

La bacteria *Agrobacterium tumefaciens* como herramienta biotecnológica



El uso de bacterias capaces de infectar a células vegetales, además de ser una útil herramienta para introducir genes extraños, también podría llegar a utilizarse para controlar de forma fina la expresión genética de células vegetales y animales.

**Bartolomé Humberto Chi Manzanero,
Suemy Echeverría Echeverría, Andrew James Kay,
Pablo Óscar Acereto Escoffié y Luis Carlos Rodríguez Zapata**

El proceso de transformación genética (la introducción de ADN extraño a una célula) es un evento que se presenta en forma natural en algunos seres vivos y origina cambios en sus características. Los procesos de infección viral y la resistencia adquirida de las bacterias a antibióticos son ejemplos bastante contundentes. Sin embargo, un proceso también común, pero más visible por su efecto en las plantas y aún no totalmente elucidado, es la transferencia y transformación genética llevada a cabo por las bacterias del género *Agrobacterium*, (*A. rhizogenes*, *A. tumefaciens* y *A. vitis*) sobre organismos eucariontes, específicamente plantas y algunos hongos (que, a diferencia de procariontes como las bacterias, tienen un núcleo definido por una membrana). Este grupo de bacterias pertenece a la familia Rhizobiaceae, donde también se incluyen a *Rhizobium* y *Phyllobacterium*. *Agrobacterium* sp. abarca bacterias patógenas, gram-negativas, no esporulantes, móviles, que crecen en el suelo. Inicialmente estas bacterias fueron conocidas por su capacidad de causar tumores en plantas. Posteriormente, estudios

específicos demostraron que esta alteración del crecimiento es consecuencia de un desequilibrio de fitorreguladores (compuestos orgánicos distintos de los nutrientes, que en pequeñas cantidades estimulan, inhiben o modifican algún proceso fisiológico de las plantas). Los estudios moleculares, por su parte, demostraron que estas bacterias son únicas por su habilidad de transferir material genético entre especies de diferentes reinos, en este caso entre procariontes y plantas, lo que permitió explicar la aparición de los tumores. A la fecha, esta característica es utilizada como herramienta para estudios biotecnológicos de introducción de material genético en células (transformación). En los últimos años se ha demostrado la posibilidad de transformar genéticamente células de hongos y animales (Kunik y colaboradores, 2001).

En este trabajo se analiza brevemente el proceso mediado por *Agrobacterium tumefaciens*, se presentan ejemplos de su empleo como herramienta biotecnológica, se plantean algunos de los hallazgos más recientes y se comentan las nuevas perspectivas que derivan de estos hechos.

EL PROCESO DE INFECCIÓN POR AGROBACTERIUM

Históricamente, *Agrobacterium* ha sido conocida como una bacteria fitopatogena capaz de ocasionar la aparición de agallas y tumores, e inclusive la muerte de las plantas infectadas, principalmente en dicotiledóneas y algunas gimnospermas. Los estudios iniciales indica-

ron que los tumores presentaban alteraciones en el metabolismo de sus fitorreguladores y sintetizaban unas sustancias llamadas *opinas*, compuestos que las bacterias utilizaban como fuente de carbono y nitrógeno (figura 1). Estas bacterias, además de su cromosoma circular, poseen material genético extracromosomal de forma circular con un tamaño de aproximadamente 200 kilobases, el cual, por ser responsable de los efectos oncogénicos, ha sido llamado plásmido Ti (del inglés *Tumor Inducing*, inductor de tumores) o Ri (*Root Inducing*, inductor de raíces) según pertenezca a *A. tumefaciens* o *A. rhizogenes*, respectivamente. Análisis más finos demostraron la existencia de un proceso de transferencia de la bacteria hacia las células vegetales de una secuencia de ADN llamada T-ADN (del inglés *Transferred DNA*, ADN transferido) presente en el plásmido que poseen. Esta secuencia, delimitada hacia ambos extremos por una franja repetida de 25 pares de bases, tiene un tamaño de aproximadamente 35 kilobases. La información genética trans-

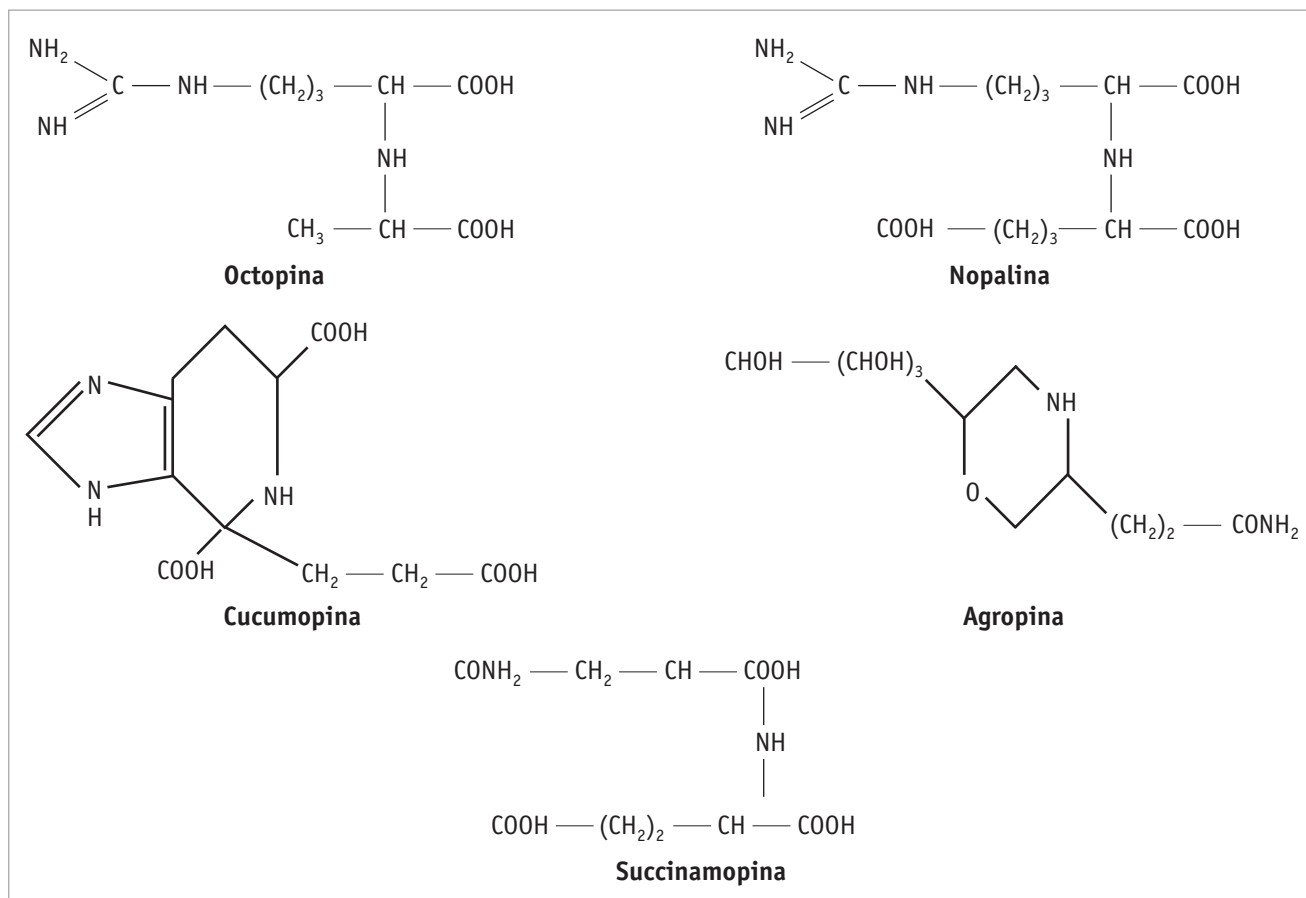


Figura 1. Estructura química de algunas opinas, moléculas que funcionan como fuente nutricional para *Agrobacterium tumefaciens*.

ferida incluye genes para la síntesis de metabolitos para la bacteria y genes para la síntesis de fitorreguladores. En otra parte del plásmido, fuera de la región del T-ADN, se halla la información para la producción de proteínas de virulencia, los genes *virA* y *virG*, cuyos productos intervienen en la transducción de señales en la bacteria (figura 2).

Estudios bioquímicos y moleculares han permitido modelar el proceso de infección y transformación de la siguiente manera:

En el momento en que una planta sufre daño mecánico, las células del área dañada liberan una serie de sustancias conocidas como compuestos fenólicos, los cuales son detectados por *A. tumefaciens*, actuando como mensajeros que le indican el lugar para una posible invasión y posterior infección, como se ilustra en la figura 3. Se sabe que el compuesto fenólico acetosiringona es un poderoso atrayente de las bacterias, mas no el único. Existe evidencia de la participación de proteínas (codificadas en el cromosoma bacteriano) durante el proceso de reconocimiento, específicamente los productos de los loci *Chv*, esenciales para la adhesión de la bacteria a la pared celular vegetal (figura 3, etapa I). Posteriormente, los compuestos fenólicos interactúan con una proteína en la membrana de la bacteria, *VirA*, la cual se autofosforila (se une a una molécula de fosfato) y actúa sobre la proteína citoplásmica *VirG*, fosforilándola. A su vez, ésta modula la expresión de los genes de virulencia de la bacteria, el operón *Vir*, ubicado en el plásmido Ti (ver figura 3, etapa II).

Posteriormente se genera una cadena sencilla de T-ADN mediante la acción de dos proteínas, *VirD2* y *VirD1*, las cuales cortan y relajan la doble cadena, generando una hebra complementaria. La proteína *VirD2* se une a la hebra T en su extremo 5'. Adicionalmente, otras proteínas, *VirE2*, forman una estructura semejante a un cordón telefónico con la hebra de ADN. Estos tres elementos forman el complejo de transferencia de T-ADN (figura 3, etapa III, Tinland y colaboradores, 1994).

Para explicar la entrada de este complejo de transferencia de ADN a la célula vegetal, se ha propuesto un mecanismo similar al *pilus* de otras bacterias (sistema de secreción tipo IV). En el caso específico de *A. tumefaciens*, el *pilus*, estructura en forma de filamento que se proyecta de la superficie de la bacteria hacia el exterior, está formado por las proteínas *VirB2* y *VirB5*,

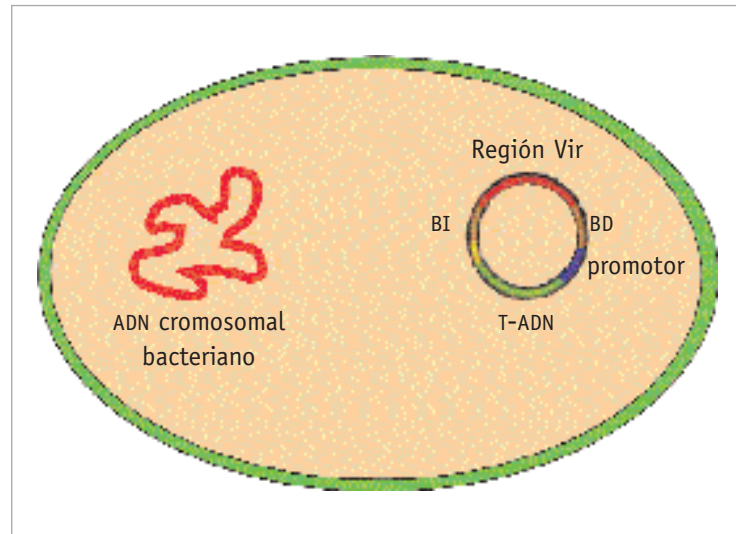


Figura 2. Esquema general de la estructura celular de *Agrobacterium tumefaciens* ilustrando el cromosoma bacteriano y el plásmido Ti.

En el momento
en que una planta sufre
daño mecánico,
las células del área dañada
liberan una serie
de sustancias conocidas
como compuestos fenólicos

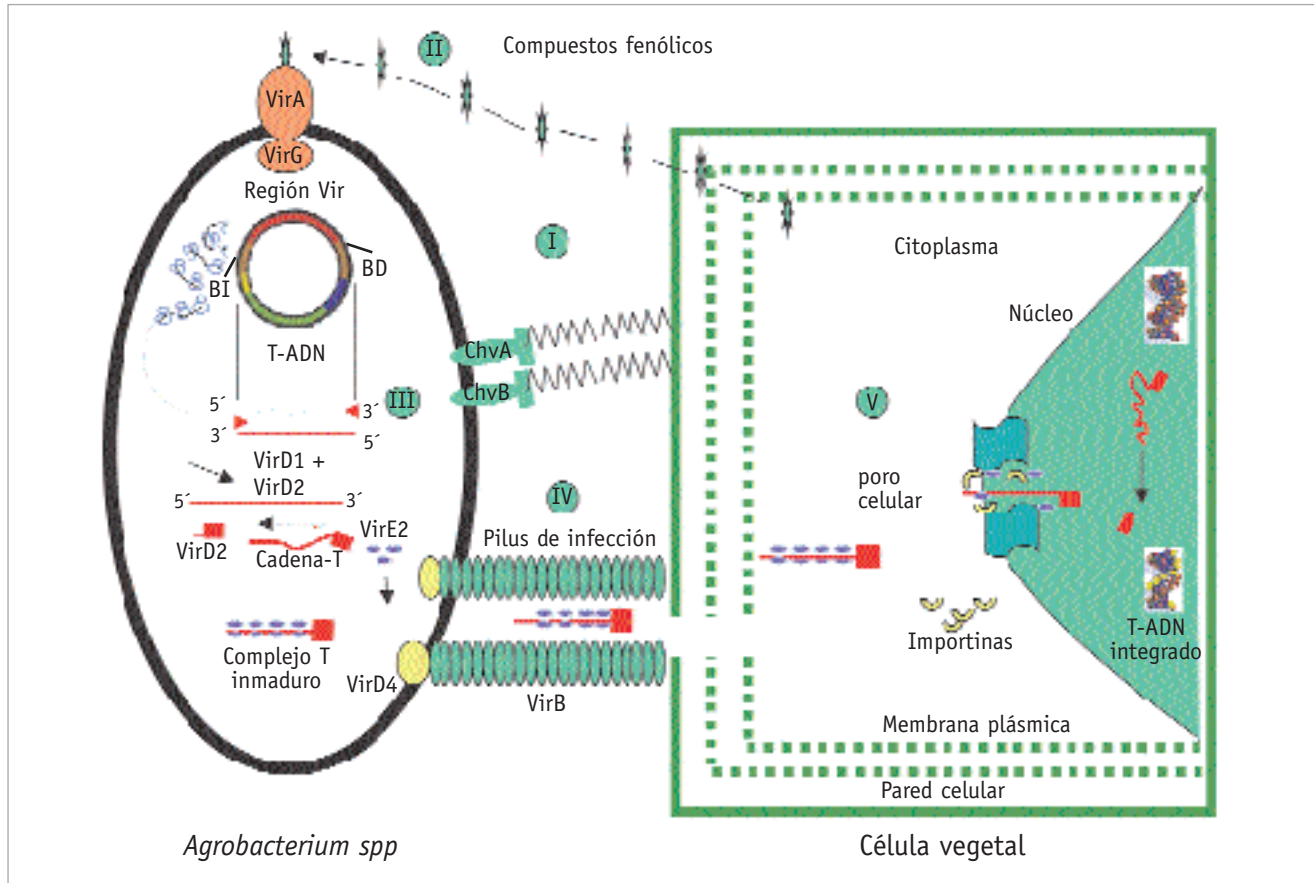


Figura 3. Modelo del proceso de infección de las células vegetales por *Agrobacterium tumefaciens*. *Etapa I*, percepción de los compuestos fenólicos y adhesión de la bacteria a la pared celular vegetal. *Etapa II*, modulación de la expresión de los genes de virulencia de la bacteria, (El operon *vir*, se encuentra ubicado en el plásmido Ti). *Etapa III*, formación del complejo de transferencia de T-ADN. *Etapa IV*, formación de un canal de transporte en la membrana celular bacteriana. *Etapa V*, integración del T-ADN al genoma de la célula vegetal, proceso que supone una participación activa de las proteínas vegetales (Tomado y modificado de Tzfira y Citovsky, 2002).

así como por otras proteínas, principalmente VirB4 y VirB11, que tienen actividad de ATPasa, logrando que cuando se transporta el complejo de transferencia de ADN, se produzca energía en forma de trifosfato de adenosina, o ATP. Otras proteínas involucradas son VirB6, VirB7 y VirB9, que forman un canal de transporte en la membrana celular bacteriana (véase figura 3, etapa IV).

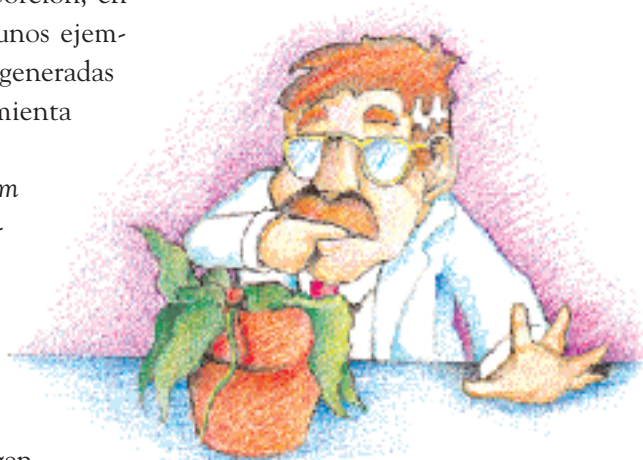
La entrada del complejo de transferencia del T-ADN se ha explicado con base en la secuencia de aminoácidos encontrada en las proteínas VirD2 y VirE2 (que se unen a la cadena sencilla de ADN). Estas proteínas poseen

señales de localización nuclear que permiten dirigirlas y transportarlas al núcleo, y por tanto pueden interactuar con proteínas similares a las chaperonas. Por último, la integración del T-ADN al genoma de la célula vegetal no se ha elucidado del todo. Algunos descubrimientos aislados permiten dar una explicación general. Por ejemplo, se ha encontrado que la proteína VirD2 posee adicionalmente actividad de ligasa (enzima que une fragmentos de ADN) y de integrasa, mientras que VirE2 parece estar involucrada en el proceso de integración. No se sabe si existen otros factores, ni cuál podría ser su actividad, aunque los últimos reportes indican una participación activa de proteínas vegetales en estos procesos, ya sea como proteínas chaperonas o como componentes de la maquinaria celular de reparación de ADN (figura 3, etapa V).

AGROBACTERIUM TUMEFACIENS COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA

Por años, y de acuerdo al desarrollo de las metodologías, *A. tumefaciens* se ha empleado como instrumento biotecnológico rutinario para el desarrollo de plantas transgénicas, especialmente en plantas dicotiledóneas y, en menor proporción, en monocotiledóneas. En la tabla 1 se presentan algunos ejemplos de plantas transgénicas y sus características generadas mediante el empleo de *Agrobacterium* como herramienta biotecnológica.

Las plantas transformadas mediante *Agrobacterium* fueron diseñadas para que expresen una característica particular, por ejemplo resistencia a herbicidas, producción de un nuevo compuesto, mejoramiento de la productividad, etcétera. Los ejemplos son bastantes, por lo que sólo mencionaremos dos. Lee y colaboradores (1991) reportaron la transformación genética de *Brassica napus* con un gen que codifica para una proteína de las llamadas oleosinas (clonada a partir de maíz, una monocotiledónea) lográndose la expresión de dicha secuencia en forma específica en algunos tejidos. Dado que las oleosinas son proteínas cuya función es importante en el almacenamiento de lípidos en semillas, el incremento en la expresión de estas proteínas es necesario para el mejoramiento de las características nutricionales de cultivos como las oleaginosas. Más recientemente, Jeknic y colaboradores (1999) reportaron la transformación genética de *Iris germánica*,



CUADRO 1.

Ejemplos prácticos del uso de *A. tumefaciens* como herramienta biotecnológica

Ejemplo	Protocolo empleado	Referencia
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>) resistente a insectos por producción de la toxina de <i>Bacillus thuringiensis</i> en sus tejidos.	Infección de tejidos mediante <i>A. tumefaciens</i> cepa A208.	Perlak y colaboradores, 1990.
Sobreproducción de α y β -caroteno en semillas de canola (<i>Brassica napus</i>).	Transformación de hipocotilos mediante infección con <i>A. tumefaciens</i> .	Shewmaker y colaboradores, 1999.
Producción y acumulación de astaxantina, un carotenoide de origen bacteriano en tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>).	Infección de discos foliares con <i>A. tumefaciens</i> cepa EHA105.	Mann y colaboradores, 2000.
Desarrollo del arroz dorado, variedad de <i>Oryza sativa</i> que produce y acumula en los granos β -caroteno, un precursor de la vitamina A.	Cocultivo de embriones con <i>A. tumefaciens</i> , cepa LBA4404.	Ye y colaboradores, 2000.

una monocotiledónea ornamental cuyo valor como fuente de compuestos cetónicos con aroma de violetas es de gran importancia en la industria cosmética y perfumería. Esta planta, sin embargo, presenta problemas de incompatibilidad interespecífica, por lo que los trabajos de transformación abren nuevas posibilidades de mejoramiento genético. Estos estudios demuestran el alcance de la transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, además de que plantean la posibilidad de un impacto económico en la productividad de dichos cultivos.

El poder de la transformación genética va más allá de una simple herramienta. Se vislumbra como una alternativa para la elucidación del papel de los diversos componentes celulares en procesos hasta ahora poco comprendidos o estudiados

Sin embargo, los hallazgos recientes permiten visualizar más allá de la simple producción de plantas transgénicas y el mejoramiento genético, como se discute a continuación.

LOS NUEVOS HORIZONTES

El poder de la transformación genética va más allá de una simple herramienta. Se vislumbra como una alternativa para la elucidación del papel de los diversos componentes celulares en procesos hasta ahora poco comprendidos o estudiados. Por ejemplo, se ha reportado la transformación genética del hongo fitopatógeno *Mycosphaerella graminicola*, generando mutantes debido a la integración del gen ABC, que normalmente codifica para una proteína membranal de transporte. Estos transformantes son de gran valor para estudiar y desentrañar los mecanismos moleculares de patogenicidad del hongo.

Por otra parte, otros estudios han demostrado que una mutante de *Arabidopsis thaliana* afectada en el gen de la histona H2A es resistente a la transformación mediada por *A. tumefaciens*. Lo anterior permite establecer la hipótesis de que las histonas desempeñan un papel crucial en la recombinación ilegítima de la cadena sencilla de ADN en el genoma de las plantas durante el proceso de transformación, al modificar la conformación de la cromatina. Asimismo, ensayos realizados con la proteína VirE2 y mediante experimentos con bicapas o vesículas lípidas han demostrado que esa proteína se puede insertar en membranas artificiales y formar canales específicos para cadenas sencillas de ADN. Estos resultados demuestran la función de VirE2 como transportador transmembranal de ADN de cadena sencilla, y por lo tanto su posible empleo como herramienta en trabajos de direccionamiento e inserción de ADN en genomas de diferentes especies. En relación a este punto, Ziemienowicz y colaboradores (2001), estudiando las proteínas VirD2 y VirE2 en la importación del T-ADN hacia el núcleo celular, encontraron que VirD2 es suficiente para transportar al núcleo oligonucleótidos, mientras que para secuencias más largas se requieren ambas proteínas, y concluyen que VirE2 participa activamente en la translocación del complejo por interacciones específicas con el canal del poro. Los resultados obtenidos les permiten proponer un modelo en el cual el complejo protegido por VirE2 es dirigido hacia el PORO nuclear debido a las señales de localización nuclear de VirD2, reconocidas por un receptor llamado *importina* α . El complejo unido a la importina α se dirige hacia el poro, posiblemente a través de otra importina hipotética, y el extremo 5' es dirigido hacia el poro, donde se inicia la translo-

cación del complejo. Este trabajo permite plantear un posible “aprendizaje” por parte de los patógenos respecto al funcionamiento de la maquinaria celular de sus hospederos y el modo como ocurre la cooperación entre proteínas procarióticas (de *A. tumefaciens*) y eucarióticas (del hospedero), por lo que se puede considerar la factibilidad de transformar genéticamente otros tipos de células incluyendo las células humanas.

Recientemente, Kunik y colaboradores (2001) lograron obtener células humanas genéticamente transformadas mediante el empleo de *A. tumefaciens*, encontrando además ciertos elementos similares a los que ocurren en células vegetales. Este estudio abre una amplia gama de posibilidades. Por ejemplo, la terapia genética, que podría llevar a la cura de enfermedades como el cáncer y el reemplazo de genes defectuosos (como en enfermedades como hemofilia, fibrosis quística, etcétera).

Colateralmente surgieron otros resultados y otras interrogantes no menos importantes, como el hecho de que las células humanas se hubieran transformado tanto en presencia como en ausencia de acetosiringona, un inductor del operon *vir* de *A. Tumefaciens*. Lo anterior lleva a plantear la posibilidad de que las células humanas (y por extensión las animales) tengan ciertos elementos que les permitan integrar el T-ADN independientemente de la acción de los genes *vir*.

Finalmente, un aspecto que permanece poco conocido es la integración del T-ADN en el genoma de la célula. A pesar de que VirD2 funciona como ligasa, cabe la posibilidad de que otras enzimas estén también involucradas en el proceso, como las polimerasas, enzimas cuya función es convertir en cadena doble la hebra sencilla del T-ADN integrado. Además, el proceso en sí requiere de otras proteínas involucradas en el cambio conformacional de la cromatina, el corte de las hebras de ADN durante la integración y el transporte intranuclear del complejo T-ADN. Adicionalmente se ha planteado que la integración ocurre en regiones transcritas del genoma, que se consideran temporalmente libres de histonas, lo cual facilitaría dicha integración.

CONCLUSIONES

En el punto actual, podemos manejar toda la información desde la perspectiva tradicional (*A. tumefaciens* como herramienta para transformar tejidos vegetales) o, de manera mucho más ambiciosa, como un sistema cuyos componentes moleculares pueden ser desintegrados y utilizados como herramientas individuales, no sólo para transformar células vegetales sino tam-

bién células animales y de hongos, con el fin de estudiar los procesos moleculares en las células, desarrollar la terapia genética, aprender a expresar o silenciar genes, etcétera. Las oportunidades para ampliar los usos de *Agrobacterium* como herramienta biotecnológica son inmensas.

Recientemente,
Kunik y colaboradores (2001)
lograron obtener células
humanas genéticamente
transformadas mediante
el empleo de *A. tumefaciens*

Bibliografía

- Gelvin S. B., (2000), “*Agrobacterium* and plant genes involved in T-DNA transfer and integration”, *Annual Review of Plant Physiology. Plant Molecular Biology*, 51, 223-256.
- Hooykaas P. J. J. (1989), “Transformation of plant cells via *Agrobacterium*”, *Plant Molecular Biology*, 13, 327-336.
- Jeknic Z., S. P. Lee, J. Davis, R. C. Ernst y T. H. H. Chen, (1999), “Genetic transformation of *Iris germanica* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*”, *Journal of American Society for Horticultural Science*, 12, 565-580.
- Kunik T., T. Tzfira, Y. Kapulnik, Y. Gafni, C. Dingwall y V. Citovsky (2001), “Genetic transformation of HeLa cells by *Agrobacterium*”, *Proceedings of the National Academic of Sciences*, 98, 1871-1876.

- Lee W. S., J. T. C. Tzen, J. C. Kridl, S. E. Radke y A. H. C. Huang (1991), "Maize oleosin is correctly targeted to seed oil bodies in *Brassica napus* transformed with the maize oleosin gene", *Proceedings of the National Academic of Sciences*, 88, 6181-6185.
- Mann V., M. Harker, I. Pecker y J. Hirschberg (2000), "Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers", *Nature Biotechnology*, 18, 888-892.
- Mysore K., C. T. R. Kumar y S. B. Gelvin (2000), "Arabidopsis ecotypes and mutants that are recalcitrant to *Agrobacterium* root transformation and susceptible to germ-line transformation", *The Plant Journal*, 21, 9-16.
- Perlak F. J., R. W. Deaton, T. A. Armstrong, R. L. Fuchs, S. R. Sims, J. T. Greenplate y D. A. Fischhoff (1990), "Insect resistant cotton plants", *Biotechnology*, 8, 939-943.
- Shewmaker C. K., J. A. Sheehy, M. Daley, S. Colburn y D. Y. Ke (1999), "Seed-specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects", *The Plant Journal*, 20, 401-412.
- Tinland B., B. Hohn y H. Puchta (1994), "*Agrobacterium tumefaciens* transfers single-stranded transferred (T-DNA) into the plant cell nucleus", *Proceedings of the National Academic of Sciences*, 91, 8000-8004.
- Tzfira T. y V. Citovsky (2000), "From host recognition to T-DNA integration: the function of bacterial and plant genes in the *Agrobacterium*-plant cell interaction", *Molecular Plant Pathology*, 1, 201-212.
- Tzfira T. y V. Citovsky (2002), "Partners in-infection : host proteins involved in the transformation of plant cells by *Agrobacterium*", *Trends in Cell Biology*, 12, 121-129.
- Ye X., S. Al-Balili, A. Kloti, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer y I. Potrykus (2000), "Engineering the provitamin A (β -carotene) Biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm", *Science*, 287, 303-305.
- Ziemienowicz A., T. Merkle, F. Schoumacher, B. Hohn, y L. Rossi (2001), "Import of *Agrobacterium* T-DNA into plant nuclei: two distinct functions of virD2 and virE2 proteins", *The Plant Cell*, 13, 369-383.

Bartolomé Humberto Chi Manzanero estudió la licenciatura en Biología en la Facultad de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad Autónoma de Yucatán (UADY). Se incorporó como técnico académico en proyectos de mejoramiento de la productividad de *Tagetes erecta* (cempasúchil), de 1991 a 1995, en la Unidad de Biotecnología del Centro de Investigación Científica de Yucatán (CIICY), donde realizó estudios de maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas. Actualmente trabaja como técnico académico en el CIICY, colaborando en el proyecto de transformación genética de banano. Ha participado en tres publicaciones internacionales, una nacional y un proyecto de desarrollo tecnológico. bchim@cicy.mx

Suemy Echeverría Echeverría actualmente es pasante de la licenciatura en Química de la UADY y se encuentra realizando su tesis en el CIICY, en el área de transformación genética. sueter24@cicy.mx

Andrew James Kay actualmente es investigador del CIICY. Cursó la licenciatura y el doctorado en el Wye College de la Universidad de Londres. Posteriormente realizó un entrenamiento posdoctoral en el Departamento de Horticultura de la Universidad de Minnesota. Su interés actual son los estudios moleculares para la búsqueda de genes de defensa y resistencia contra el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, que ataca a cultivos de plátano. andy007@cicyu.mx

Pablo Óscar M. Acereto Escoffié es químico industrial egresado de la Facultad de Ingeniería Química de la UADY, a la cual está adscrito como técnico académico. Actualmente finaliza la maestría en Ciencias y Biotecnología de Plantas del CIICY. acesco@tunku.uady.mx

Luis Carlos Rodríguez Zapata actualmente es investigador del CIICY. Cursó la licenciatura en Biología de la UADY y el doctorado en Ciencias y Biotecnología de Plantas en el CIICY. Realizó dos entrenamientos posdoctorales en el Instituto de Biotecnología de la UNAM y en la Universidad Estatal de Nueva York en Stony Brook. Su interés se centra en la transformación de cultivares de plátano. lcrz@cicy.mx