

Cuaderno N° 28, edición 2021**Elaboración de una planta transgénica:
Técnica de biobalística**

***La técnica de elaboración de una planta transgénica con *Agrobacterium* está explicada en el Cuaderno N° 18.**

Como se explicó en el Cuaderno N° 18 las técnicas de ingeniería genética y el uso de nuevos conocimientos científicos permiten modificar los organismos mediante intervenciones precisas, rápidas y controladas. Incluso, 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 las técnicas para trasladarlas a diferentes especies vegetales. La transformación genética ha sido adoptada como un método para mejorar o introducir nuevas características, y para entender el funcionamiento de las plantas.

Métodos de transformación genética

La transformación de plantas depende de la introducción estable de los transgenes dentro del genoma vegetal. Con el objeto de hacer más fácil y eficiente la transferencia de ADN hacia células o tejidos vegetales, se han desarrollado diferentes métodos de transformación genética, que se pueden dividir en dos clases de acuerdo con el mecanismo utilizado para la transferencia:

1. métodos basados en la utilización de vectores biológicos, como *Agrobacterium tumefaciens* o virus vegetales;
2. métodos que consisten en la transferencia directa de ADN, como el de biobalística.

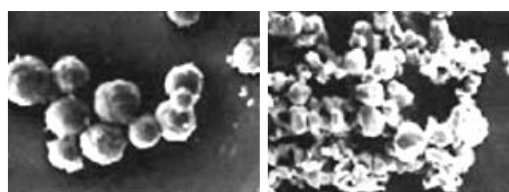
Si bien en la actualidad es posible obtener plantas transgénicas de diferentes especies con

Agrobacterium, el rango natural de hospedantes de la bacteria se constituyó en un importante factor limitante en los primeros intentos por transformar monocotiledóneas y algunas dicotiledóneas que no eran susceptibles a la misma. En consecuencia, se desarrollaron métodos alternativos de transferencia directa de ADN basados en procedimientos de naturaleza química, fisicoquímica, o mecánica. Estos métodos, permiten transferir ADN desnudo (sin mediación de vectores biológicos), y el más ampliamente utilizado en la transformación genética de plantas es el “bombardeo con micropartículas” también conocido como biobalística. El desarrollo de este método de transformación tuvo grandes implicancias en lo que se refiere al mejoramiento genético de plantas de interés agronómico como arroz, maíz o soja, que hasta entonces no se habían podido transformar con *Agrobacterium*.

¿Qué es la biobalística?

El término biobalística deriva de la conjunción de “biología y balística” o “balística biológica”. Este es un método muy original ideado y refinado en la década de 1980 por un grupo de investigadores de la Universidad de Cornell (EE.UU.), que permite introducir ADN a virtualmente cualquier tipo de célula.

En este procedimiento, el ADN es introducido en las células por medio de partículas microscópicas (micropartículas) aceleradas a velocidades supersónicas, que atraviesan la pared y la membrana celular.

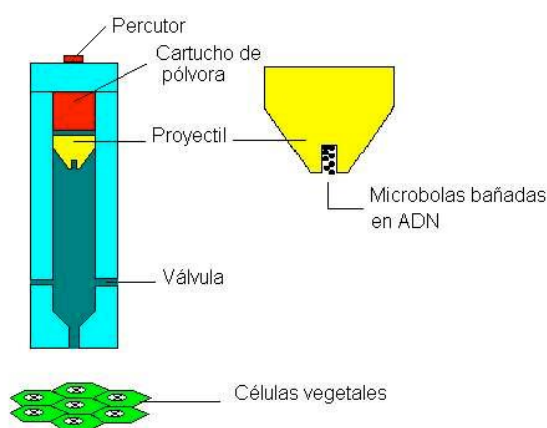


Micropartículas de oro (1) y tungsteno (2)

Las partículas son aproximadamente esféricas (de

0,4 a 2,0 micrómetros de diámetro), están hechas de materiales densos como oro o tungsteno (ver microfotografía 1 y 2, respectivamente), y se recubren con el ADN que se desea transferir a las plantas.

Para que las micropartículas puedan atravesar las membranas celulares y llegar al núcleo de las células blanco, son impulsadas a gran velocidad por explosión de pólvora seca, liberación de gas comprimido a alta presión (aire, helio, CO₂ o N₂), o por una descarga eléctrica de una gota de agua. Una vez dentro del tejido vegetal el ADN se desprende de las micropartículas debido a las modificaciones del entorno iónico.



Microcañón con partículas metálicas rodeadas de ADN.

Si las partículas atraviesan las membranas y son atrapadas en el núcleo, el ADN puede integrarse de forma estable en los cromosomas mediante un proceso de recombinación al azar, lo que se considera como transformación estable. La transformación estable ocurre a muy baja frecuencia, por lo que es necesario utilizar un sistema de selección *in vitro* (ver Cuadernos N° 5, 18 y 67) que permita distinguir células transformadas y no transformadas.

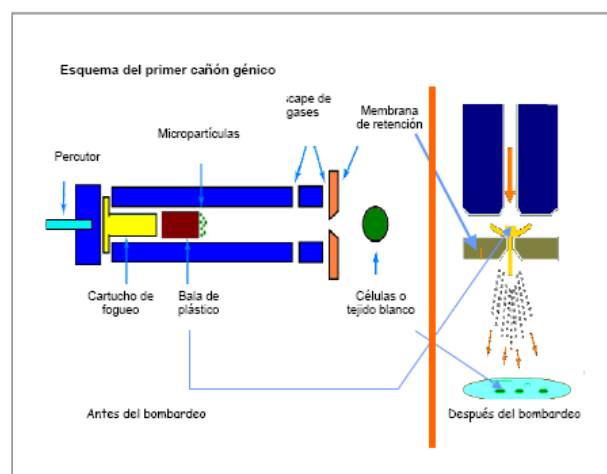
En este método de transformación las construcciones genéticas son simples e incluyen los genes de interés y de selección con sus secuencias

regulatorias respectivas. A diferencia de los plásmidos utilizados con *Agrobacterium* (plásmido ti desarmado), en la técnica de biobalística, el ADN a ser clonado es incluido en plásmidos que son transferidos completos durante el bombardeo a las células, o en forma de molécula lineal (el plásmido cortado en un punto). También es muy común que una vez obtenida la construcción genética dentro de un plásmido (en el cual se clona y se obtienen muchas copias para trabajar), luego se la extrae del mismo para sólo tener la secuencia con los genes de interés y de selección (incluidas las secuencias regulatorias) y así reducir el fragmento de ADN a transferir.

Un poco de historia

El primer cañón génico desarrollado operaba de forma similar a una pistola, en la que una bala de plástico acelerada por explosión de pólvora liberaba una salva de micropartículas metálicas revestidas de ADN.

Como se muestra en el esquema, luego del impacto, la bala quedaba retenida en el extremo del tubo de aceleración y las micropartículas eran impulsadas hacia el tejido blanco a través de un orificio existente en la placa.



La primera demostración de que el sistema funcionaba se realizó en 1987 al introducir ADN en células epidérmicas de cebolla. Poco después, el

método fue probado en diferentes organismos con éxito. Así el método de bombardeo de micropartículas se constituyó en el segundo método de transformación genética de plantas más empleado, luego del de *Agrobacterium*.

Posteriormente este cañón génico fue modificado y se reemplazó la carga de pólvora por presión de gas para generar el impulso de las micropartículas. El modelo más utilizado en la actualidad es el cañón de alta presión de helio PDS-1000/He®, registrado como sistema biobalístico por Dupont. Este cañón consta de una cámara principal en donde se bombardea el tejido blanco en condiciones de vacío parcial. El helio comprimido es liberado a gran velocidad hacia la cámara, e impulsa una membrana de plástico que lleva las micropartículas recubiertas de ADN, las cuales son así aceleradas hacia el tejido blanco.



Cañón PDS-1000/He™ Fuente : www.biorad.com

En 1996 se empezó a utilizar una pistola génica de mano como alternativa al cañón PDS 1000/He.



Este dispositivo portátil permite trabajar sin vacío con virtualmente cualquier tipo de células o tejido blanco, tanto *in vitro* como *in vivo*. Además, puede utilizarse para realizar estudios en organismos vivos.

¿Cuáles son las aplicaciones de la biobalística?

El bombardeo de micropartículas es considerado un mecanismo universal, ya que, por su naturaleza física, permite introducir ADN (sin necesidad de vectores) en cualquier tipo de tejido o célula. Ha sido utilizado para introducir y expresar material genético no sólo en plantas sino también en bacterias, protozoarios, algas, hongos, células y tejidos animales (insectos, peces, aves y mamíferos) y aún animales y plantas *in vivo*.

Al elegir un tejido blanco para la transformación por biobalística debe tenerse en cuenta la capacidad de la especie de interés para regenerar *in vitro*. Entre los explantos vegetales utilizados con mayor éxito, se encuentran las hojas, suspensiones celulares, meristemas, embriones, primordios foliares, cotiledones y callos (ver Cuadernos N°35 y 56). Además, este método permite transformar organelas celulares, como mitocondrias y cloroplastos de modo reproducible. A su vez, es sumamente útil para analizar la función y regulación génica, transferir ARN viral y estudiar vías metabólicas.

Los logros más destacados en la generación de plantas transgénicas por medio el método de biobalística incluyen especies de gran importancia económica como son la soja, el maíz, el arroz, el sorgo, la papaya, la caña de azúcar, el trigo y el espárrago.

Consideraciones metodológicas

Como ya se expresara en el Cuaderno N° 18, 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. Este cuaderno puede utilizarse en niveles terciarios y en colegios con orientación en biología y escuelas agrotécnicas.

La comprensión del tema de biobalística requiere de ciertos conocimientos de física, por lo que se adapta preferentemente para el trabajo con alumnos con conocimientos de esta materia). Con alumnos más pequeños es posible abordarlo, pero a modo de relato simple, sin entrar en detalles de la técnica. Se sugiere, al abordar el tema de biobalística, coordinar el trabajo con el profesor de físico-química para aplicar los siguientes conceptos que se utilizan en el texto: velocidad, aceleración de partículas, tamaño de partícula, los elementos químicos y sus propiedades (oro, tungsteno), descarga eléctrica, presión de gas, gas comprimido, alta presión de helio, vacío, etc.

Si es posible, se recomienda ver el video de la técnica de biobalística que se encuentra en el sitio <https://www.bio-rad.com/es-ar/product/pds-1000-he-hepta-systems>. Aunque las explicaciones que acompañan la animación son en inglés, esto no impide comprender la secuencia y su significado. Incluir la animación como parte de la explicación resulta de utilidad para que los alumnos, incluso los más pequeños, puedan interpretar la técnica.

Si se quisiera trabajar ambos temas, se sugiere trabajar la técnica de transferencia de genes mediante *Agrobacterium* (ver Cuaderno N° 18) antes de trabajar la técnica de biobalística ya que

introduce el tema.

Al trabajar las técnicas de transformación se puede repasar las características de la célula vegetal y, particularmente, la presencia de la pared celular (que está ausente en la célula animal) y que es más rígida y de composición diferente a la membrana celular (presente en todas las células).

Las representaciones gráficas (esquema, gráficos, etc.) y también las animaciones audiovisuales, pueden resultar una herramienta útil para la comprensión de ideas y conceptos ya que permiten comprimir información, localizar ideas claves y establecer relaciones entre ellas. Pero, en algunos casos, las representaciones gráficas resultan difíciles de interpretar por los alumnos y pueden obstaculizar la comprensión. Es recomendable dedicarle un tiempo al análisis para favorecer su interpretación y, en consecuencia, la comprensión de los conceptos que se pretende transmitir. Se sugiere explicitar los códigos y simbolismos que se emplean, y favorecer la explicitación por parte de los alumnos mediante la construcción de equivalencias con otros lenguajes: traducir los textos en esquemas y los esquemas en textos.

Las actividades que se presentan a continuación ofrecen situaciones para aplicar la interpretación de esquemas y fotografías. Cuando se realiza un trabajo de “traducir” una imagen visual a un lenguaje escrito es útil y un ejercicio interesante, limitar la cantidad de líneas que debe ocupar el texto (por ejemplo, entre 5 y 8 líneas). De esta forma se exige a los alumnos la organización, y expresión clara y concisa de los conceptos, un ejercicio que requiere de práctica.

Conceptos relacionados: ADN; genes; ingeniería genética; conceptos de físico-química: aceleración de partículas, tamaño de partícula, los elementos químicos y sus propiedades (oro, tungsteno),

descarga eléctrica, presión de gas, gas comprimido, alta presión de helio, vacío; célula vegetal y célula animal; clasificación de las plantas.

Actividades

Objetivos:

- Repasar los conceptos trabajados en el texto
- Aplicar los conocimientos adquiridos a la interpretación de esquemas o representaciones gráficas.
- Analizar casos reales del empleo de técnicas de transformación genética.

Actividad 1. Repaso de conceptos a partir de una representación gráfica



a. Redactar un texto que explique qué representa el siguiente esquema. La explicación debe incluir los conceptos y estructuras que aparecen en la ilustración. *Rta.* El esquema representa las dos técnicas (*Agrobacterium* y biobalística) por medio de las cuales se puede transformar una planta. En este caso, se transfiere a la célula de la planta una característica de resistencia viral. El gen transferido se incorpora a un cromosoma del genoma de la planta de manera estable.

b. Indicar cuáles son los métodos representados. *Rta.* Método de *Agrobacterium tumefaciens* y de biobalística.

c. Indicar en cada método cómo es trasladado el ADN foráneo hacia las células vegetales. *Rta.* En el método de *Agrobacterium* el ADN foráneo es transferido en la secuencia de ADN-T del plásmido de *Agrobacterium* y en la biobalística el ADN es transferido desnudo (sin vector) pegado a micropartículas de metal (oro o tungsteno) que son impulsadas a gran velocidad hacia las células vegetales.

d. Indicar en qué consiste el proceso de selección *in vitro*. *Rta.* Una vez que las células blanco son bombardeadas o puestas en contacto con *Agrobacterium tumefaciens* se las debe cultivar en un medio de cultivo con un agente de selección para rescatar las células que hayan sido transformadas. Para que se pueda realizar este proceso, junto con el gen de interés las células deben recibir un gen de selección que al expresarse les confiera a las células algún tipo de resistencia por ejemplo a un antibiótico o herbicida.

e. ¿Cuál fue el motivo que impulsó a los investigadores a desarrollar un método de transformación alternativo al de *Agrobacterium*? *Rta.* El rango de hospedantes de *Agrobacterium* limitado a unas pocas dicotiledóneas, la falta de susceptibilidad a la infección de ciertas especies vegetales especialmente de interés agronómico.

Actividad 2. Repaso de conceptos.

Verdadero o Falso: Indicar si cada una de las siguientes afirmaciones es verdadera o falsa. En caso de que sea falsa justificar.

a. La transformación genética de plantas consiste en la transferencia de material genético proveniente del mismo u otro organismo. **VERDADERO**

b. El cultivo de tejidos es utilizado para regenerar plantas a partir de células vegetales que han sido transformadas. **VERDADERO**

c. La biobalística es un método de transformación genética que utiliza un vector biológico para transferir ADN hacia células blanco. **FALSO**. La biobalística transfiere ADN directamente sin utilizar un vector biológico.

d. Si el ADN transferido por algún método de transformación atraviesa la membrana plasmática de una célula vegetal y se aloja en su citoplasma, la planta regenerada a partir de esa célula será transgénica. **FALSO**. La planta será transgénica sólo si el ADN transferido se integra a un cromosoma de la planta y si luego permanece estable en el genoma de la planta de modo de ser transferido (heredado) a la descendencia.

e. En las técnicas de transformación genética es necesario disponer del gen de interés dentro de un vector (vehículo) apropiado para ser transferido al tejido que se quiere transformar, como por ejemplo un plásmido. **VERDADERO**

f. Los métodos directos de transferencia de ADN como la biobalística, permiten transferir ADN desnudo sin mediación de vectores biológicos. **VERDADERO**

g. En la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* los genes de interés son transferidos a las células vegetales incluidos en la secuencia de ADN-T. **VERDADERO**

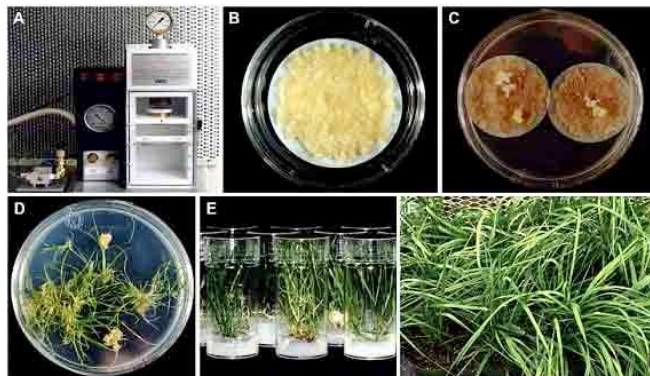
h. Siempre que un ingeniero genético usa *Agrobacterium* para transformar una planta, ésta desarrolla los tumores típicos de la agalla de la corona, además de expresar el gen de interés agronómico que se le ha transferido. **FALSO**. La

planta desarrollará los tumores típicos de la agalla de la corona sólo si no se sacaron de la secuencia de ADN-T los genes que la bacteria posee (para inducir la formación de tumores) y son transferidos a las plantas cuando las infecta. Cuando un investigador quiere transformar una planta para expresar una característica beneficiosa saca los genes de la bacteria que provocan la enfermedad de la agalla y en su reemplazo coloca los genes de interés y de selección.

i. El método de transformación mediada por *Agrobacterium* permite transferir ADN a cloroplastos. **FALSO**. El único método reportado hasta el momento que permite transformar cloroplastos es la biobalística.

j. El primer cañón génico usado en la transferencia directa de ADN fue un dispositivo similar a una pistola en la que un percutor generaba una explosión de pólvora impulsando una bala de plástico con las partículas de metal y ADN hacia el tejido blanco. **VERDADERO**

Actividad 3. Transformación genética en fotos
La siguiente figura muestra, a través de fotografías, los pasos de transformación genética de una gramínea. Analizar la figura y responder a las preguntas que siguen.



Fuente: <https://www.marshall.edu/cos/>

A- Cañón génico PDS/1000-He usado para bombardeo de micropartículas. B- Células en

suspensión de *Festuca arundinacea* dispuestas sobre papel previo al bombardeo. C, D, E- Plántulas transgénicas de los callos resistentes obtenidos en selección. F- Plantas transgénicas creciendo en invernadero.

a. ¿Qué tipo de método de transformación se utiliza? *Rta.* Biobalística.

b. ¿Qué técnica de propagación se utiliza para regenerar plantas completas? *Rta.* Cultivo *in vitro*.

c. La figura C muestra callos que proliferan a partir de las células cultivadas *in vitro* con agente de selección, luego del bombardeo. Indicar cuál es la función del agente de selección. *Rta.* El agente de selección es una sustancia que facilita la identificación temprana de las células transformadas (que regenerarán plantas completas) porque sólo estas sobreviven a la presencia del agente de selección en el cultivo. Esto es posible gracias a la expresión del gen de selección que se transfiere junto al gen de interés.

d. Si se desea que la gramínea resista el cultivo en lugares donde escasea la lluvia ¿Qué debería incluir la construcción genética que se elabore para transformar la planta? *Rta.* Debería tener el gen de interés que le otorgue tolerancia a sequía, un gen selector para identificar las células transformadas de las que regenerarán plantas transgénicas, y las secuencias regulatorias respectivas.

e. Si la planta a transformar fuera maíz y dentro de la secuencia de ADN transferido se hubiese incluido un gen de resistencia Bt: ¿Qué característica nueva tendrá la planta de maíz? ¿Qué beneficios obtendría el productor? *Rta.* La planta será resistente a insectos ya que expresará una proteína Bt insecticida. El productor ahorra en insecticidas y previene el ataque de insectos, el cultivo está protegido por sí mismo. Además,

disminuye el uso de productos insecticidas.

Material de consulta

1. Documentos de la biblioteca del Consejo Argentino para la Información y el desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio). Adopción, beneficios e impacto. <http://argenbio.org/recursos/biblioteca>

2. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. (2004). Ediciones Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Editores: Dra. Viviana Echenique, Dra. Clara Rubinstein, Ing. Agr. Luis Mroginski. <http://argenbio.org/recursos/biblioteca>

3. Video de explicación de funcionamiento de cañón para biobalística <https://www.bio-rad.com/es-ar/product/pds-1000-he-hepta-systems>

4. 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.