investigadores tienen que realizar la detección de las plantas transgénicas solo con el GI (Figura 2).

El GMS negativa más ampliamente utilizado para la selección de plantas transgénicas es el gen *codA* de *Escherichia coli*. El gen *codA* codifica una citosina desaminasa que convierte el compuesto no tóxico 5-fluorocitosina (5-FC) en el compuesto tóxico 5-fluorouracilo (5-FU). El desarrollo de plántulas que expresan el gen *codA* se inhibe al germinar las semillas en presencia de 5-FC. También se utilizan otros GMS negativa como los genes *iaaH* y *argE* para matar o inhibir el crecimiento de las plantas transgénicas. El gen *iaaH* codifica una indol acetamida hidrolasa que convierte la naftalina acetamida (NAM) en ácido naftalenacético (NAA), lo que produce la inhibición del crecimiento normal de la planta. El gen *argE* de *E. coli* codifica la ornitina desacetilasa que desacetila la inactiva N-acetilfosfotricina (N-acetil-PPT), un producto químico que no es tóxico para las plantas y produce fosfotricina (PPT), el ingrediente activo del herbicida no selectivo Basta®.

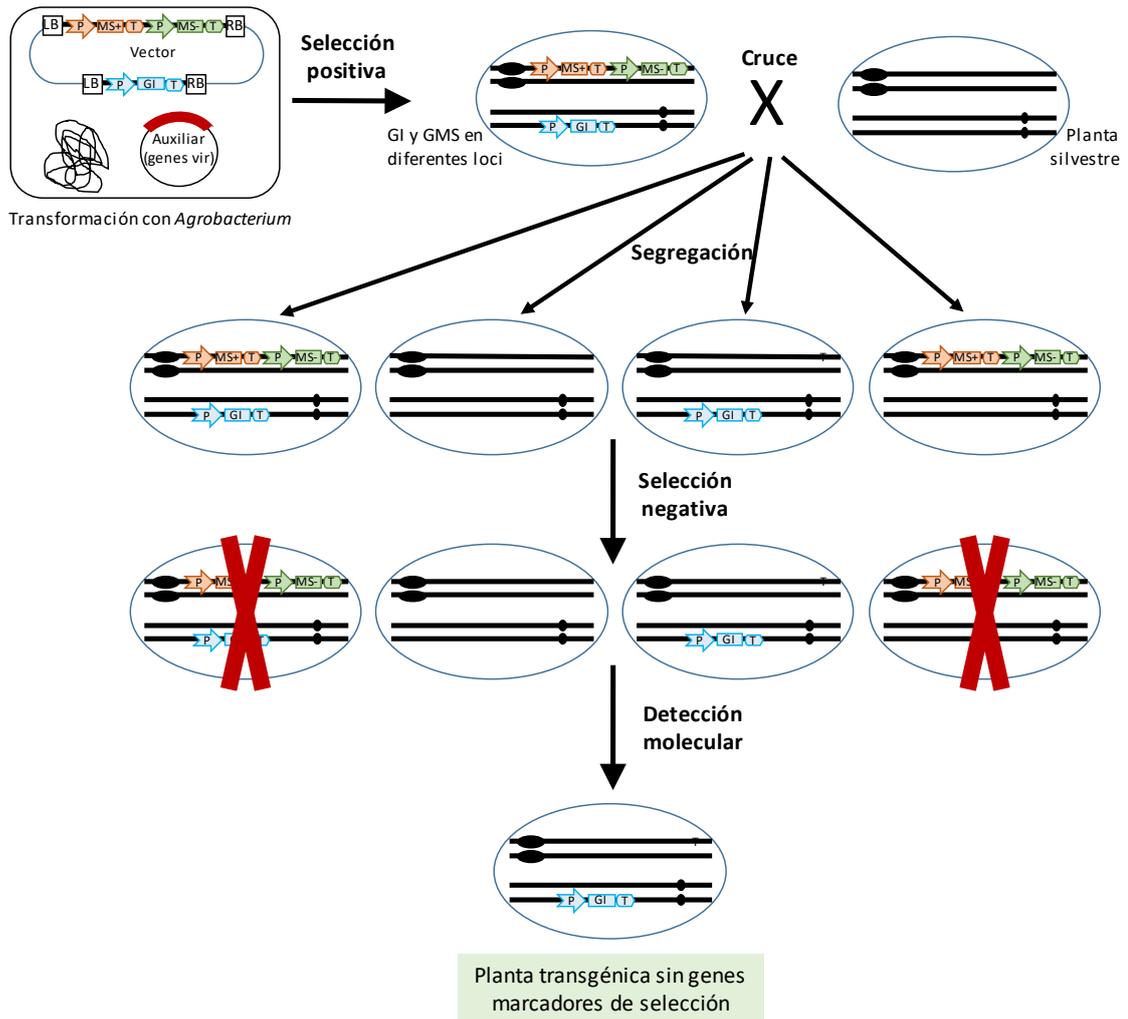


Figura 1. Esquema de selección positiva-negativa en la producción de plantas transgénicas libres del gen marcador de selección (GMS). Se coloca un gen marcador de selección negativa (MS-) junto a un gen marcador de selección positiva (MS+), como se muestra en la figura. Después de la co-transformación genética, los explantes se seleccionan primero con el MS+. Tras el cruce con una planta no transgénica, las semillas de la siguiente generación se seleccionan con el MS- para eliminar el 50% de las plantas que aún tienen los genes marcadores. Posteriormente, mediante PCR se pueden seleccionar las plantas transgénicas libres de los genes marcadores de selección. Abreviaturas: **LB**, borde izquierdo del ADN-T; **RB**, borde derecho del ADN-T; **P**, promotor; **T**, terminador; **GI**, gen de interés; **MS+**, gen marcador de selección positiva; **MS-**, gen marcador de selección negativa.

4.2 Selección positiva transitoria de plantas transformadas

La mayoría de las estrategias de eliminación de GMS en el sistema de co-transformación requieren dos pasos: primero, las construcciones con el GI y con el GMS se introducen en las células para obtener plantas transgénicas T₀ con una selección positiva adecuada y posteriormente, el GMS se elimina en la generación T₁ por segregación genética. Sin embargo, si los GI y GMS



podieran separarse al principio de la generación T_0 , habría una ventaja doble: (1) se aceleraría el proceso de obtención de las plantas transgénicas, y (2) se obviaría el proceso de segregación para eliminar el GMS en la generación T_1 . Esto sería de especial interés para las plantas de propagación asexual que no pasan por una etapa de segregación. Esta estrategia se basa en que los transgenes transferidos a las células vegetales no siempre son integrados de manera estable en el genoma. En algunos casos, un DNA-T no integrado (con GMS) y un GI integrado establemente pueden coexistir en algunas células. Con una breve fase de selección, esas células pueden sobrevivir en el medio selectivo gracias a la expresión transitoria del GMS.

4.3 Obtención de plantas sin el gen marcador de selección mediante segregación androgénica después de la co-transformación

En la androgénesis se detiene el desarrollo del polen para forzarlo hacia una vía de desarrollo somático. La androgénesis *in vitro* se puede lograr utilizando microsporas que llevan a la formación de células haploides y plantas por la vía de la embriogénesis directa o por la vía de la formación de callos. Plantas transgénicas libres del GMS, pero con el GI se pueden obtener a través de la segregación androgénica mediante un cultivo de anteras después de la co-transformación. Después de la co-transformación, con ADN-T en diferentes *loci*, las anteras de las plantas transgénicas regeneradas se pueden usar para la inducción de la androgénesis a través del cultivo de anteras. Debido a que los cromosomas haploides pueden dividirse y diploidizarse espontáneamente durante el cultivo de anteras, esta práctica podría usarse para producir plantas homocigotas doble haploides (DH) y libres de marcadores.

5 Cierre

Los 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. Sin embargo, una vez producido el evento transgénico la presencia de estos genes en el genoma de las plantas no es útil y, aunque ni estos genes ni sus productos muestren efectos adversos para los humanos, animales o seguridad para el medio ambiente, su persistencia es indeseable o inaceptable para el público en general. Por ello, se han desarrollado diferentes estrategias que permiten obtener plantas libres de GMS.

Una de las estrategias más populares es la de la co-transformación, es decir, transformación separada del GMS y del GI y la posterior eliminación del GMS por cruzamiento y segregación en la siguiente generación. La eficacia de esta estrategia se ha demostrado ampliamente tanto en plantas dicotiledóneas como en monocotiledóneas



6 Bibliografía

6.1 Referencias de fuentes electrónicas:

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.

Darbani, B., Eimanifar, A., Stewart, C. N. Jr., Camargo, W. C. (2007) Methods to produce marker-free transgenic plants. *BIOTECHNOLOGY JOURNAL* 2, 83–90. DOI <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/biot.200600182>.

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>.