

Cuaderno N° 18, edición 2021

Elaboración de una planta transgénica: Técnica de *Agrobacterium tumefaciens*

***La técnica de elaboración de una planta transgénica por Biobalística está explicada en el Cuaderno N° 28.**

Una de las variables que contribuye a aumentar la productividad agrícola es el mejoramiento genético de los cultivos, ya sea mediante métodos convencionales o por técnicas de ingeniería genética (ver Cuadernos N° 4, 5 y 78). Las técnicas de ingeniería genética y el uso de nuevos conocimientos científicos permiten modificar los organismos mediante intervenciones precisas, rápidas y predictivas.

Con el desarrollo de la metodología de cultivo de tejidos y de la ingeniería genética se ampliaron considerablemente los límites de disponibilidad de genes impuestos por la incompatibilidad sexual en el mejoramiento convencional de plantas. Es decir que mediante ingeniería genética es posible transferir a las plantas información genética de organismos no emparentados. En la actualidad esta metodología es aplicada rutinariamente y son muchos los esfuerzos y los recursos que se invierten con el objetivo de optimizar la técnica para trasladarla a diferentes especies vegetales.

Hasta el momento no sólo se han obtenido variedades transgénicas de cultivos agronómicos como maíz o soja, sino también de otras especies vegetales con el fin de usarlas por ejemplo en la biorremediación de ambientes degradados, en la producción de vacunas, o para la obtención de bioplásticos o de biocombustibles, entre otros desarrollos (ver Cuadernos N° 46, 48, 58 y 74).

¿Cómo se modifica una planta por ingeniería genética?

La transformación genética de plantas consiste en la transferencia de material genético proveniente del mismo u otro organismo. En general, involucra el cultivo de células o tejidos *in vitro*, dado que la transferencia de genes se realiza a algunas células del organismo que se quiere transformar. A partir de estas células se regeneran plantas completas, que llevan los genes transferidos, los expresan y los transmiten a la descendencia. Las plantas transgénicas así obtenidas son incluidas luego en planes de mejoramiento tradicional a través de cruzamientos (reproducción sexual) para transferir los genes de interés a variedades de alto rendimiento.

Mientras una gran variedad de estrategias de regeneración y transformación son aplicables a muchos cultivos, algunas veces se requieren protocolos (recetas) muy particulares y específicos. Por lo tanto, antes de elegir un sistema de transformación vegetal, se requiere establecer una metodología rápida y eficiente de cultivo *in vitro* que permita regenerar plantas completas y fértiles de la especie de interés.

Métodos de transformación de plantas

Diferentes sistemas de transformación de plantas han sido desarrollados con el objeto de hacer más fácil y eficiente esta metodología. Estos métodos se dividen en:

- a) Transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: un vector biológico que participa de la transferencia;
- b) Métodos de transformación genética directos: por distintos mecanismos físicos se introduce el ADN en la célula (ver Cuaderno N° 28).

Construcción de un vector

En las técnicas de transformación es necesario disponer del gen de interés dentro de un vector

(vehículo) apropiado para ser transferido al tejido que se quiere transformar. Este vector es generalmente un plásmido (porción de ADN circular relativamente pequeño que puede mantenerse en el citoplasma de una bacteria u otro tipo celular) al que se le inserta el gen de interés (ver Cuaderno N° 67). Otro punto esencial es el establecimiento de un sistema que permita identificar las células o tejidos transformados. Para esto, en el segmento de ADN que se va a transferir se agrega junto al gen de interés un gen auxiliar llamado gen o marcador de selección.



El gen que va a ser transferido o transgén está compuesto por una secuencia codificante (el gen de interés) y por secuencias regulatorias. Las secuencias regulatorias son los promotores (P) que determinan el momento, lugar y nivel de expresión de cada gen y los terminadores (T), que indican la terminación de la transcripción (proceso que interviene en la expresión del gen).

El gen de selección, en general, confiere a las células transgénicas que lo expresan una ventaja con respecto a las células no transgénicas, como por ejemplo resistencia a un antibiótico o herbicida. De esta forma aquellas células o tejidos que hayan recibido el gen de selección sobrevivirán en un medio de cultivo que contenga además de los nutrientes necesarios el agente selector (antibiótico o herbicida), mientras que las no transgénicas no sobrevivirán. Al seleccionar células resistentes al agente selector (por ej. herbicida) se tiene una evidencia indirecta de que el gen de interés ha sido transferido. Esto es importante ya que mediante el uso de un sistema de selección en las primeras etapas es posible evidenciar tempranamente la eficiencia de la metodología de transformación y acotar el trabajo de cultivo de tejidos a las células que sean seleccionadas como transgénicas, con un importante ahorro en costo y mano de obra.

En etapas más avanzadas, es posible comprobar la integración al genoma vegetal y la expresión del gen de interés mediante diferentes técnicas moleculares (ver Cuaderno N° 67).

***Agrobacterium tumefaciens*: un ingeniero genético por naturaleza**

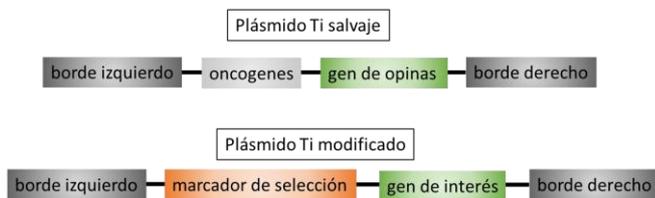
El método más difundido para la transformación genética de plantas se basa en un proceso mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, una bacteria que vive en el suelo e infecta a un amplio rango de plantas. Esta bacteria tiene como blanco de infección a las heridas en el tallo o raíces de la planta inmediatamente sobre el nivel del suelo, donde ataca a las células, causando su proliferación y formación de tumores. Esta enfermedad se conoce como “agalla de la corona”.

El desarrollo de los tumores se debe a que *Agrobacterium* tiene la capacidad de transferir parte de su propio material genético a la planta hospedante. La capacidad patogénica de esta bacteria se asocia a la presencia de plásmidos Ti (inductor de tumor). Se ha demostrado que un fragmento de estos plásmidos, llamado ADN-T (ADN de transferencia), es transferido a la célula vegetal donde se integra al ADN cromosómico de la planta. La transferencia de ADN es inducida por la expresión de unos genes llamados vir que se encuentran en el plásmido Ti por fuera de la secuencia que se transfiere.

Dentro del ADN-T se encuentran genes bacterianos que intervienen en la síntesis de fitohormonas (hormonas vegetales) que causan la proliferación celular. También genes que participan de la síntesis de una serie de compuestos denominados opinas, los que son secretados y utilizados como nutrientes por *Agrobacterium*. De esta forma la bacteria dirige genéticamente el metabolismo de la planta para su propio beneficio.

Transformación vegetal mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

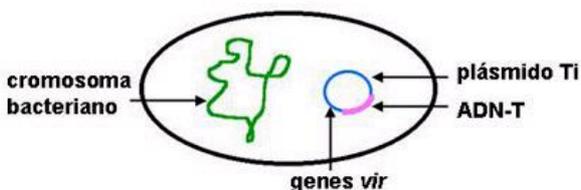
El mecanismo natural de ingeniería genética utilizado por *Agrobacterium* para transferir parte de su ADN a las células vegetales, es aprovechado por los investigadores para transferir genes de interés a las plantas. Para ello, primero los científicos trabajan con el plásmido Ti, en el cual reemplazan la secuencia original de ADN-T que porta los genes responsables de la formación de tumores y los genes de síntesis de opinas, por otra secuencia nueva con el gen de interés y algún gen de selección (de antibióticos o herbicidas).



Estructura del ADN-T

Los bordes derecho e izquierdo son necesarios para dirigir el procesamiento del ADN-T. Cualquier fragmento de ADN ubicado entre estos bordes puede ser transferido a la célula vegetal.

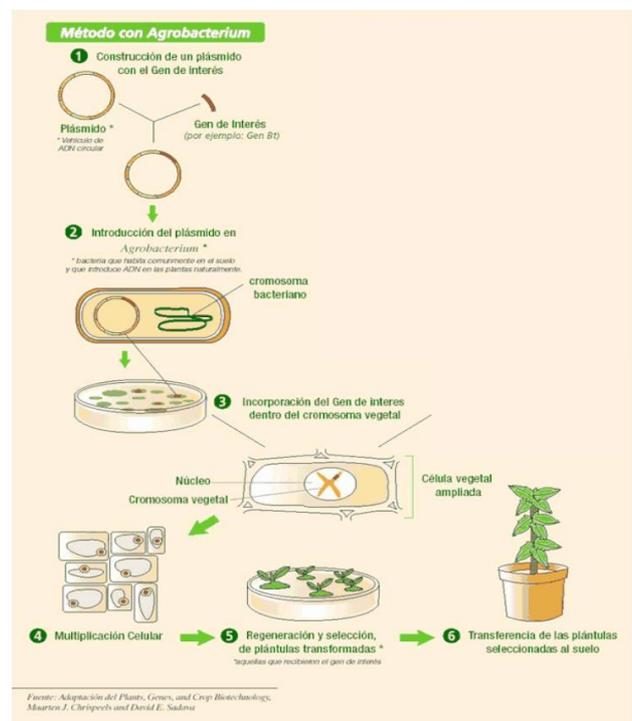
El plásmido obtenido llevando el transgén (sin las secuencias patogénicas), se transfiere a células de *Agrobacterium*. Luego, la bacteria portando el nuevo plásmido es utilizada para transformar células vegetales.



Dentro del plásmido Ti existe una zona donde se encuentran los genes *vir* que son responsables del procesamiento, corte y transferencia del ADN-T. La transformación de la planta se induce a partir

del contacto entre la bacteria que porta el gen de interés en su plásmido y las células vegetales (por ej. hojas, cotiledones, etc.). El ADN-T es transportado desde la célula bacteriana a la célula vegetal donde se integra a su material genético.

Después de la transformación, el tejido vegetal es cultivado *in vitro* en un medio con un agente selector (antibióticos o herbicidas) donde sólo las células transgénicas sobreviven.



Las células vegetales son totipotentes, quiere decir que una célula de cualquier parte de la planta puede multiplicarse y generar la planta completa. Para eso las células deben crecer en el medio de cultivo adecuado y en presencia de determinadas hormonas vegetales. El resultado de esta etapa es una planta completa que lleva el gen de interés en cada una de sus células.

Una vez obtenida una planta transgénica, para que su cultivo y comercialización sean factibles, deberá presentarse una solicitud ante los organismos reguladores correspondientes que son quienes

determinarán la realización de los ensayos necesarios para el estudio de la bioseguridad ambiental y alimentaria y los efectos de su comercialización y, en última instancia, darán o no la aprobación del cultivo transgénico (ver Cuadernos N° 10, 19, y 62).

Actividades

Objetivos

- Repasar los conceptos trabajados en el texto.
- Interpretar representaciones gráficas que explican el tema.
- Planificar y desarrollar una investigación en el tema.

Destinatarios y conceptos relacionados

Las actividades referidas a este Cuaderno están destinadas a alumnos entre 13 y 17 años y también para nivel terciario. Es importante profundizar en la metodología de la transgénesis a través del trabajo con Cuadernos posteriores. Este tema se relaciona con los siguientes conceptos: microorganismos; bacterias, estructura y su utilidad para el hombre; agricultura tradicional y moderna; ingeniería genética; ADN: estructura y función; gen y expresión genética; cultivo de células *in vitro*.

Consideraciones metodológicas

Este Cuaderno, al igual que las actividades que se sugieren, aportan una base para la comprensión de la transgénesis, y de los métodos que emplea la ingeniería genética para lograrlo. Se recomienda haber trabajado previamente cuadernos anteriores que abordan contenidos básicos y también completar con la otra técnica de transformación de plantas (Biobalística) explicada en el Cuaderno N° 28.)

Al trabajar el tema de mejoramiento vegetal mediante transformación genética es importante

tener siempre presente la diferenciación entre mejoramiento convencional (cruzamiento y mutagénesis) y mejoramiento mediante ingeniería genética. A su vez, es importante enfatizar que en ambos casos se trata de modificación genética, aunque mediante diferentes técnicas y con diferentes resultados (en cuanto a direccionalidad y previsibilidad de los cambios), y que la biotecnología moderna viene a complementar prácticas convencionales. Se sugiere trabajar este aspecto con ayuda de la lámina "Mejoramiento vegetal hoy: transgénicos y otras técnicas".



[https://www.porquebiotecnologia.com.ar/recursos/Mejoramiento vegetal hoy.pdf](https://www.porquebiotecnologia.com.ar/recursos/Mejoramiento_vegetal_hoy.pdf)

Es importante que los alumnos puedan interpretar y explicar con sus propias palabras lo que representa el esquema. El paso de imagen a palabra y de palabra a imagen (mediante la construcción de esquemas o imágenes) es un proceso fundamental en la comprensión conceptual.

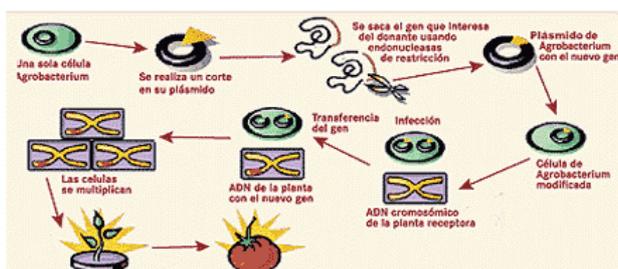
En la actividad 1 se sugiere otro esquema para poner en práctica el pasaje de un lenguaje a otro, y evidenciar si los alumnos presentan dificultades en la comprensión del tema. Debido a la complejidad que en sí misma implica la interpretación de un esquema de este tipo, sería conveniente en una primera instancia trabajar con el esquema completo y analizar de forma pautada con los alumnos las diferentes etapas del proceso representado y los

elementos simbólicos utilizados. En una segunda instancia se podría plantear la posibilidad de reordenar el esquema y elaborar un texto explicativo o, alternativamente, presentar el esquema sin sus rótulos y pedir a los alumnos que los incluyan. La complejidad de la explicación y la profundidad del análisis posterior deberán ser evaluadas por el docente en función del nivel de los alumnos de la clase.

En la actividad 3, en la cual se pide que los alumnos propongan un proyecto de investigación es importante que puedan argumentar sus propuestas, que sus argumentos sean sólidos desde su justificación conceptual, que puedan presentar un proyecto escrito donde se explique claramente su propuesta y que la puedan exponer al resto de la clase.

Actividad 1. Repaso conceptual a partir de un esquema de transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens*

Esta actividad propone trabajar con el siguiente esquema referido a las etapas de elaboración de una planta transgénica.



Sugerencias para trabajar el esquema con los alumnos: Las siguientes consignas y preguntas podrían plantearse a modo de ejercitación grupal para integrar los contenidos estudiados en este tema con otros conceptos estudiados en otras instancias de la escolaridad.

Según el nivel escolar de los alumnos y los temas

enseñados previamente, el docente podrá decidir cuáles de estas consignas plantear en la clase:

1. “Leer” el esquema y relatar las etapas representadas por las flechas y los dibujos. *Rta.* En el esquema se muestra en forma muy simplificada, el proceso de incorporación de un gen al núcleo de una célula vegetal que se desea modificar (en este caso, de una planta de tomate). El gen se introduce en un plásmido proveniente de una bacteria del género *Agrobacterium* (vector biológico) que, puesta en contacto con los tejidos de la planta, es capaz de transferir una parte de su material genético hasta el núcleo de la célula receptora integrándolo al ADN de la misma. Las células así “transformadas”, se cultivan *in vitro*, en cajas de Petri con medios nutritivos especiales en cámaras incubadoras, para luego regenerar una planta entera con la nueva característica, incorporada, es decir una planta transgénica. Esta planta se utilizará en un programa de mejoramiento convencional mediante cruzamiento con otras plantas de la misma especie para lograr variedades de excelencia que contengan el nuevo rasgo introducido.

2. ¿Qué tipo de célula es *Agrobacterium*? ¿Por qué se emplea este tipo de células para modificar genéticamente a un organismo? *Rta.* Son células procariotas, que se utilizan por su capacidad natural de transferir fragmentos de ADN a células vegetales.

3. ¿Qué se emplea para cortar el plásmido de la bacteria? *Rta.* Se emplean enzimas de restricción (ver Cuadernos N° 4, 30 y 34) que cortan el ADN en lugares específicos del ADN.

4. ¿De dónde se podría extraer el gen deseado? ¿Cuál podría ser la característica determinada por ese gen? Indicar diferentes características que sería deseable transferir. *Rta.* El gen podría provenir de otro organismo vegetal, de la misma o de otra

especie, o de un microorganismo. La característica a transferir podría ser, por ejemplo, resistencia a sequías, a heladas, tolerancia a herbicidas, resistencia a insecticidas, etc.

5. ¿Qué representan las tijeras del esquema? ¿Cómo se relaciona la forma representada con la función biológica que desempeñan estas “tijeras”?

Rta. Las tijeras representan las enzimas de restricción, que “cortan” ADN.

6. ¿Cuál es el tipo de enzima que se utiliza para “pegar” el nuevo gen al plásmido? *Rta.* Se emplean enzimas denominadas ligasas (ver Cuadernos N° 4, 30 y 34).

7. Sugerir un símbolo con el cual representar el tipo de enzima de la respuesta anterior. *Rta.* Se podría representar con un dibujo de “goma de pegar” o de “ganchos”.

8. ¿Qué significa que la célula de *Agrobacterium* está modificada? ¿Cuál es esta modificación? *Rta.* La bacteria tiene un nuevo plásmido obtenido por ingeniería genética (corte y pegado con enzimas) que lleva el gen de interés y de selección, con las secuencias reguladoras para usar luego en la transformación de plantas.

9. ¿A qué se denomina “infección” en el esquema? *Rta.* Se denomina infección a la invasión de las células vegetales por *Agrobacterium* para la transferencia del ADN-T (con el gen de interés y de selección). En este momento la bacteria reconoce las heridas en las células vegetales, se activan los mecanismos de virulencia para el procesamiento (corte del ADN-T) y envío hacia la célula vegetal.

10. ¿A qué se denomina “transferencia del gen” en el esquema? *Rta.* Se denomina transferencia al evento de transporte e integración del ADN-T (que

incluye el gen de interés y de selección) en los cromosomas de la planta.

11. ¿Se podría decir que la nueva planta es un OGM? Justificar la respuesta. *Rta.* Sí, es un organismo genéticamente modificado, ya que contiene en su ADN un gen proveniente de otro organismo, y a partir del cual adquiere una nueva característica.

12. ¿Todas las células de la nueva planta tendrán esta nueva característica? ¿Por qué? *Rta.* Sí, ya que la transferencia e incorporación de ADN se realiza en una o unas pocas células vegetales a partir de las cuales se regenera la planta completa por división celular.

13. Indicar cuál es el proceso por el cual un gen se expresa en una característica fenotípica. *Rta.* El proceso de síntesis de proteínas, el cual consta básicamente de dos etapas: la transcripción y la traducción. En la primera etapa, los genes “escritos” en el código del ADN (los cuatro nucleótidos) se copian o transcriben a otra molécula, el ARN mensajero (ARNm). En la traducción, el código del ARNm se traduce al idioma de las proteínas (los aminoácidos), a partir de los cuales se forman las proteínas.

14. ¿Se heredará esta nueva característica a las nuevas generaciones? Justificar la respuesta. *Rta.* Una vez obtenida una planta transgénica a partir de células transformadas, esta planta se desarrollará y luego de la fecundación producirá semillas que porten o no el transgén (heredabilidad del gen a la descendencia). Las posibilidades de que el gen pase a la descendencia siguen las mismas reglas que el resto de los genes de la planta, con la diferencia que, al conocer la secuencia completa del gen insertado, se pueden diseñar marcadores para confirmar su presencia o no en la descendencia, sin tener que esperar a que se

exprese el fenotipo.

15. ¿Cómo es posible obtener una gran cantidad de plantas iguales, que contengan el gen deseado?

Rta. Mediante la clonación de células o tejidos vegetales, mediante el cultivo *in vitro* (ver Cuadernos N° 35 y 56).

Actividad 2. Biología de *Agrobacterium*

Agrobacterium tumefaciens es una bacteria de tipo gram negativa con un rango de hospedantes (hospedante es toda planta invadida por un patógeno y de la cual éste obtiene sus elementos nutritivos) muy amplio entre los que se encuentran muchos tipos de plantas.

a. Investigar qué tipos de plantas son sus hospedantes favoritos. *Rta.* Las dicotiledóneas son más susceptibles a *A. tumefaciens*, aunque también la bacteria infecta naturalmente a varias monocotiledóneas. Entre los hospedantes se pueden mencionar: frambuesa, álamo, crisantemo, alfalfa, rosa, remolacha, pera, manzana, gladiolo, espárrago, algunas gimnospermas.

b. ¿Por qué se dice que *Agrobacterium tumefaciens* es un ingeniero genético por naturaleza? *Rta.*

Porque tiene la capacidad de cortar parte de su material genético, transferirlo a una célula vegetal al punto de que se integre al genoma de la misma y de esta forma reprogramar el metabolismo de la planta para su propio beneficio.

c. Si un investigador utiliza esta bacteria para transformar una planta de tomate: ¿la nueva planta transgénica formará los tumores típicos de la agalla de la corona? *Rta.* Si la bacteria tiene su plásmido original con los genes necesarios para inducir la formación de tumores entonces al ponerse en contacto con células vegetales podrá transmitirlos y en consecuencia enfermar a la planta.

d. ¿Qué estrategia utiliza el investigador para evitar esto? *Rta.* Mediante técnicas de ingeniería genética un investigador puede eliminar del plásmido bacteriano todos los genes que no se deseen transferir a las plantas, como los que se necesitan para formar tumores, y reemplazarlos por genes de interés, como por ejemplo para que la planta resista una sequía o produzca frutos más grandes y nutritivos.

Actividad 3. Proyecto de investigación:

Transformación genética de una especie de interés

Este proyecto se puede extender a lo largo de un trimestre de la actividad escolar mientras avanzan en los temas de la materia. Se sugiere que sea un trabajo grupal y dedicar algunas horas al trabajo en clase junto con el docente que vaya guiando la tarea de investigación, la discusión y la búsqueda de material bibliográfico confiable. Asimismo, se puede coordinar con docentes de informática que colaboren en el diseño del trabajo escrito y en la presentación del proyecto (por ejemplo, mediante el programa Power Point).

Los alumnos deberán planificar y proponer un proyecto de transformación genética de alguna planta de interés, o alternatively, tomar un caso real (pueden buscar ideas en la página de ArgenBio www.argenbio.org) y analizarlo en detalle.

La idea es que puedan diseñar un proyecto y puedan justificar su elección, y argumentar con solidez el modo de realizarlo, sus ventajas y aplicaciones. Deberán, además, presentar un trabajo escrito al docente (se sugiere que hagan entregas parciales a medida que avanzan en la investigación) y una presentación oral al resto de la clase apoyada en un soporte virtual.

Es importante trabajar con los alumnos y acompañarlos en cada una de las etapas del

proyecto, desde la elección del tema y la elección de fuentes confiables de información, hasta el modo de diseñar el trabajo escrito, su argumentación y presentación clara y precisa. Al presentarlo, es importante que el resto de los alumnos puedan preguntar y discutir cada uno de los proyectos de la clase.

Presentación del proyecto

Título: Preciso y acotado al tema de investigación.

Investigadores: Nombres, investigadores, institución, docente a cargo.

Objetivos: incluir objetivos generales en cuanto a las expectativas de aprendizaje en el proyecto, y objetivos específicos respecto del tema a investigar.

Introducción: estado de la cuestión en Argentina y en el mundo en cuanto a cultivos transgénicos.

Justificación acerca de la relevancia u originalidad del proyecto elegido a partir de la investigación en el tema.

Investigación y Resultados: explicación mediante texto e imágenes del producto que se espera obtener, su viabilidad, y aplicaciones. Debe incluir:

- Descripción de la planta que se quiere transformar: características, zona de cultivo, etc.;
- características que se quieren mejorar: cuáles, por qué, para qué, beneficios.
- fuente donante de los genes: información acerca del organismo donante y de la característica de interés.
- Metodología a utilizar: cómo aislar un gen del organismo donante; metodología de transformación (*Agrobacterium*); método de regeneración de las plantas.
- Aprobación por organismos reguladores: indicar a quién se elevaría la solicitud y qué comités realizarían cada una de las etapas de ensayos (ver Cuaderno N°19).

Conclusiones: elaborar conclusiones acerca de la realización del proyecto de investigación, de sus expectativas, logros y dificultades, de lo aprendido

acerca del propio proyecto y del resto de la clase.

Bibliografía consultada: libros, artículos científicos y periodísticos, Internet.

Material de Consulta

1. BIO... ¿QUÉ? Biotecnología, el futuro llegó hace rato. Alberto Díaz. (2005). Colección "Ciencia que ladra...". Siglo XXI Editores Argentina S.A. Universidad Nacional de Quilmes Editorial.
2. Documentos de la biblioteca del Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio). Adopción, beneficios e impacto.
<http://www.argenbio.org/recursos/biblioteca>
3. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (2004). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Agr. Luis Mroginski.
<http://www.argenbio.org/recursos/biblioteca>
4. Video: Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*. Miguel Leiva Brondo, Universitat Politècnica de València – UPV.
<https://www.youtube.com>
5. Video demostrando transformación por *Agrobacterium* en Labxchange:
<https://www.labxchange.org/library>

"El Cuaderno" de PQBio es una herramienta didáctica creada y desarrollada por el equipo pedagógico de ArgenBio. Su reproducción está autorizada bajo la condición de que se aclare la autoría y propiedad de este recurso pedagógico por parte del Programa Educativo Por Qué Biotecnología – ArgenBio.