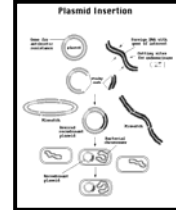
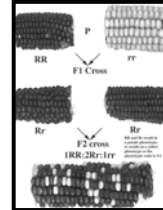




Plantas transgénicas

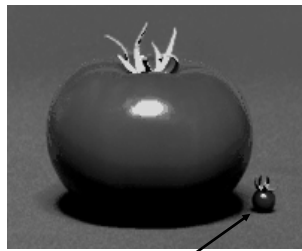
Dr. Mauricio González Agüero
 Departamento de Mejoramiento y Biotecnología
 Laboratorio de Postcosecha
 Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA) – La Platina

Comparación entre hibridación clásica y la transgénesis

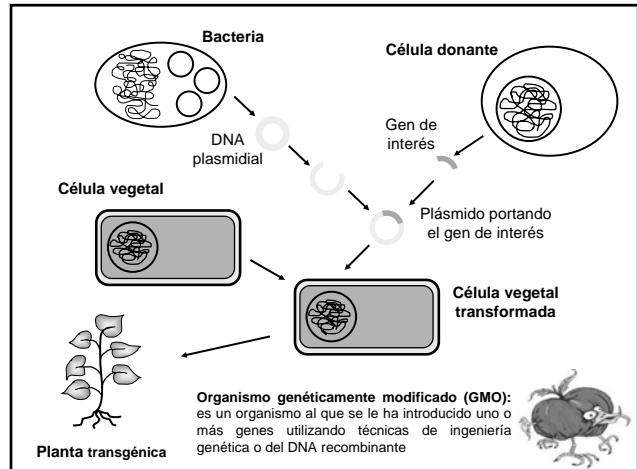


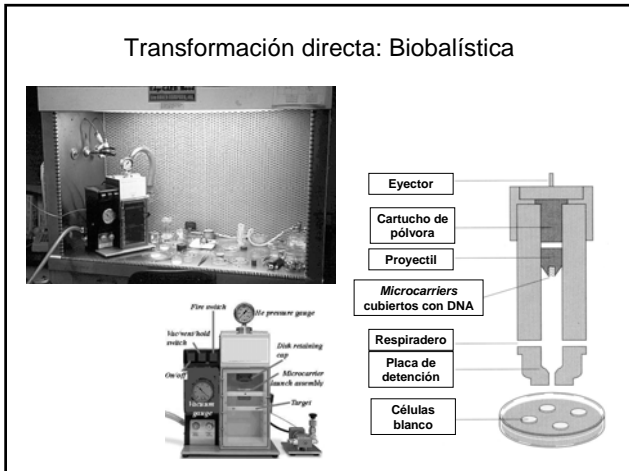
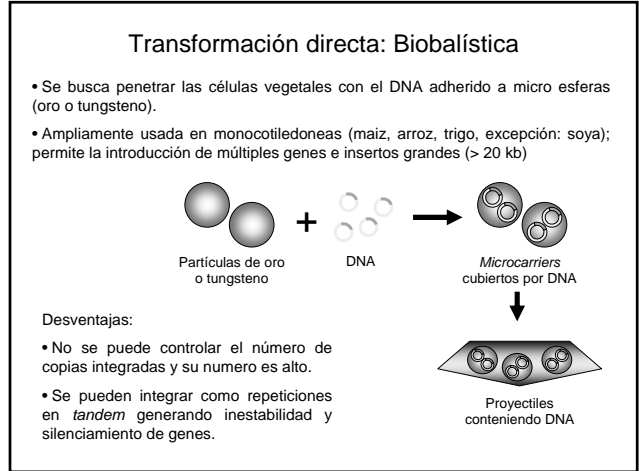
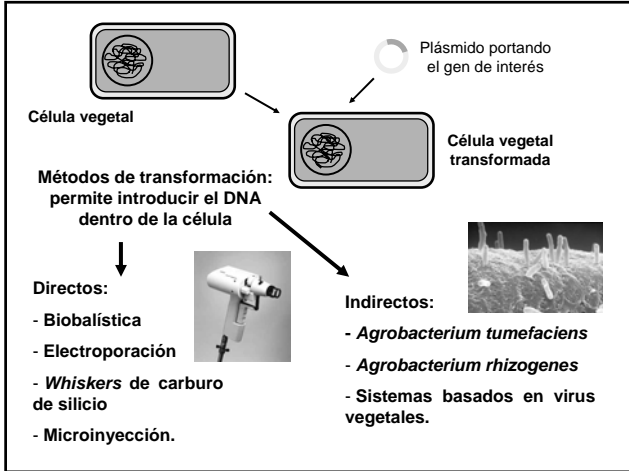
Puntos de comparación	Hibridación Clásica	Transgénesis
Número de genes transferidos	Una docena de millares de genes para encontrar el gen de interés	Uno o varios genes de interés en una construcción genética
Elección de la característica a transmitir	Se limita a la compatibilidad sexual (confinada al interior de una especie)	En principio ilimitada (franquea la barrera de las especies)
Tiempo para estabilizar la nueva variedad	10-20 años o más	3 - 4 años

Logros de la hibridación clásica

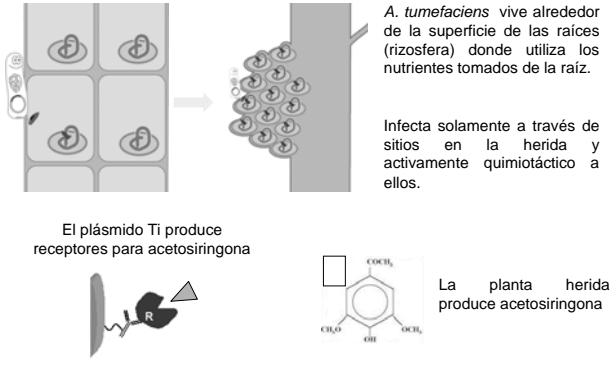


Tomate silvestre (*Lycopersicon pimpinellifolium*)
 D = 1 cm.





Biología de *Agrobacterium tumefaciens*



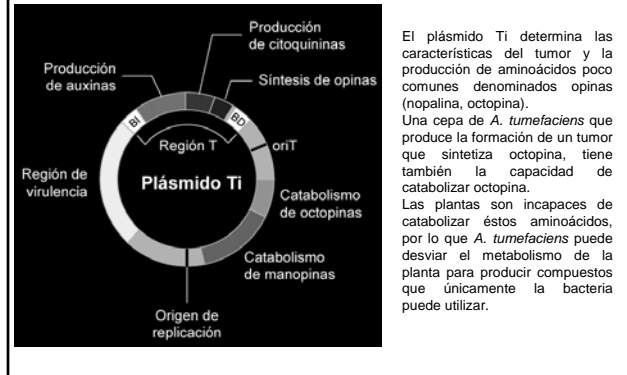
A. tumefaciens vive alrededor de la superficie de las raíces (rizosfera) donde utiliza los nutrientes tomados de la raíz.

Infecta solamente a través de sitios en la herida y activamente quimiotáctico a ellos.

El plásmido Ti produce receptores para acetosiringona

La planta herida produce acetosiringona

Mapa genético del plásmido Ti de octopina



Producción de auxinas

Producción de citoquininas

Síntesis de opinas

Región T

oriT

Región de virulencia

Plásmido Ti

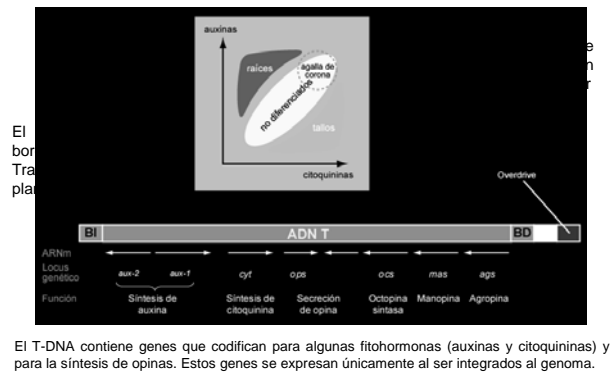
Catabolismo de octopinas

Catabolismo de manopinas

Origen de replicación

El plásmido Ti determina las características del tumor y la producción de aminoácidos poco comunes denominados opinas (nopalina, octopina). Una cepa de *A. tumefaciens* que produce la formación de un tumor que sintetiza octopina, tiene también la capacidad de catabolizar octopina. Las plantas son incapaces de catabolizar éstos aminoácidos, por lo que *A. tumefaciens* puede desviar el metabolismo de la planta para producir compuestos que únicamente la bacteria puede utilizar.

Estructura de la región T de un plásmido Ti de octopina



El T-DNA contiene genes que codifican para algunas fitohormonas (auxinas y citoquininas) y para la síntesis de opinas. Estos genes se expresan únicamente al ser integrados al genoma.

auxinas

citoquininas

raíces

agallas de corona

no diferenciadas

tallos

Overdrive

ARNim

Locus genético

ADN T

aux-2

aux-1

cyf

cps

pcs

mas

ags

Función

Síntesis de auxina

Síntesis de citoquinina

Secreción de opina

Octopina sintasa

Manopina

Agropina

Región de virulencia: genes Vir

Los genes vir constituyen un regulón con 8 genes principales (*virA*, *virB*, *virC*, *virD*, *virE*, *virF*, *virG* y *virH*) regulados por una secuencia promotora que contiene 12 pares de bases conservadas a la que se une específicamente la proteína VirG fosforilada.

La proteína de membrana VirA interactúa de forma directa o indirecta con compuestos fenólicos producidos por las plantas como lignina, precursores de flavonoides y acetosiringona.

La proteína citoplasmática VirG es fosforilada por VirA y permite la transducción de señales que activan los genes vir.

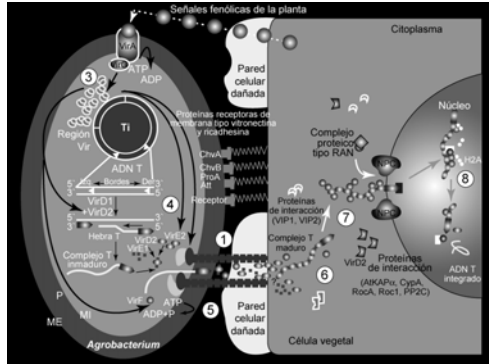
VirD2 y VirD1, actúan como endonucleasas, uniéndose al plásmido Ti en los bordes del T-DNA liberándolo. La proteína VirD2 se une covalentemente al extremo 5' del T-DNA hasta su transferencia a la planta y media la su integración dentro del cromosoma de la planta.

Las proteínas VirE2 también se unen al T-DNA y posiblemente cubren la cadena formando junto con VirD2 un complejo de transferencia.

11 proteínas VirB y al menos una proteína VirD (VirD4) forman el complejo de secreción (tipo conjugativo, T4SS).

La función de VirC, VirF y VirH son aún desconocidas.

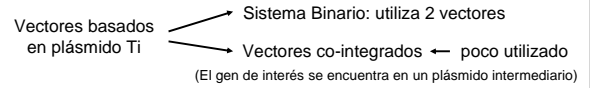
Mecanismos moleculares implicados en la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*



Tzira y Citovsky, Trends in Cell Biology, 2002

Uso del plásmido Ti como vector de transformación

Mediante la manipulación del mecanismo natural de infección de *A. tumefaciens* se han podido generar una serie de vectores que permiten la introducción de secuencias de DNA de interés a los genomas nucleares de varias plantas superiores.



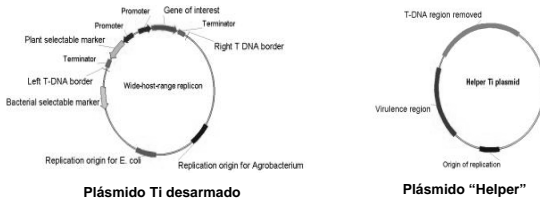
El sistema binario se ha podido desarrollar gracias a dos características del mecanismo de transferencia del T-DNA:

- 1) Las secuencias necesarias para la integración al genoma se encuentran en los bordes del T-DNA (secuencias repetidas terminales), pudiendo ser reemplazado el resto de la secuencia del T-DNA.
- 2) Los genes de virulencia (*vir*) responsables de la transferencia del T-DNA, actúan en trans, por lo que no tienen que estar situados en el mismo plásmido que el T-DNA.

Sistema binario

Una cepa de *A. tumefaciens* con un plásmido Ti "helper". Este plásmido contiene todos los genes *vir* pero no contiene el T-DNA, por lo que no es oncogénico pero es capaz de transferir el T-DNA presente en otro plásmido más pequeño (plásmido "desarmado").

Plásmido desarmado: contiene los bordes del T-DNA, es pequeño y de fácil manipulación en *E. coli*. No presenta los genes para la producción de fitohormonas ni opinas. Presenta sitios de restricción múltiples dentro de los bordes del T-DNA para el clonaje de secuencias. Contiene también un marcador para la selección, por ejemplo resistencia a kanamicina.



Expresión estable v/s transitoria: ventajas y desventajas

Expresión génica estable:

Ventajas: Expresión génica en todos los tejidos de la planta.

Desventajas: Gran consumo de tiempo, labor intensiva, influenciada por efectos de posición, grandes volúmenes de producción, requiere de un sistema de regeneración, requiere de un grandes instalaciones de trabajo.

Expresión génica transitoria:

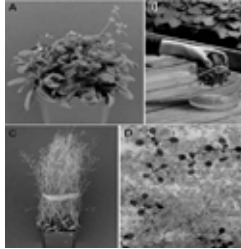
Ventajas: Rápida, flexible, no está influenciada por efecto de posición, provee grandes cantidades de proteína para una caracterización detallada, no requiere de un sistema de regeneración

Desventajas: Expresión génica limitada a tejidos específicos de la planta (según especie).

Expresión estable: transformación mediante *floral dipping*

Las plantas de *Arabidopsis* se crecen en maceteros hasta que comienzan a florecer.

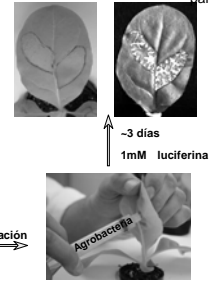
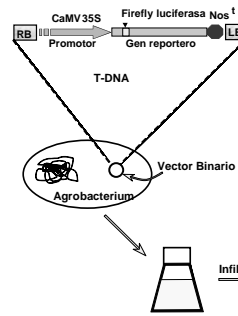
Las plantas se sumergen en el cultivo con *Agrobacterium* suplementado con sacarosa por hasta 3 minutos.



Plantas son crecidas por algunas semanas para permitir el desarrollo de la semilla. Se colectan las semillas.

Las semillas germinan en el medio que contenía el agente de selección (ej: kanamicina)

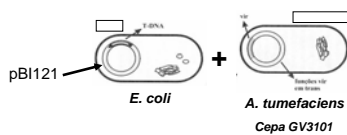
Expresión transitoria: transformación mediante *infiltración*



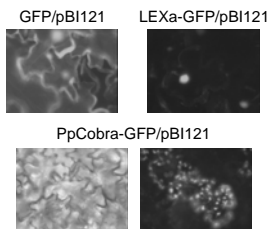
1° Verificar la expresión de un gen de interés (o parte de él).



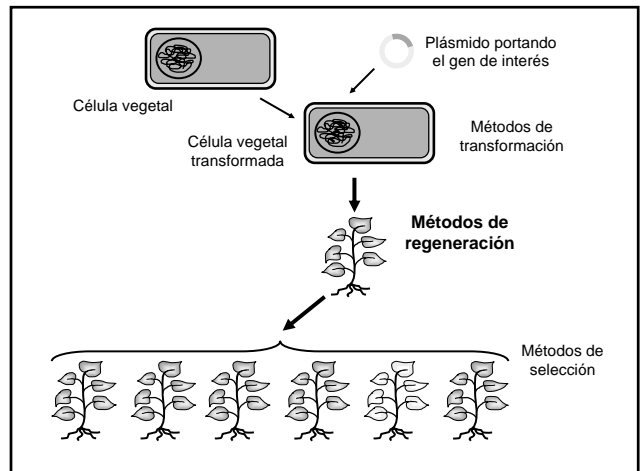
Expresión transitoria: transformación mediante *infiltración*



2° Verificar la localización subcelular del producto de un gen de interés (o una parte de él).



Visualización



Transformación de plantas: Regeneración

Regeneración: inducción del crecimiento y multiplicación de las células transformadas, mediante la utilización de fitohormonas que estimulan la producción de callos y brotes. Existen tres conceptos básicos que fundamentan el cultivo in vitro de células y tejidos vegetales:

1. Totipotencialidad celular: toda célula vegetal individual es capaz de regenerar una planta entera a partir de un cultivo *in vitro* sin importar el grado de diferenciación alcanzado. Para ello se requieren condiciones específicas referidas al medio del cultivo, relaciones hormonales, temperatura, fotoperíodo, etc.

2. Desdiferenciación: consiste en la transformación y pérdida de las características de especialización de un tipo celular (ej: células epidérmicas) para dar lugar a células de tipo meristemático. El siguiente paso involucrado en la regeneración de una planta es la rediferenciación de las células previamente desdiferenciadas.

3. Balance entre reguladores del crecimiento: todo proceso de diferenciación está regulado por el balance entre diferentes tipos de reguladores, fundamentalmente de auxinas y citocininas.

auxinas < citocininas → tallos
 auxinas > citocininas → raíces
 auxinas = citocininas → Callo indiferenciado

Vías morfológicas implicadas en la diferenciación de novo de brotes y/o plantas completas.

Posibles vías morfológicas: - Organogénesis
 - Embriogénesis

Diferencias entre las dos vías:

-La organogénesis es de origen pluricelular. Un grupo de células del explante inicial se desdiferencia inicialmente para luego rediferenciarse dando lugar a un órgano vegetal. No se obtienen por esta vía plantas completas.

- La embriogénesis se presupone de origen unicelular. Una célula del explante se aísla y constituye el punto de partida para la obtención de un embrión somático. Se diferencian embriones o estructuras bipolares que completan cada una de las etapas implicadas en la ontogenia de un embrión cigótico. El resultado es una planta completa.

Técnicas de cultivo de células o tejidos vegetales

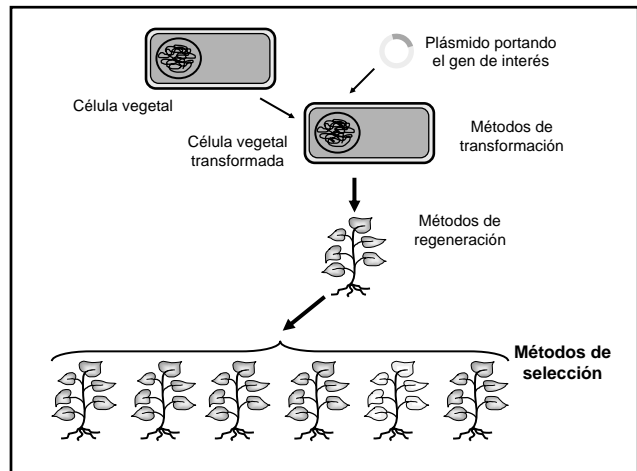
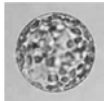
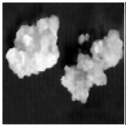
Cultivos diferenciados:

- raíces
- tallos
- embriones
- raíces
- tallos.



Cultivos indiferenciados:

- callos
- suspensiones de células vegetales
- protoplastos.



Transformación de plantas: Selección

Selección mediante genes reporteros:

La secuencia codificante de un gen cuya actividad es fácilmente medida (gen reportero, ej: GFP, GUS) es frecuentemente utilizada en plantas transgénicas donde se desea evaluar la expresión de un gen o la capacidad del promotor de controlar la expresión. Un gen frecuentemente utilizado es el gen GUS (gusA, uidA). Gen de origen bacteriano que codifica para la b-glucuronidasa. La actividad de esta enzima se detecta fácilmente utilizando sustratos cuyos productos pueden ser cuantificados por métodos colorimétricos, espectrofotométricos o fluorimétricos.

Selección mediante antibióticos y/o herbicidas:

Estos genes son útiles si se desea evaluar el método de transformación de plantas.

Antibióticos: todas las células vegetales son sensibles a antibióticos por que estos inhiben la síntesis de proteínas en los cloroplastos; las células transformadas con genes de resistencia a antibióticos pierden esta sensibilidad.

Herbicidas: el gen incorporado elimina la sensibilidad al herbicida. Por ejemplo el gen Bar de *Streptomyces hygroscopicus* codifica para la enzima fosfonotricina acetiltransferasa (PAT) que acetila al herbicida fosfonotricina inactivándolo.

Aplicaciones

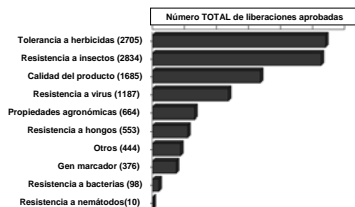


Organismos genéticamente modificados de primera generación

La casi totalidad (99%) de las plantas genéticamente modificadas cultivadas en el mundo son de cuatro especies: soja, maíz, algodón y canola; son de primera generación, y fueron modificadas por motivos agronómicos, principalmente por su tolerancia a herbicidas y resistencia a plagas de insectos.

Las cuatro especies se comenzaron a cultivar de forma intensiva a mediados de los 90 en algunos países del mundo.

Organismos aprobados (fenotipos) año 2002



Organismos genéticamente modificados de primera generación

Los GMOs mas comúnmente usados en el procesamiento de alimentos son la línea Bt-176 de maíz y la soja Roundup Ready (RRS).

La línea Bt-176 de maíz contiene proteína específica de *Bacillus thuringiensis* para hacerlo resistente a insectos meta (larva de mariposas).



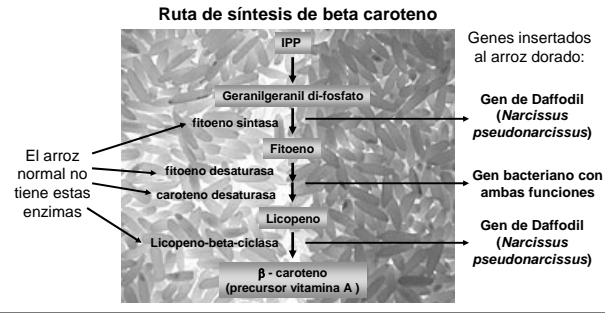
Maíz Bt:

- No es tóxico en humanos.
- 40% de Semilla de maíz Bt en EEUU.
- Reducción potencial de uso de insecticidas.

La soja Roundup Ready (RRS) que es Soja GTS40-3-2, lleva el gen que codifica para la enzima CP4 EPSPS (5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate sintetase de *Agrobacterium* sp. Cepa CP4), la cual le confiere tolerancia a herbicidas con el ingrediente activo glifosato.

Organismos genéticamente modificados de segunda generación

El arroz dorado (*Golden Rice*) es un arroz modificado genéticamente para acumular en su embrión beta caroteno y que es precursor de la vitamina A. Este beta caroteno extra es el que le otorga un característico y peculiar color dorado, y da origen a su nombre. Este arroz acumula 1.6 miligramos/kilogramo de pro vitamina A.



**Organismos genéticamente modificados de segunda generación:
Expresión de proteínas heterólogas en plantas
(Molecular Farming)**

- Tipos de proteínas obtenidas :
- Reactivos de diagnóstico
 - Vacunas animales
 - Alimentos animales
 - Enzimas industriales
 - Productos farmacéuticos para el hombre

Fidelidad en la expresión de proteínas humanas o animales en plantas.

Producto	Uso	Planta huésped	Integridad estructural	Actividad biológica
Hemoglobina α y β	Sustituto de la sangre	tabaco	si	si, (unión a O_2/CO_2)
α -interferon	Anti-cáncer, antiviral	arroz	si	Actividad antiviral in vitro.
EPO	Estimulador del crecimiento de glóbulos rojos	Células de tabaco	si, (glicosos)	Sin testear
Sero albumina humana		papa	si	Sin testear
Factor de crecimiento epidérmico	Miógeno	tabaco		Sin testear
Glicosidasa	Enfermedad de Gaucher	tabaco	si, (glicosos)	si
Hirudina	Anticoagulante	cunola	si	si
NPI Defensina	Antibiótico	tabaco		si

Fin

