

Biología Molecular de Plantas y Su Manipulación Genética

Dr. Daniel Corach

3 de Noviembre de 2006

EGBM

Objetivo de la Unidad

“Brindar conocimientos básicos sobre:

- Genética Vegetal
- Selección natural y artificial
- Mejoramiento selectivo
- Modificación genética por introducción de genes

Antecedentes del Mejoramiento Vegetal

➤ Evolución

- ✓ Escalas de tiempo Vegetal
 - ✓ Proceso evolutivo
 - ✓ Progreso natural y humano.

Antecedentes del Mejoramiento Vegetal

- Modos de Reproducción
 - ✓ Sexual, asexual
 - ✓ Endogamia y Exogamia

Antecedentes del Mejoramiento Vegetal

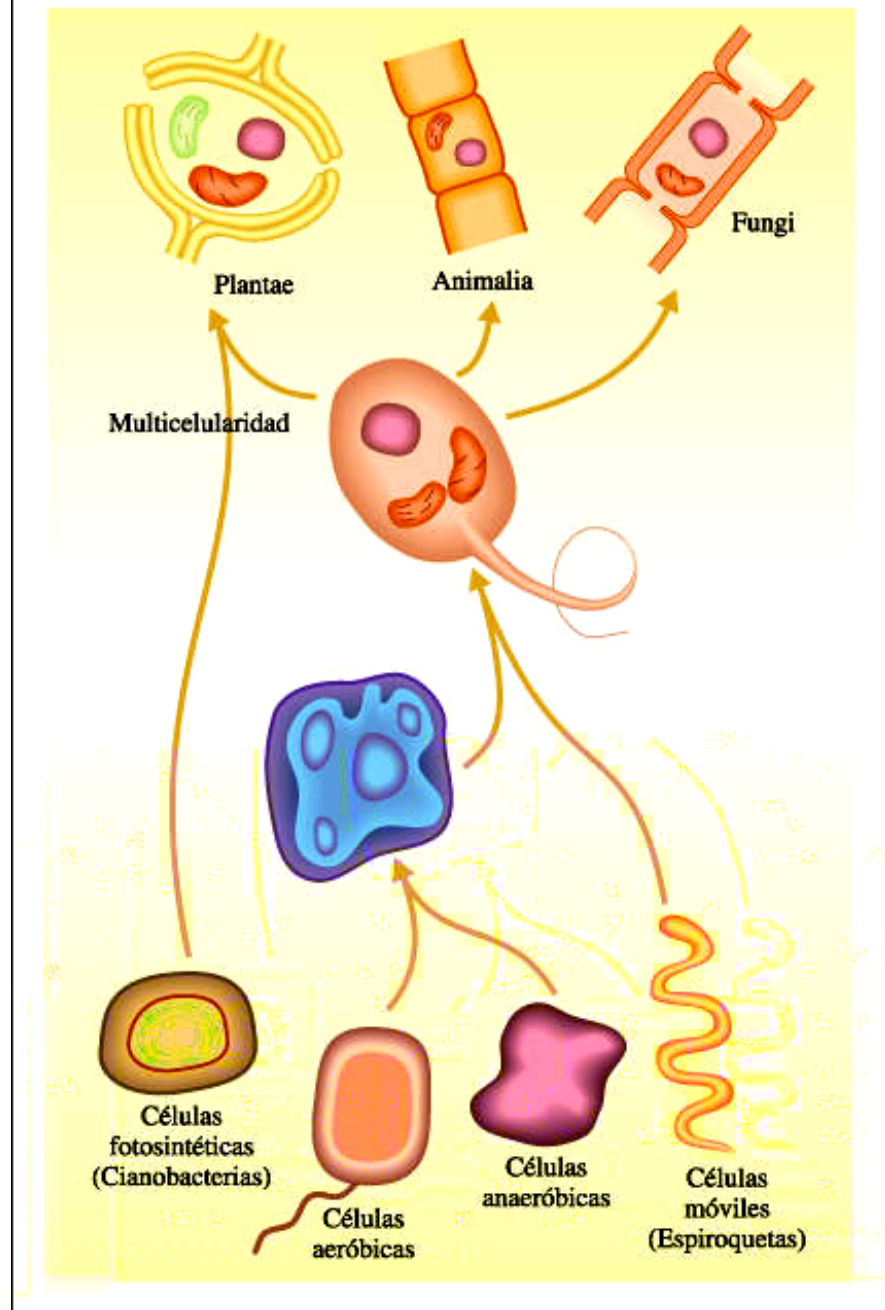
➤ Tipos de cultivo

- ✓ Líneas puras, multilíneas, exocriadas, apomícticas, clonales, híbridas, sintéticas

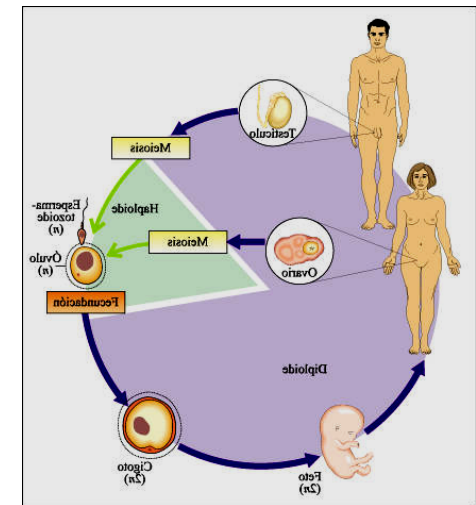
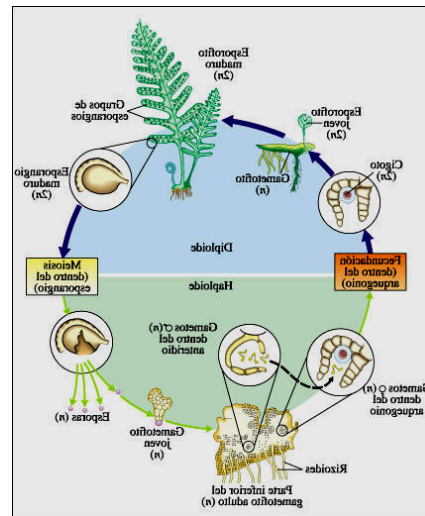
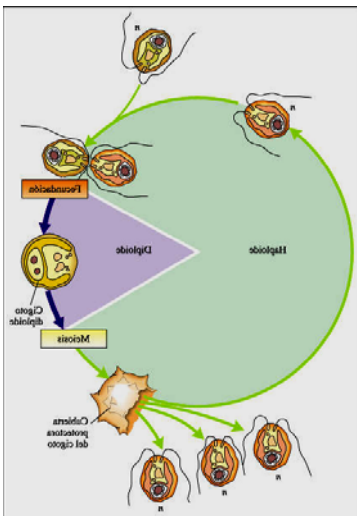
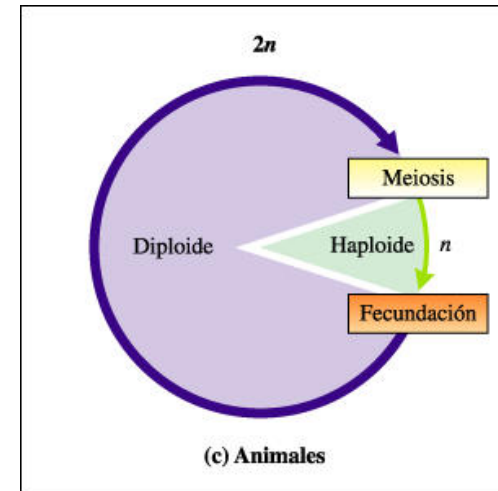
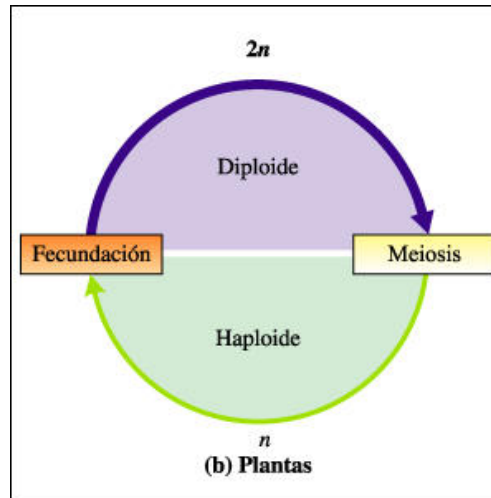
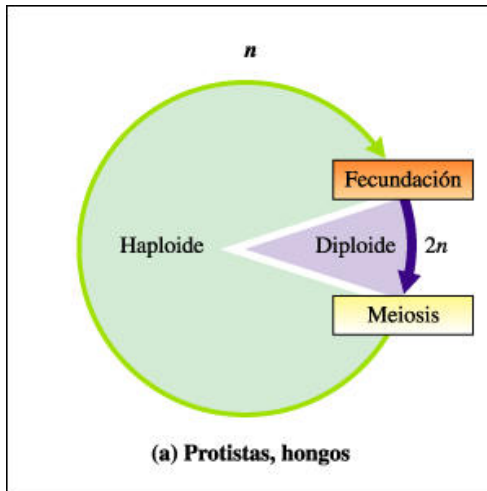
Antecedentes del Mejoramiento Vegetal

- **Objetivos del Mejoramiento.**
 - ✓ Productividad y Calidad.
 - ✓ Resistencia a enfermedades y pestes: tipos, efectos, mecanismos.
 - ✓ Económicos

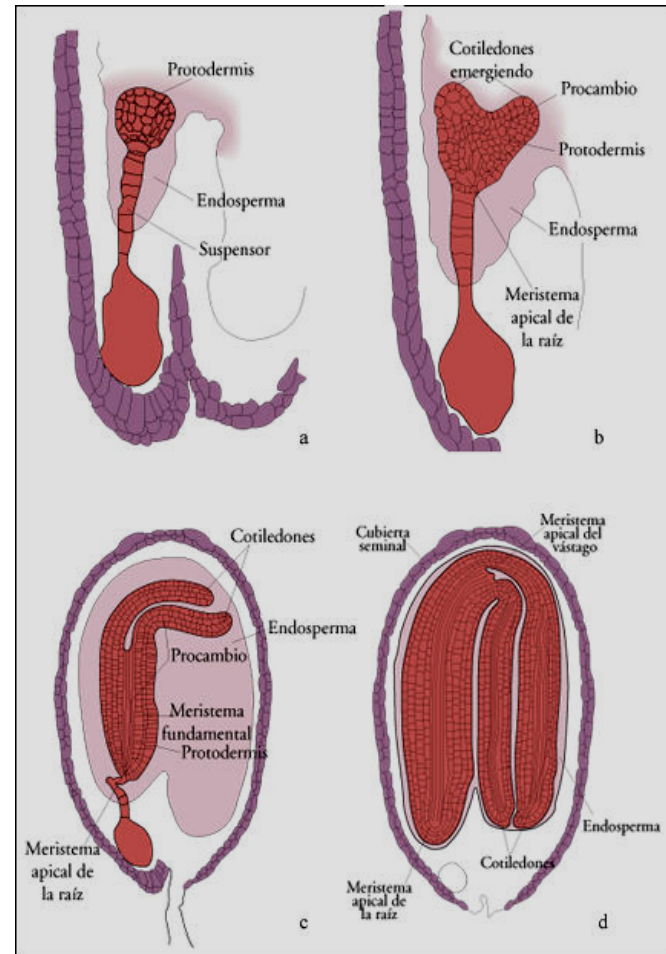
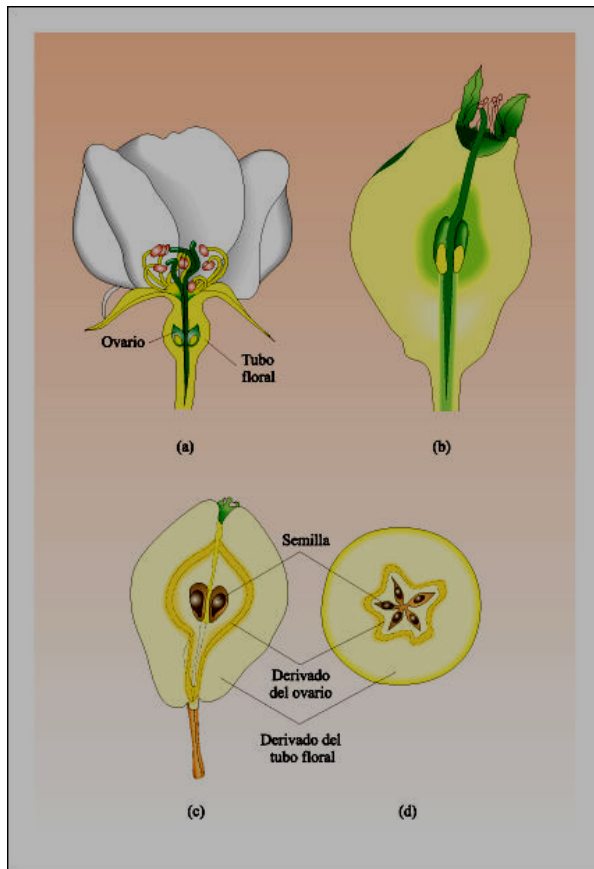
Origen de las Células Eucariotas



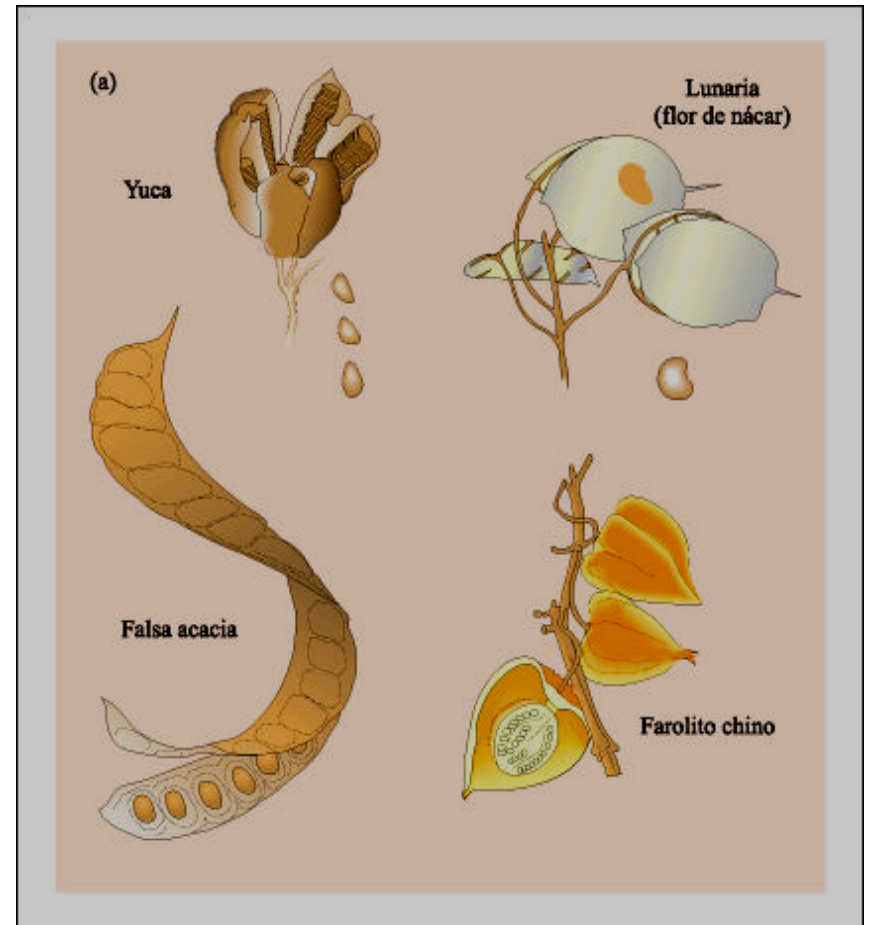
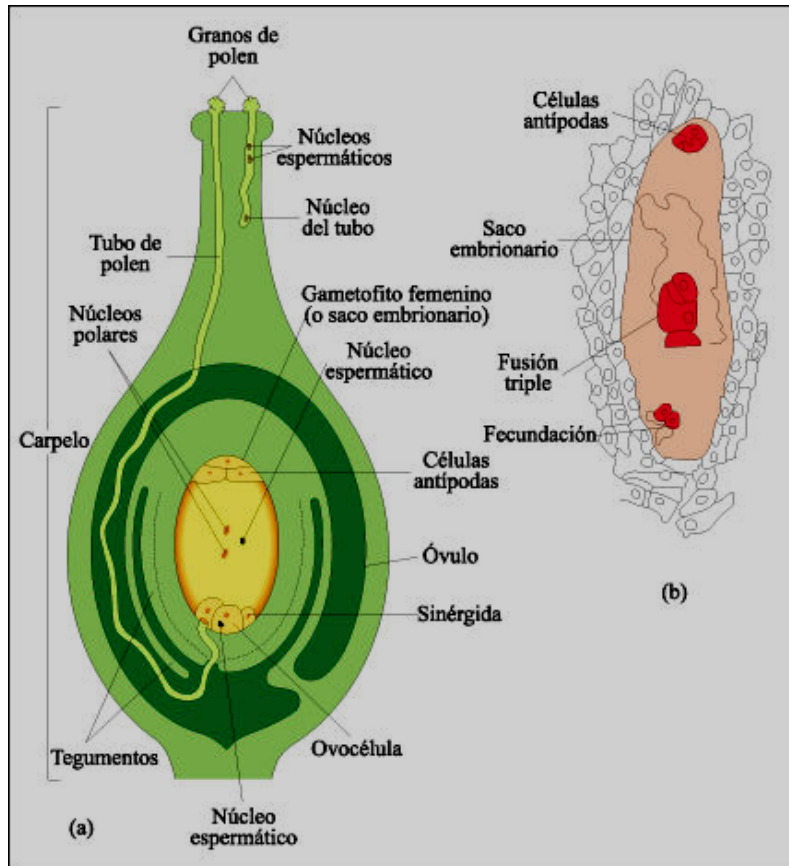
Ciclo Haploide/Diploide



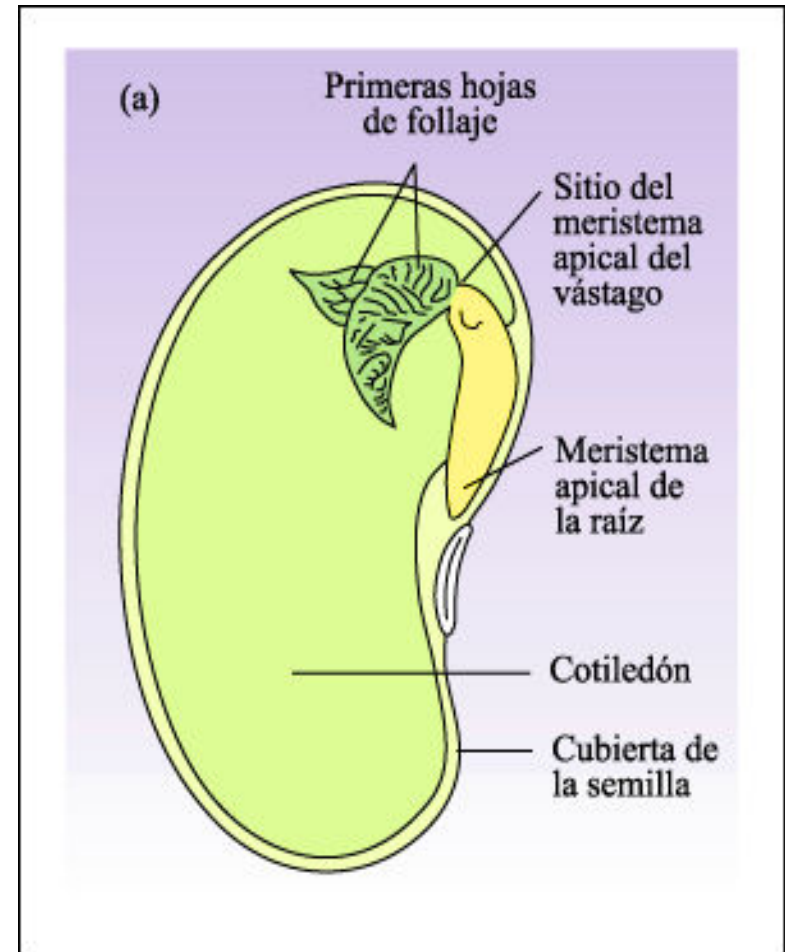
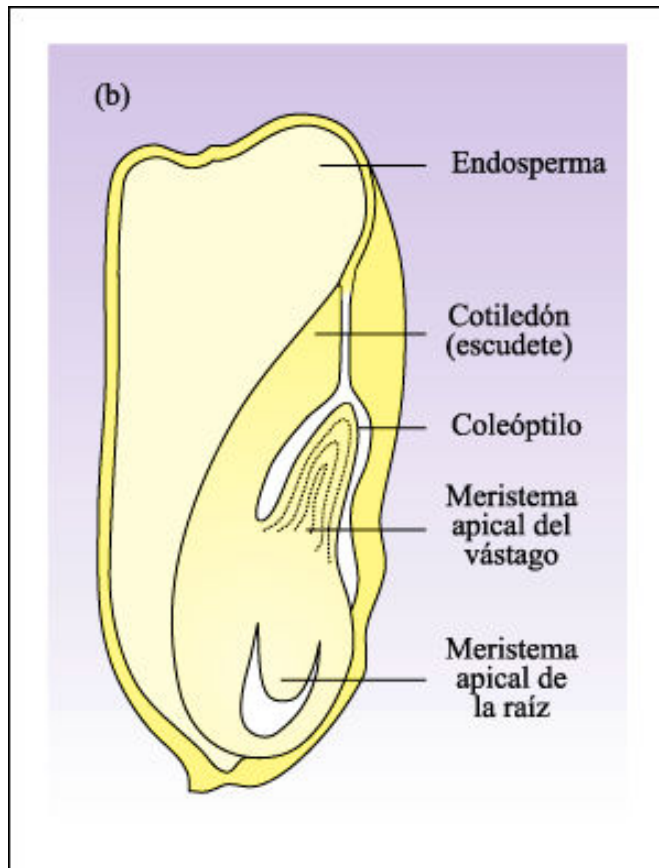
Flor, Embrión y Fruto.



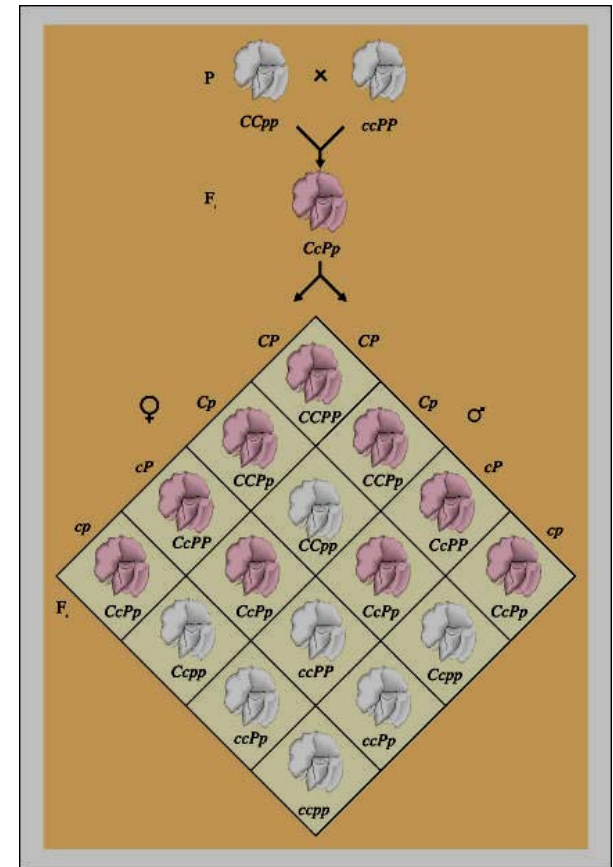
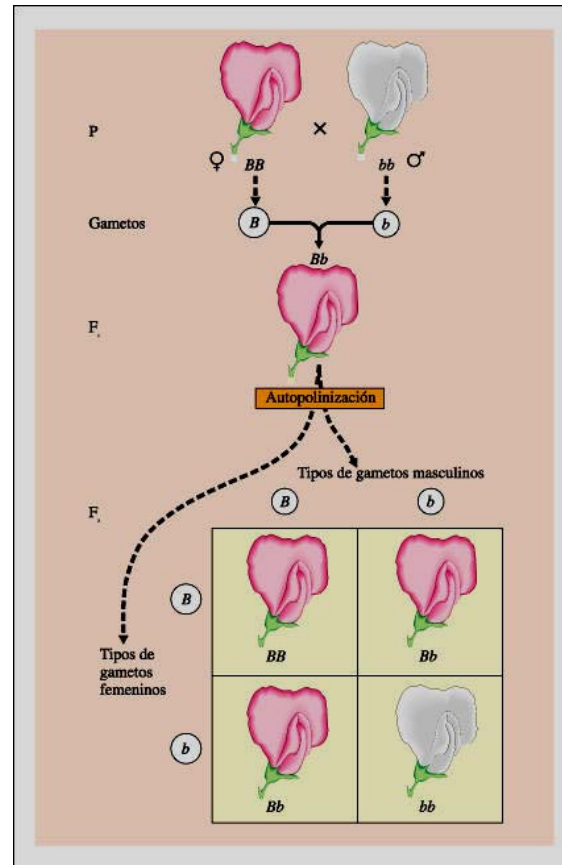
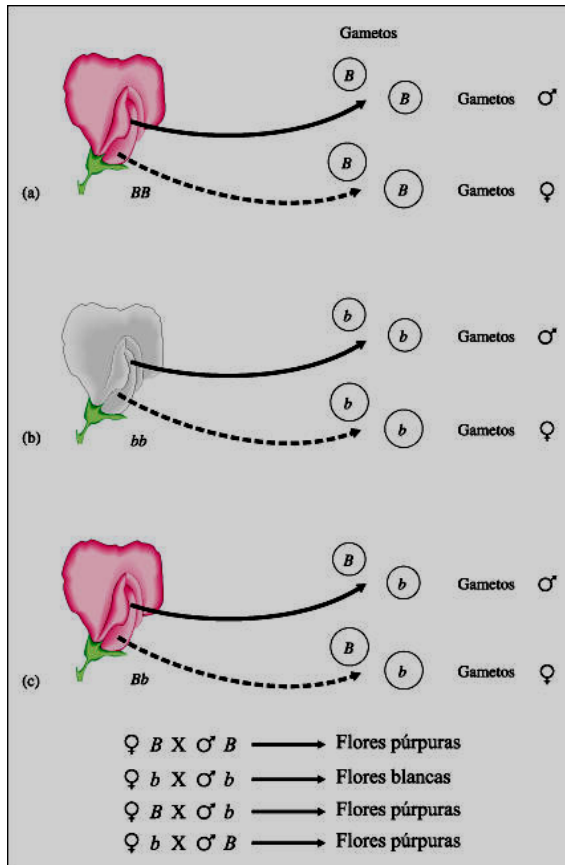
Frutos



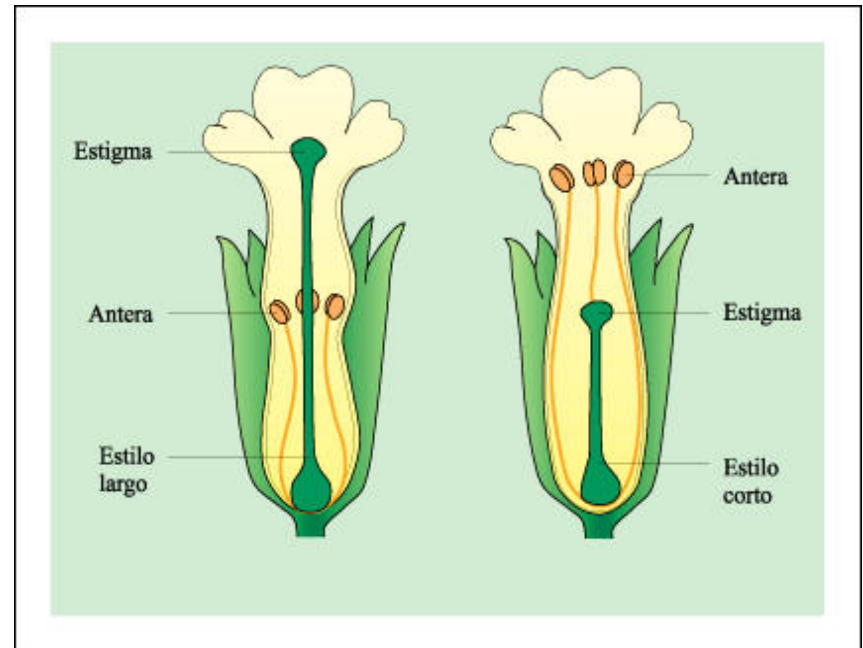
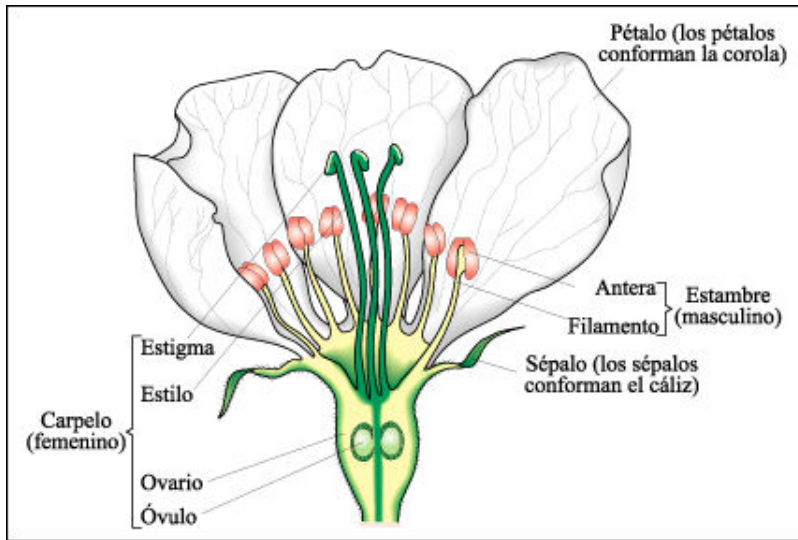
Estructura de las Semillas



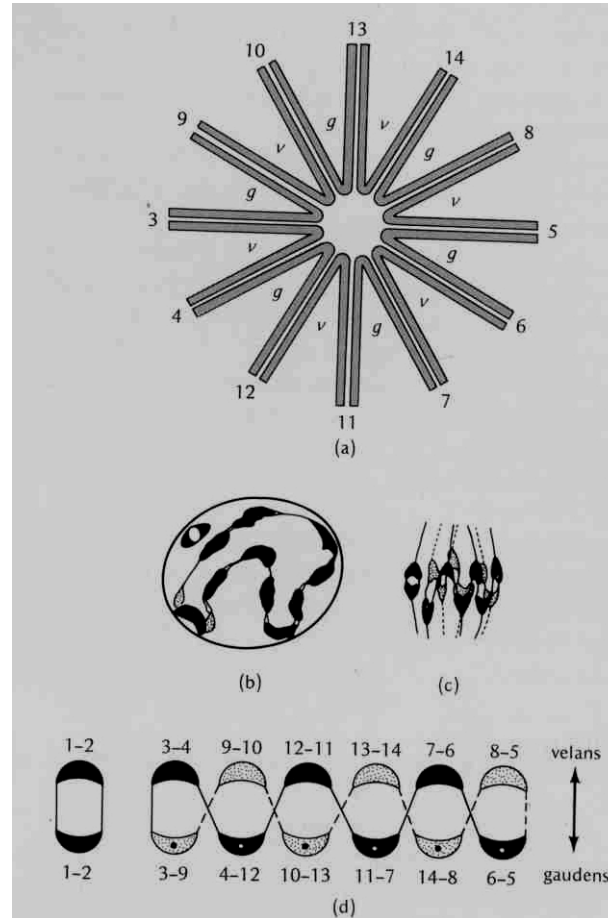
Segregación de caracteres



Estructura Floral (Dicotiledóneas)



Oenothera lamarkiana



Aneuploidía (en *Datura stramonium*)



Normal ($2n$)



$2n + A$



$2n + B$



$2n + C$



$2n + D$



$2n$



$4n$



$2n + E$



$2n + F$



$2n + G$



$2n + H$



$2n + K$



$2n + 2K$



$4n + K$



$4n + 2K$



$4n + 3K$



$2n + I$



$2n + J$

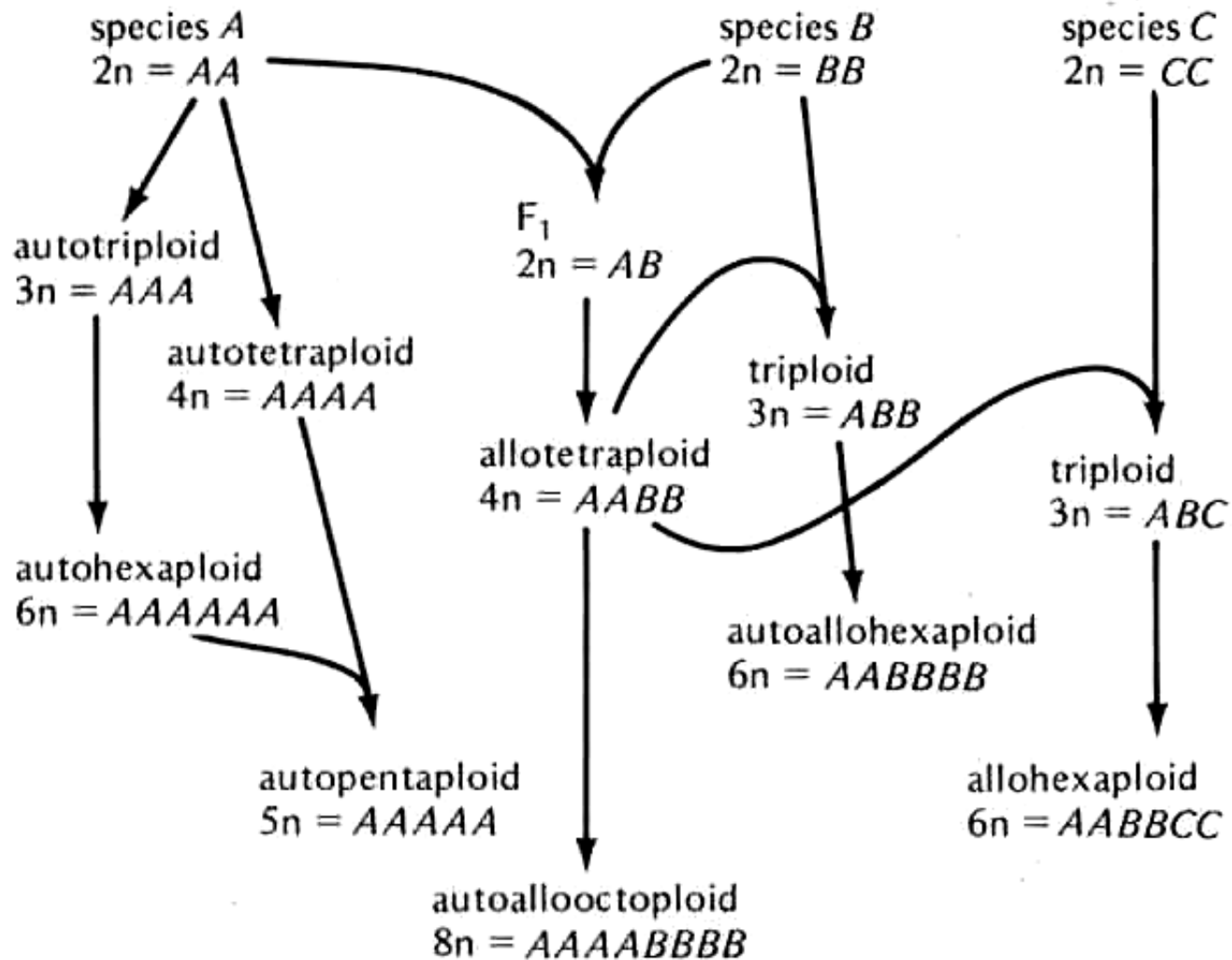


$2n + K$

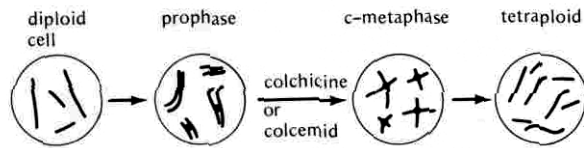
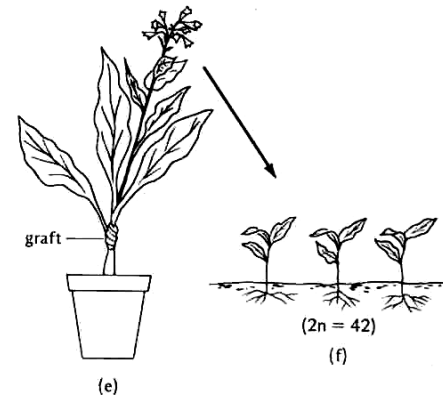
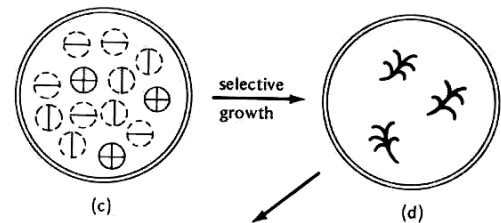
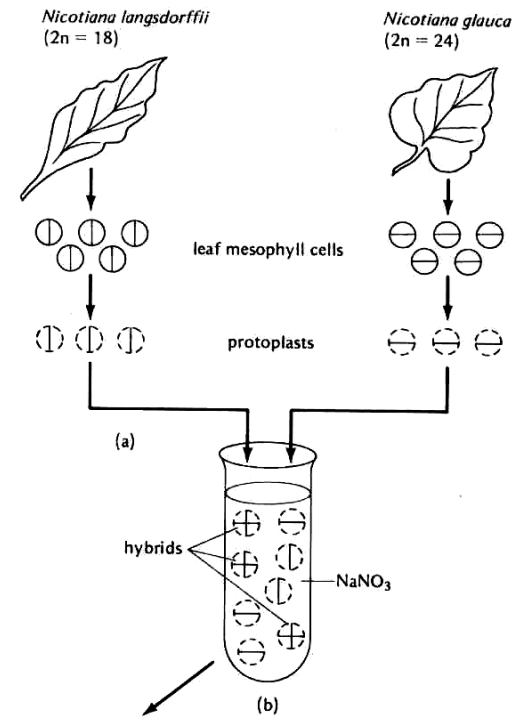


$2n + L$

Esquemas de POLIPLÓIDIZACIÓN

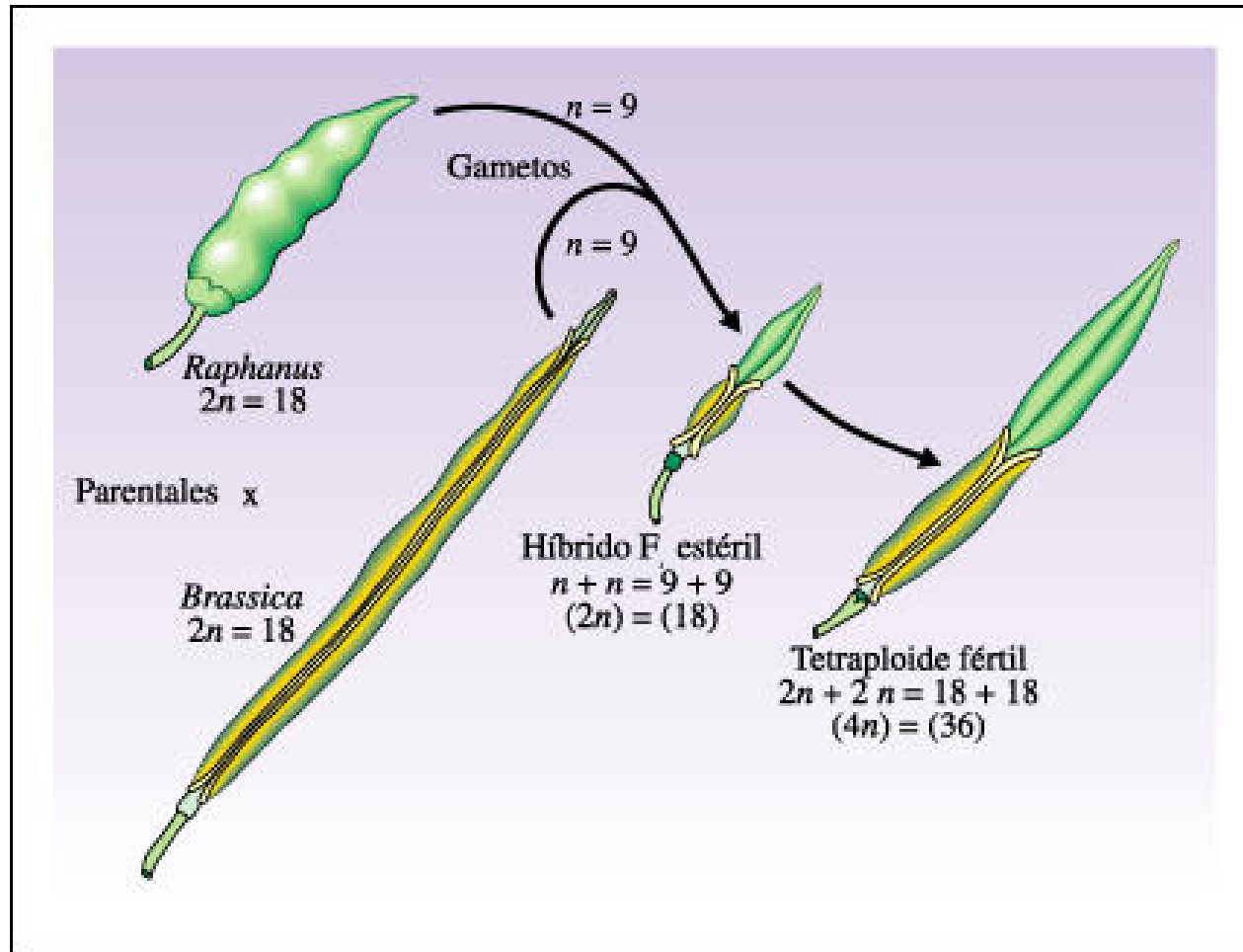


Creación de Híbridos



Creación de Poliploides

Creación de Híbridos



Selección Natural (Teoría de Darwin)

- Mecanismo a través del cual una especie se adapta a su ambiente.
- Los integrantes de una población varían extensivamente; no existen dos individuos idénticos (salvo gemelos univitelinos).
- Mucha de tal Variación es heredable. (pasa a través de las generaciones vía genes).

Selección Natural (Teoría de Darwin)

- Aquellos individuos cuyas características heredadas se ajusten mejor a su ambiente es más probable que puedan sobrevivir y dejar descendientes (sobrevivencia del más ajustado “fittest”)

Selección Artificial (cruzamiento selectivo)

- **El hombre evolución como cazador-recolector**
- **Al expandirse la población humana, la forma de vida original no permitía disponer de alimentos suficientes.**

•Hace entre 10-15.000 años, el hombre comenzó a domesticar animales y cultivar plantas.

•Aprendió a guardar una porción de semillas para plantarlas en la siguiente estación.

•Comienza también la selección de las semillas más adecuadas para sus necesidades.

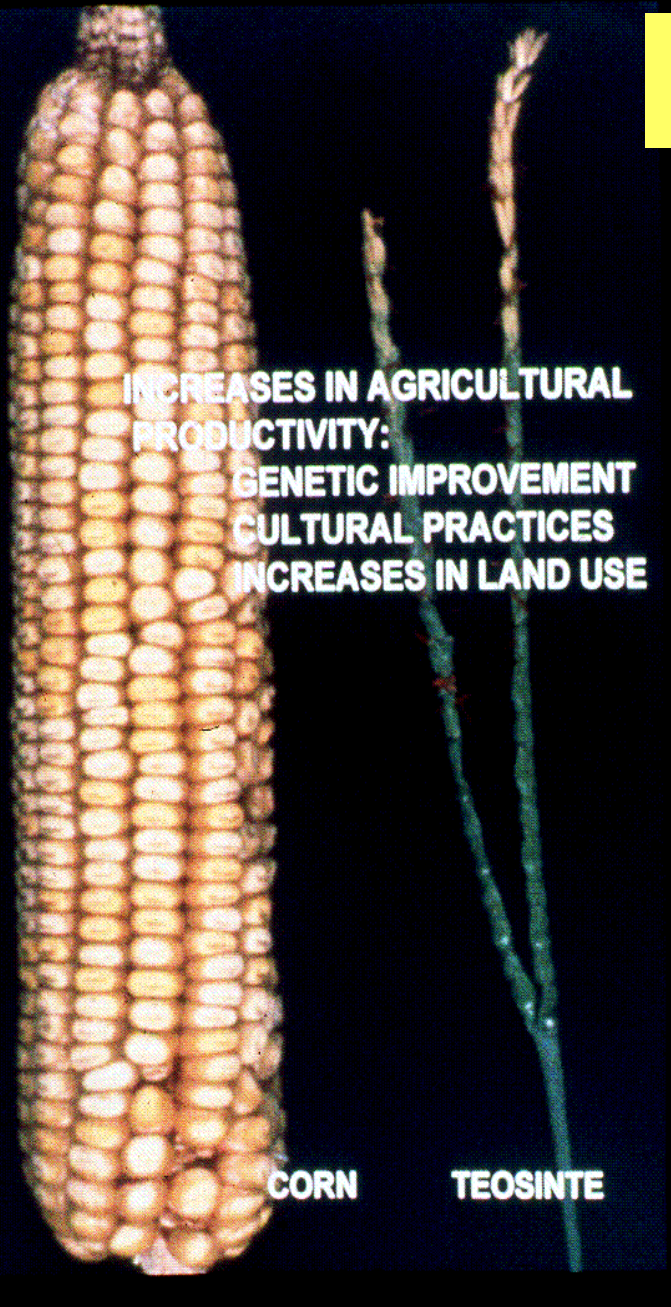
- **Seleccionó características deseables : mayor tamaño de semilla, capacidad productiva, resistencia a temperaturas extremas.**
- **No necesariamente tales características podrían conferir ventajas a las especies en condiciones naturales.**
- **Las plantas de interés agrícola fueron “modeladas” gradualmente mediante cruzamientos selectivos.**

Tecnología Agrícola

Gráfico de Escala Temporal

2,000 BC
19thC
Early 20th C
Mid 20th C
1930s
1940s
1950s
1970s
1980
1980s
1990s
2000

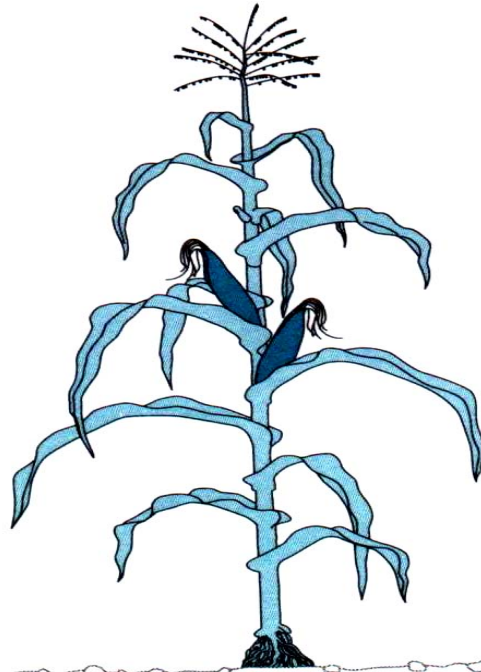
Cultivo
Cruzamiento selectivo.
Cultivo celular
ariaciónsomaclonal.
Rescate de embriones.
Poliembriogenesis
Mutagenesis and selection
Cultivo de anteras.
Recombinant DNA
Selección asistida por marcadores.
Genomica
Bioinformatica



Maíz

**Ejemplo de Selección artificial:
el pariente viviente más próximo es el
Teosinte**

Maíz



Teosinte

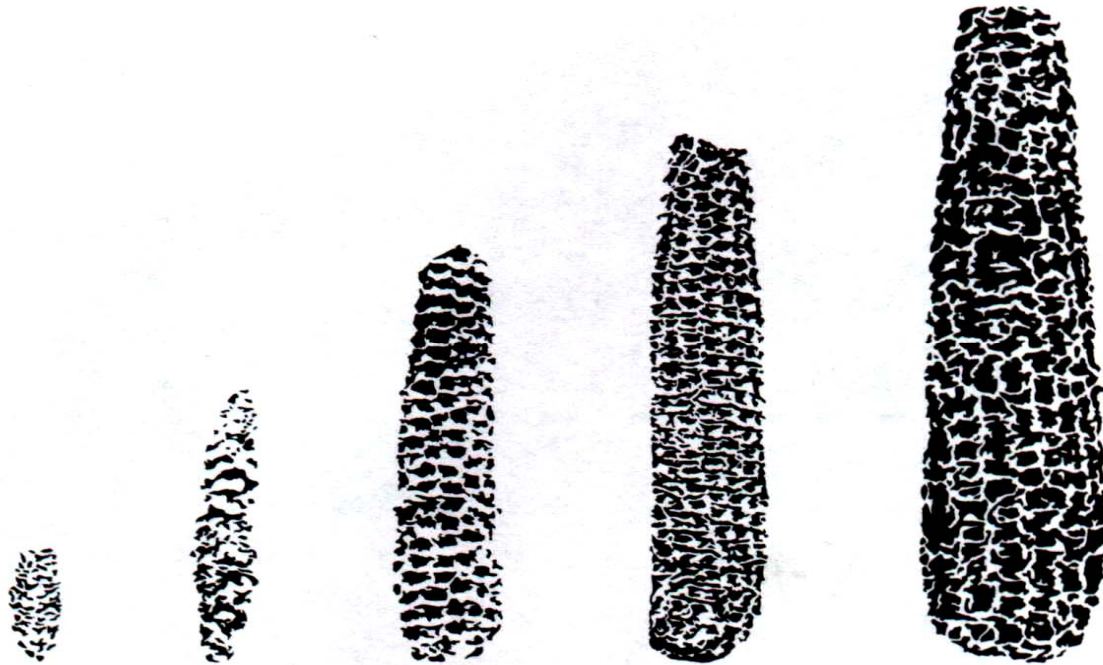


- **El Teosinte expande su energía produciendo muchos brotes vegetativos (Produce sólo 100 Kg de semilla por hectárea).**
- **Desde 1500 AC hasta 1500 DC, la producción aumentó, probablemente, hasta 350 Kg por hectárea.**

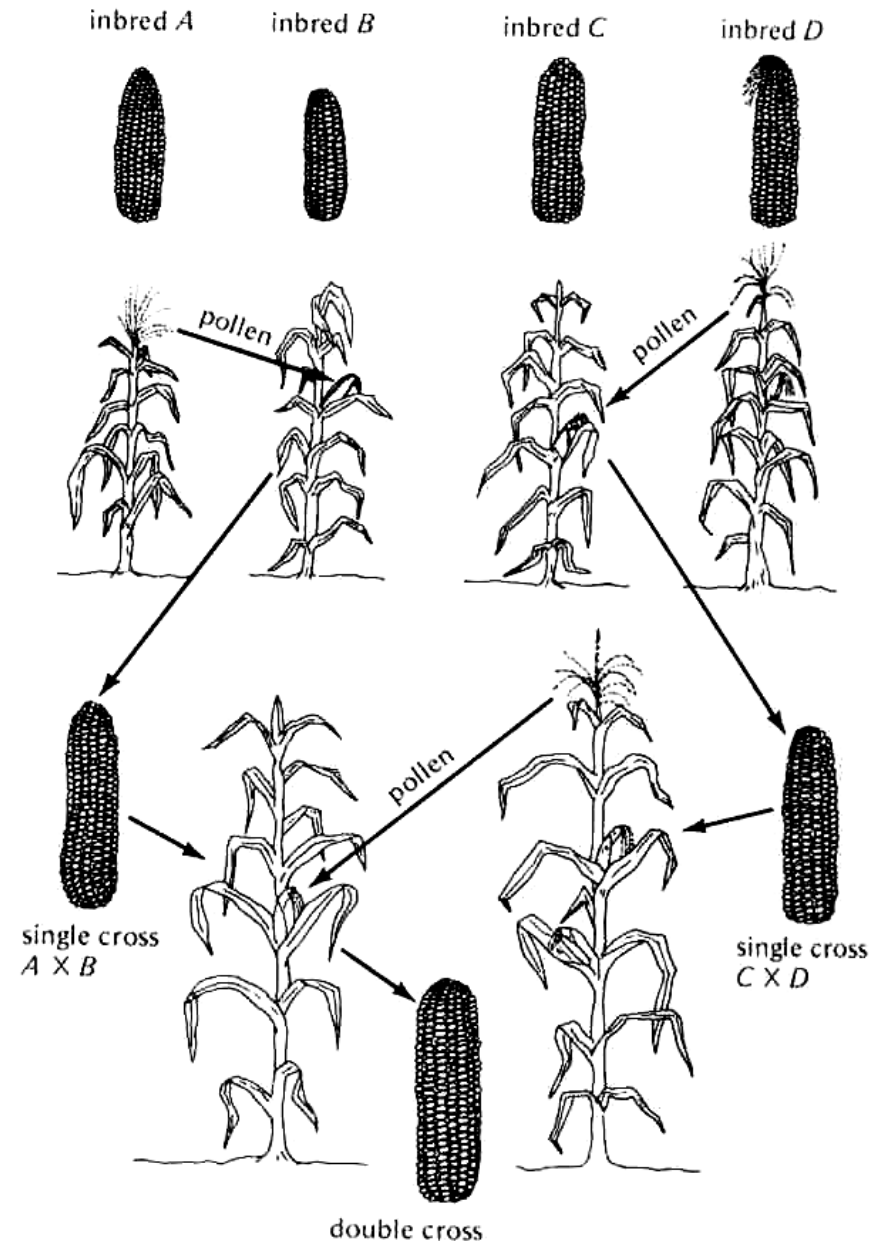
•Aumento del tamaño del marlo en el lapso de más de 3000 años.

Figure 10.5

Increase in the Size of Corn Between 1500 B.C. (left) and A.D. 1500 (right) at Tehuacan, Mexico. The oldest cob is less than an inch in length, typical of those of corn's probable ancestor, teosinte. Source: D. B. Byers, ed. (1967), The Prehistory of the Tehuacan Valley, vol. 1 (Austin: University of Texas Press).



Esquema de Cruzamiento en Zea maiz



Trigo Panadero

- **Ejemplo de selección natural y mejoramiento artificial.**
- **Presenta más de un conjunto cromosómico= POLIPLOIDE.**
- **Trigo de panificación (“Trigo Pan”) moderno es poliploide (Hexaploide).**
- **Ignorantes, los primeros agricultores seleccionaron a los poliploides; ya que en general tienen mayor producción.**

Figure 10.3

The Evolution of Wheat from Its Wild Relatives. Both einkorn and emmer wheats are found in the Fertile Crescent.

Diploid



Natural crossing

x

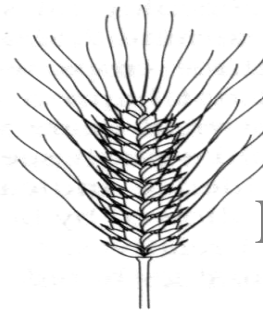
Diploid



Artificial crossing

x

Diploid



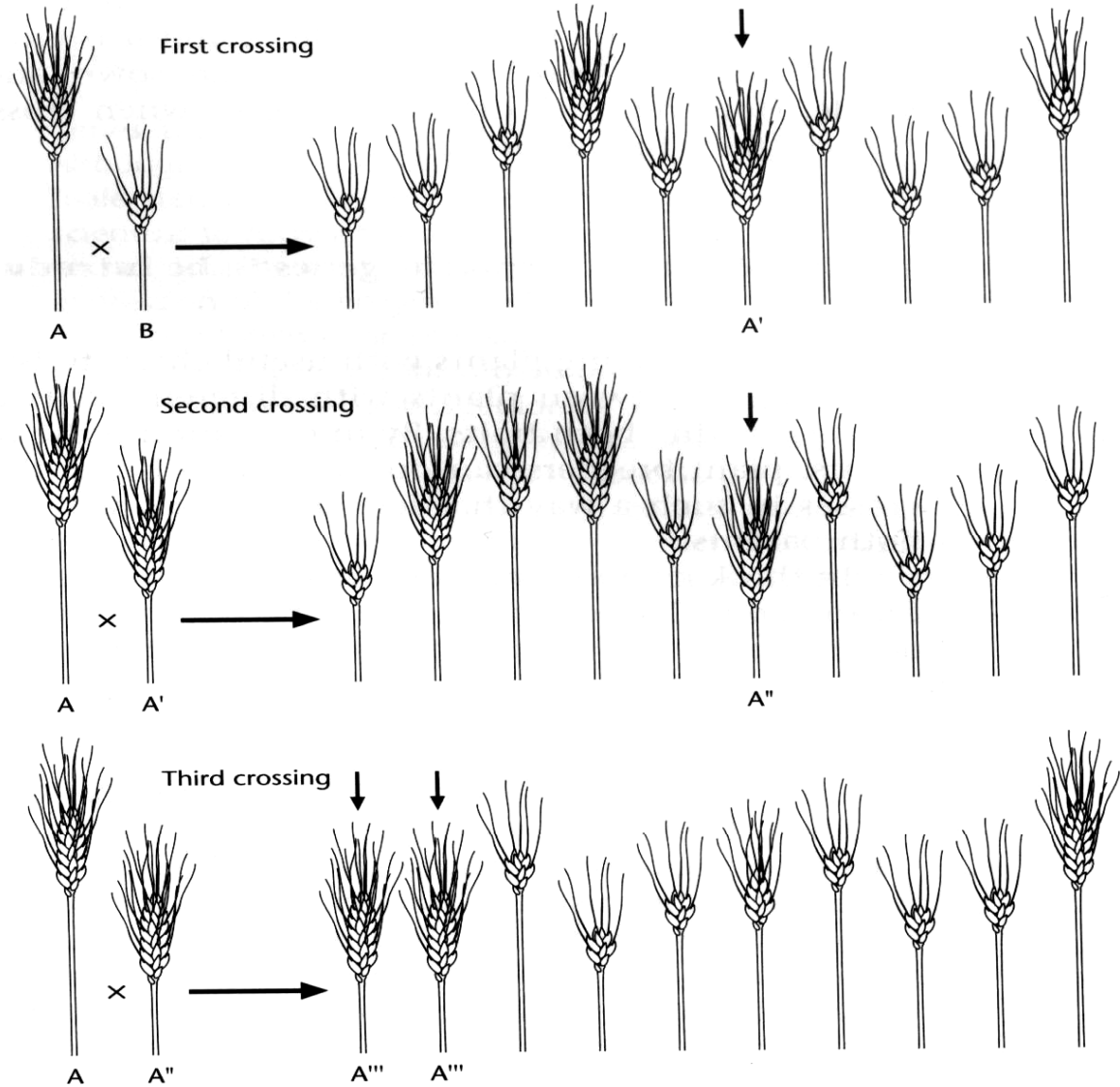
Hexaploid

Tetraploid (4 sets)

were found are believed to have been semipermanent settlements with populations of a few hundred people each. By 5000 B.C., such thriving agricultural communities were found in a wide area stretching from what is now Greece to Afghanistan. The agricultural way of life spread rapidly through Europe and western Asia, and by 1500 B.C., hunting and gathering as an exclusive way of procuring food was practiced only in the northern regions of this area. The early agriculturalists, like the subsistence farmers of today, probably supplemented their harvests with foods gathered from the wild.

Figure 10.12

Hypothetical Scheme for Backcrossing. The objective is to introduce the gene for shortness from strain B into the high-yielding wheat strain A. From the first cross of $A \times B$, plants (A') are selected that resemble A but are shorter. This selection is done after the progeny of the first $A \times B$ cross have been allowed to self-fertilize to make sure that the gene for shortness is homozygous. These are then crossed to the initial strain, A. Once again, plants (A'') are selected that resemble A but are shorter. These in turn are crossed back to strain A. After repeated crossing and selections, the gene for shortness of strain B becomes part of strain A.



Tipos de Cruzamientos Selectivos

- 1) Selección de Líneas Puras.**
- 2) Híbridos y vigor híbrido.**

1) Selección de Líneas Puras.

- Selección única de plantas deseables sólo éstas podrán reproducirse.
- Se mantienen así las características deseadas.
- Plantas autofertilizantes (v.g Trigo panadero) facilitan este tipo selección.
- Permite fijar características deseables.
- Se debe lograr la autopolinización de las plantas.

2)Hibridación

- **Híbrido= Un individuo que resulta de un cruzamiento entre progenitores genéticamente diferentes.**
- **Ejemplo: cruza entre Einkorn con Goatgrass para dar el híbrido Emmer.**

Vigor Híbrido

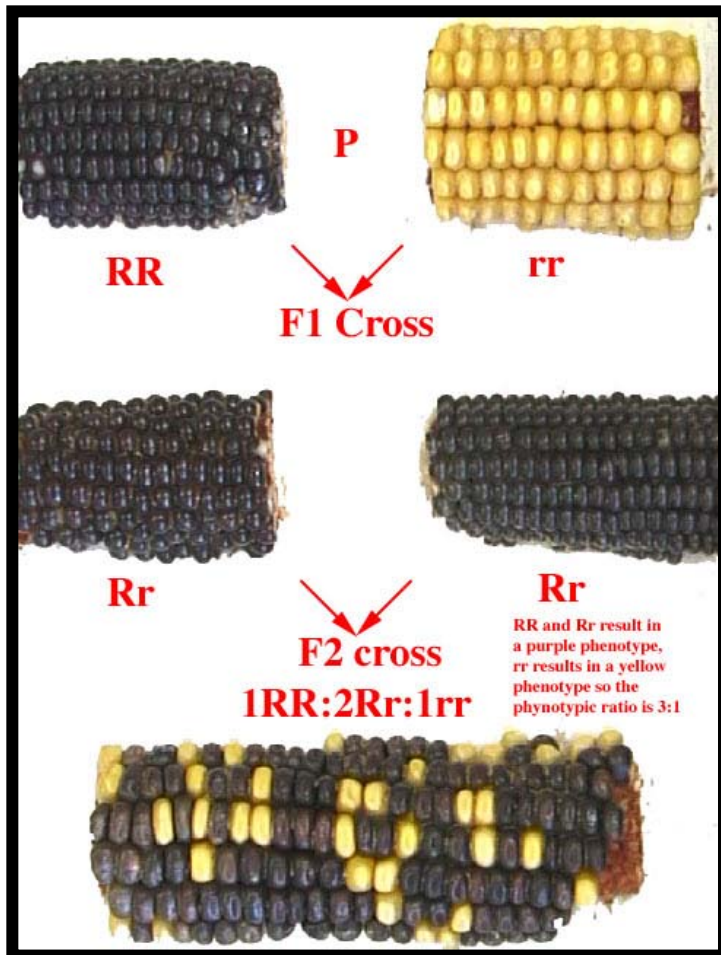
- **En 1908, G.H Shull cruzó dos líneas de maíz genéticamente diferentes.**
- **Ambas líneas producían aproximadamente 20 choclos por acre.**
- **Los híbridos de 1era. generación produjeron 80 choclos por acre.**

•Este fenómeno se denomina ‘Vigor HIBRIDO’

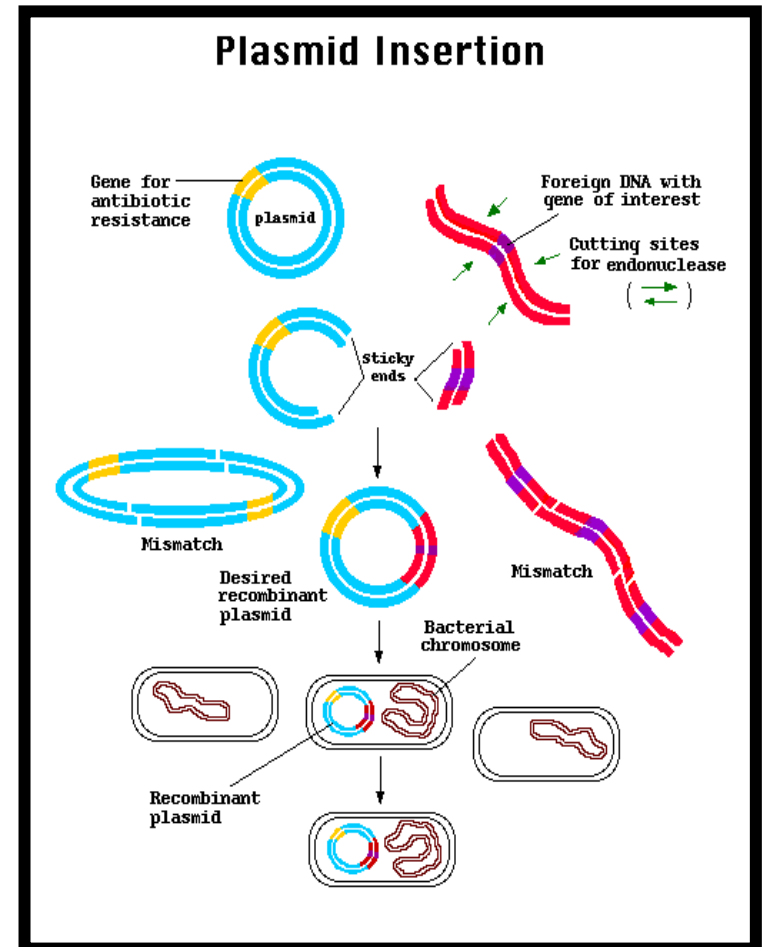
•Produce descendientes con más variedad genética - incrementando su ajuste

Biotecnología Vegetal

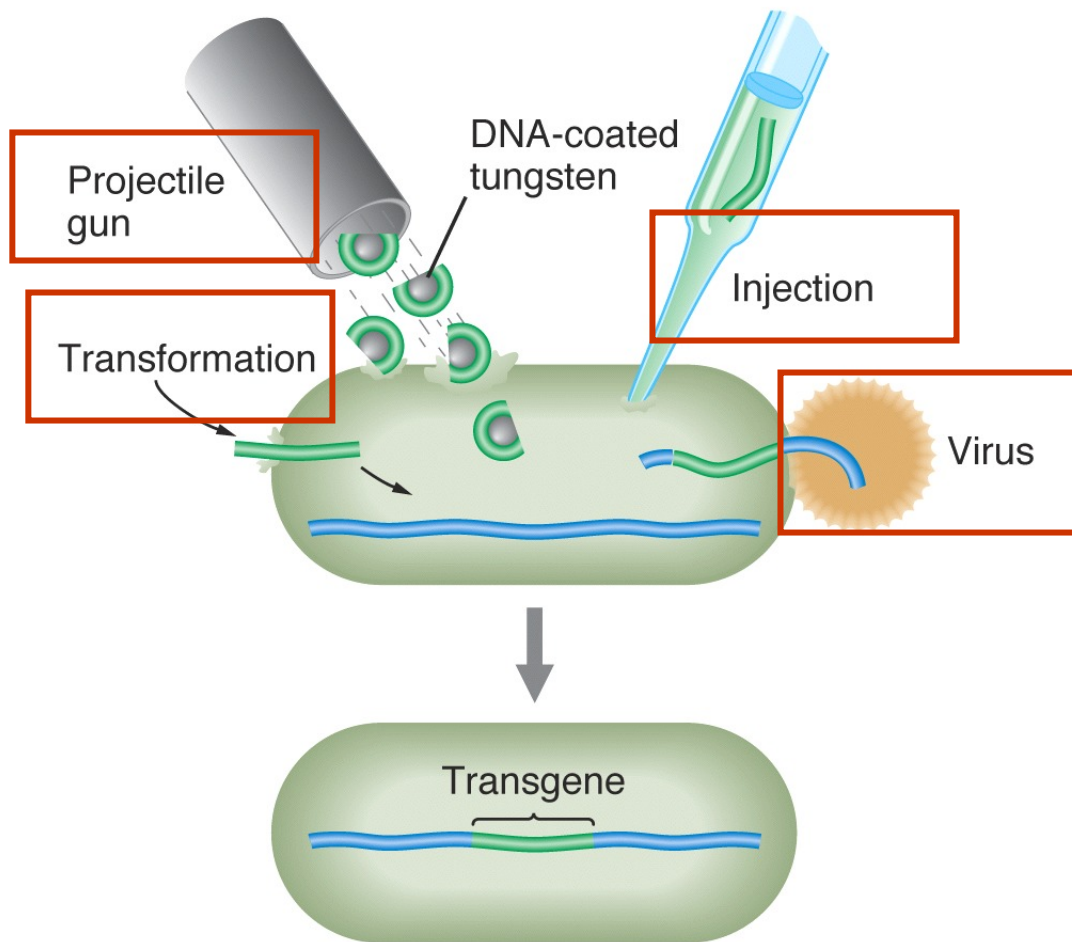
• Cruzamientos Tradicionales



Técnicas de AND Recombinante



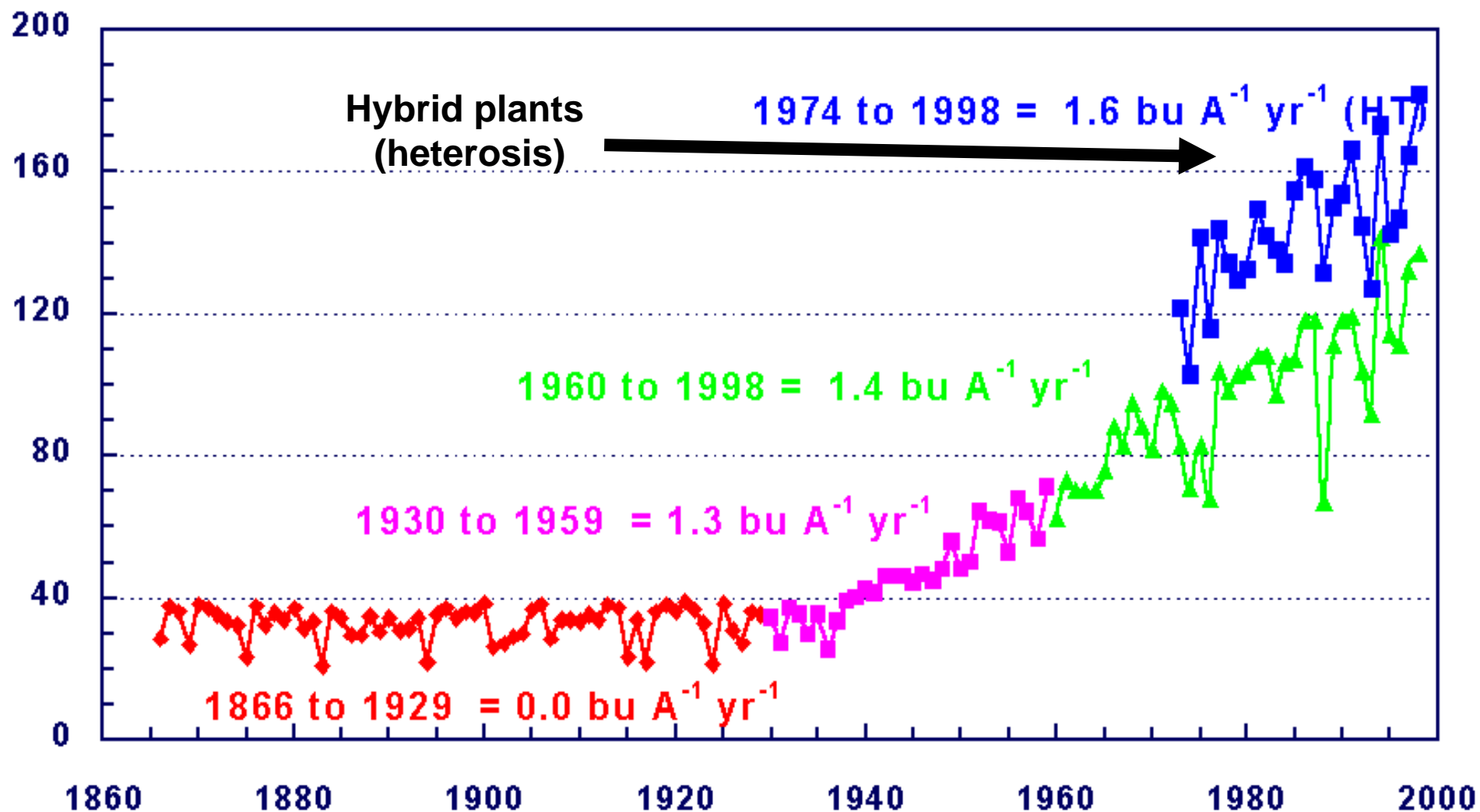
Introduciendo ADN en una célula



Se pueden emplear diversos métodos para introducir ADN en un genoma

.El cruzamiento fue el primer recurso

Producción de Maíz en Wisconsin desde 1866

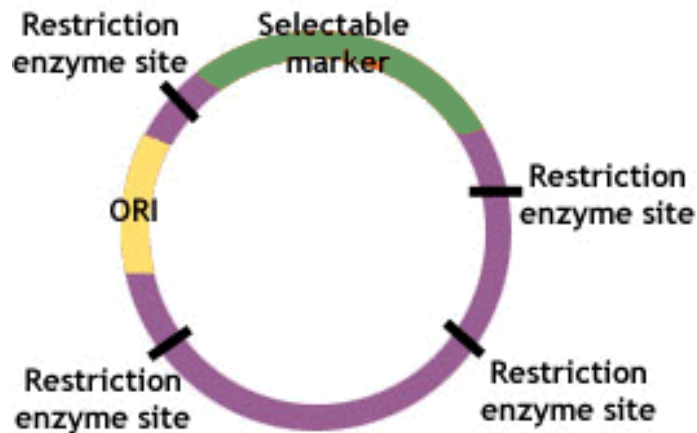


Biotecnología Agrícola

	<u>Cruzamiento</u>	<u>AND Recombinante</u>
Especies	Relacionadas	Relacionadas o No
Eficiencia	↓	↑
Suceptibilidad a influencias de genes externos	↑	↓
Genes desplazados por cada experimento	Decenas de f 1000	1 – pocos
Inserciones Aleatorias	+	+
Insectos/Herbicidas	↓	↑
Fertilizantes	↓	↑
Resistencia a poución	↓	↑
Toxinas Potenciales/riesgo	+	+

Introducción de genes en plantas

1) Infección células vegetales con plásmidos
Como vectores portadores de genes de interés



2) Con disparos directos a las células con
balas microscópicas Cubiertas con genes
de interés



Agrobacterium tumefaciens

Agente patógeno...

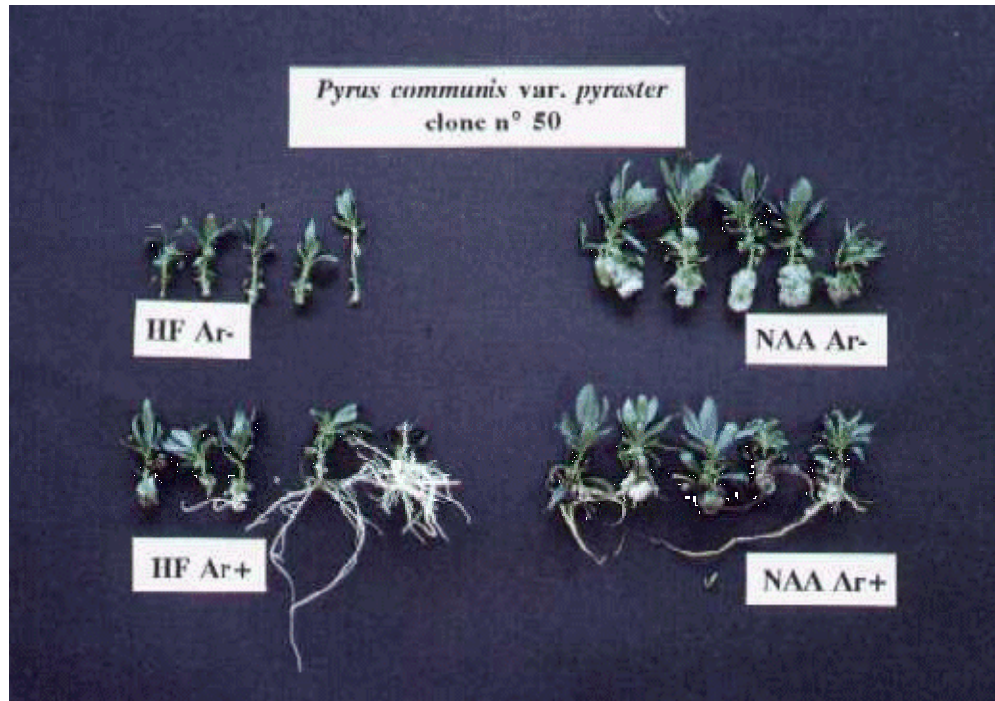
Presenta un mecanismo particular de patogénesis...

Biología permite la producción eficiente de cultivos genéticamente modificados OGM ...

Agrobacterium spp son bacterias del suelo con forma de bacilo, gram(-), causantes de diversas enfermedades en Las planta. Las cepas virulents poseen mega-plaámidos (140-130 kb), además de sus ADN cromosómico



A. rhizogenes – enfermedad de las “raíces pelutas”
B. Menos estudiadas, pero con una biología muy similar a la de *A. tumefaciens*



Elec.J.Biotechnology
Vol.1 (1999)

A. rubi (produce agallas en frambuesas y moras)
A. radiobacter (saprobio, no patógeno;
Produce un antibiótico específico (*agrocina 84*) que
Suprime el crecimiento de la especies patógenas de
Agrobacterium)

Cuál es el Mecanismo Patogénico del *Agrobacterium*?

Había sido demostrado que un plasmido de grandes dimensiones era esencial para que los agallas en corona (tumores) pudieran desarrollarse. El plásmido de *A. tumefaciens* fue denominado **plasmido Ti** (tumour-inducing, inductor de Tumores). En forma similar el plásmido de *A. rhizogenes* fue denominado **plasmido Ri** (root – inducing o inductor de raíces.).

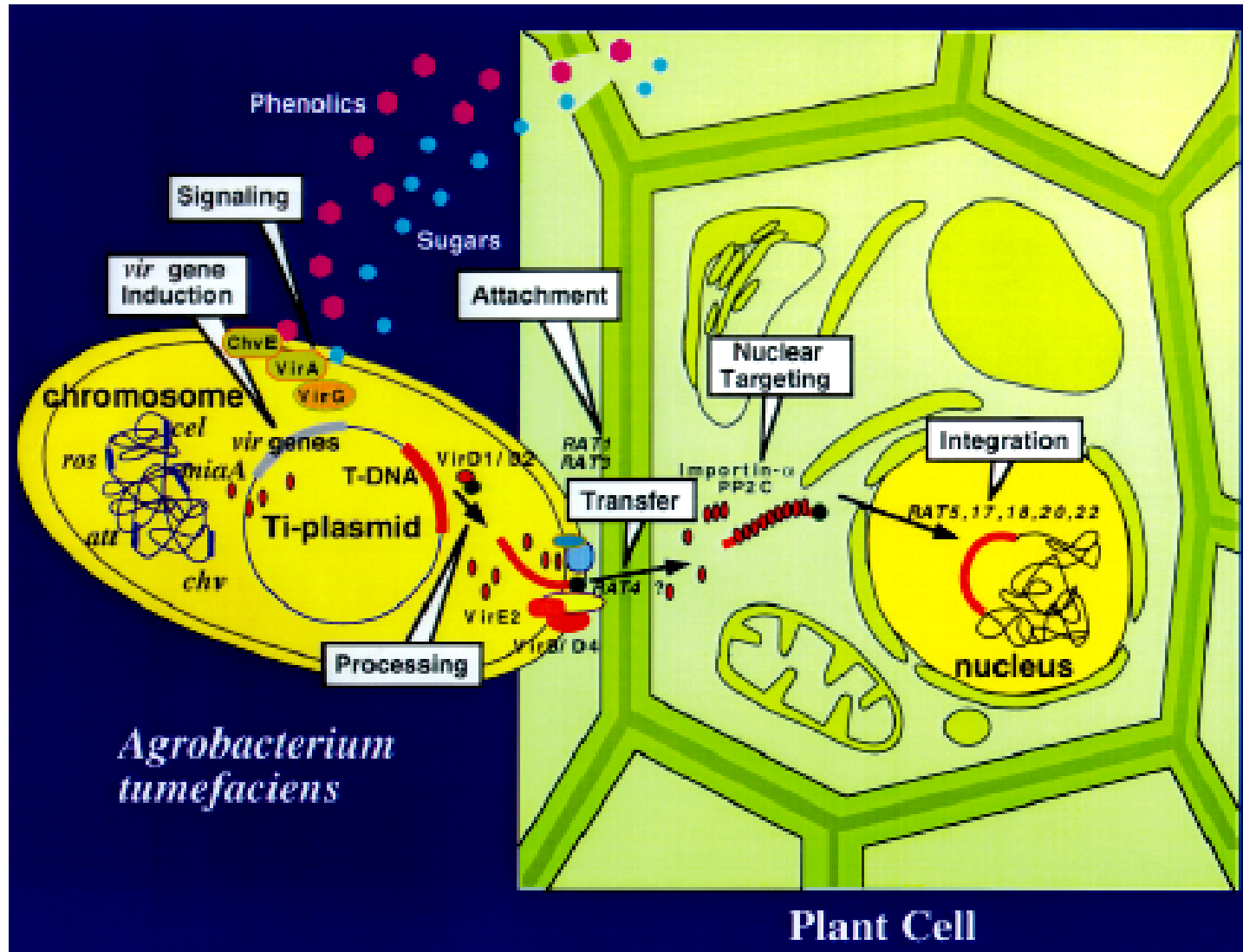
Inicialmente se había postulado que estos plásmidos podrían ser transferidos en forma activa a las células huésped, , la tecnología de aquel momento no era suficientemente sensible para detectar pequeñísimas adiciones de ADN a los grandes genomas vegetales.

Con la aparición de la metodología Del ADN recombinante (v.g. enzimas de restricción e hibridación de ADN-ADN) fue posible examinar la transferencia de DNA en forma más detallada.

Un conjunto de técnicas bioquímicas y genéticas permitieron establecer que sólo una pequeña parte del plásmido Ti era transferido a las células huésped, y que el fragmento de ADN transferido (**ADN-**) fue incorporado en forma permanente en el genoma del huésped.

La formación de las agallas, también resultó dependiente de un pequeño número de genes (**oncogenes**), también codificados en el ADN-T. Estos genes codifican enzimas que inducen la división celular de las células del huésped, como así la síntesis de compuestos de nitrógenos inusuales (**opines**) en los tejidos de las agallas.

Formación de la Agalla - Esquema General



Formación de la Agalla - Detalles

1. Localizando y Conectando

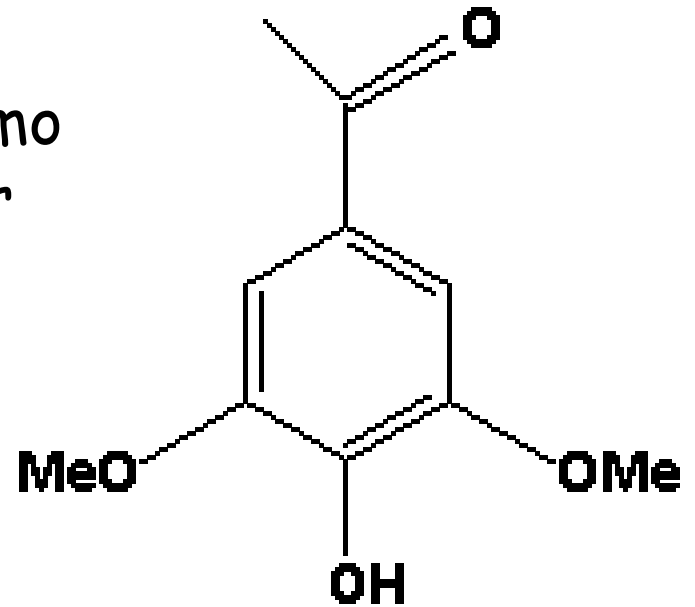
Agrobacterium invade la planta huésped desde los sitios de heridas recientes. Las heridas parecen tener dos efectos relevantes para la colonización del *Agrobacterium* -

a) Libera un metabolito fenólico asociado con la pared celular (inductor de virulencia) que es detectado por *Agrobacterium* que responde activando genes necesarios para la transferencia de ADN .

b) Crea una zona de células que se dividen activamente a medida que el tejido lastimado es cicatrizado.

Los inductores fenólicos de los 'genes vir' son productos phenylpropanoides del metabolismo de la planta. Estos parecen estar relacionados con las moléculas que son usadas para endurecer la matriz de polisacáridos de la pared celular, v.g. cross-linkers fenólicos y lignina polimérica.

La inducción de los genes Vir es también intensificada por la presencia de azúcares simples Así como por el pH ácido, ambos indicativos de daño de la célula vegetal

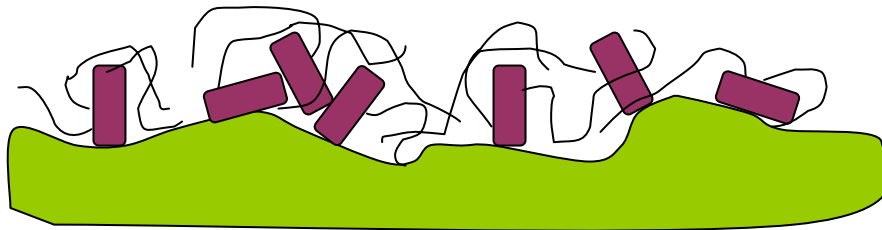


acetosiringona

Agrobacterium fijarse físicamente a las paredes De la célula vegetal antes que pueda transferir su ADN-T

Basado en el aislamiento de "mutantes defectivos para la fijación"
, la fijación parece requerir la síntesis inicial de cadenas poliméricas de
beta-1,2-glucan por parte de la bacteria.

El blanco para este glucano sobre la superficie célula de la planta
No fueron todavía identificadas (lectinas?)

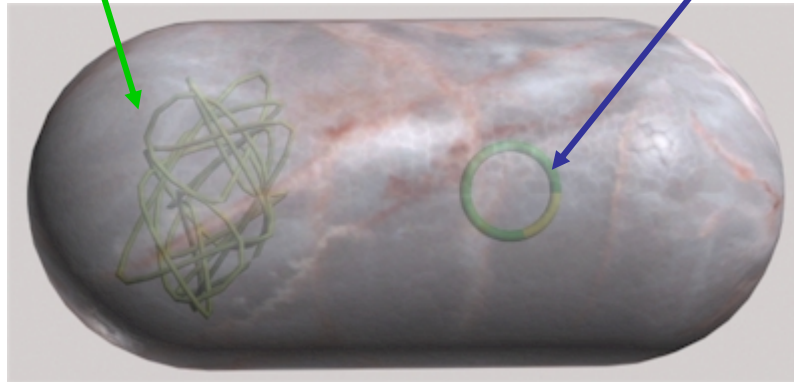


Una vez que el contacto inicial se ha establecido, la bacteria
Elabora una trama de fibrillas de celulosa (*beta*-1,4-glucano)
Que ayuda a anclar las bacterias a la pared de las células
de la planta.

Movilización de ADN

Agrobacterium está muy estrechamente relacionado con el género *Rhizobium*.

Ambos habitualmente poseen un **plasmido** además de su cromosoma



La diferencia en sus roles biológicos están en gran medida determinados por los genes que portan estos plásmidos v.g. intercambio de plásmidos puede crear un *Rhizobium* que forma tumores o callos.

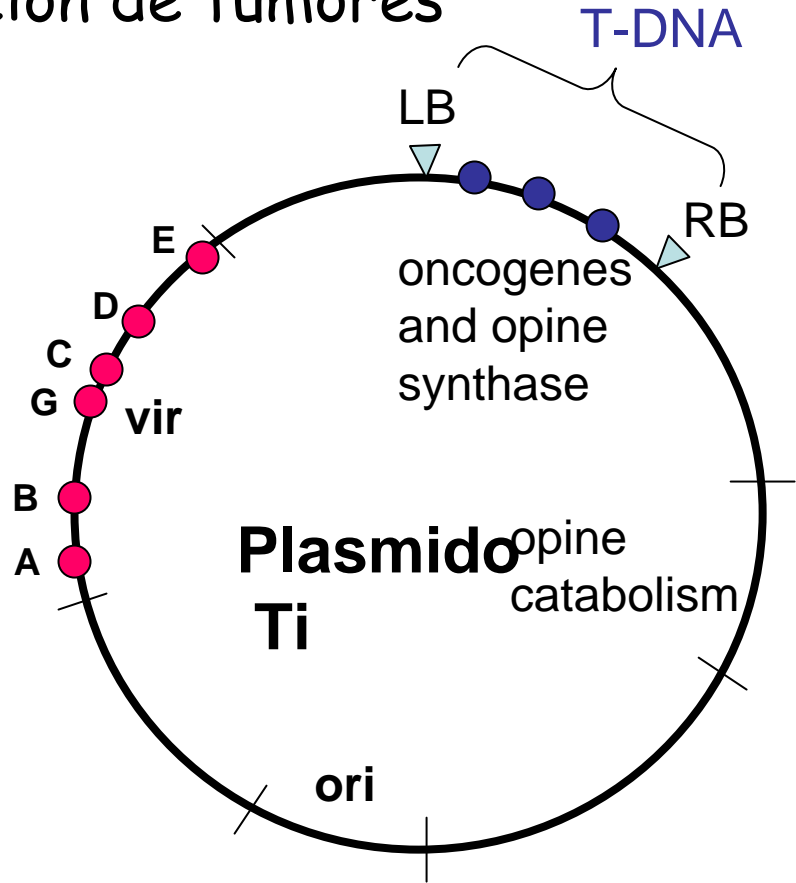
Plásmido Ti

3 regiones importantes para la movilización del ADN mobilization e inducción de tumores

ADN-T

Bordes del ADN-T

Región Vir



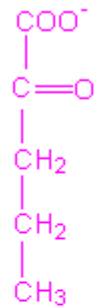
ADN-T

⇒ codifica genes vinculados con caminos biosintéticos de opinas

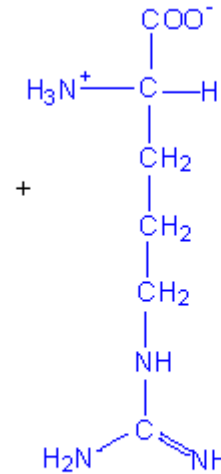
⇒ codifica genes para la síntesis de fitohormonas (auxinas y citokininas)

Estos genes del AND_T tienen estructuras promotoras y uso de codones que les permiten ser eficientemente transcritos en las células de la planta, pero no en la bacteria.

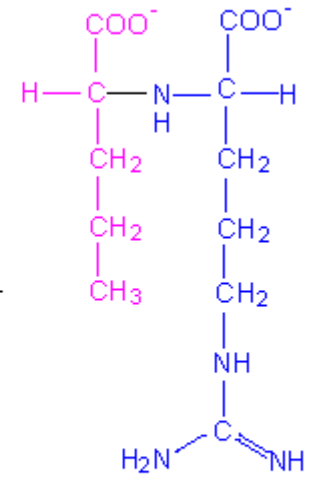
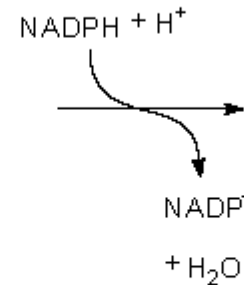
Reacción de la nopalina sintasa (NOS)



α - keto - glutarate



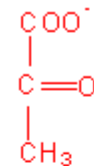
arginine



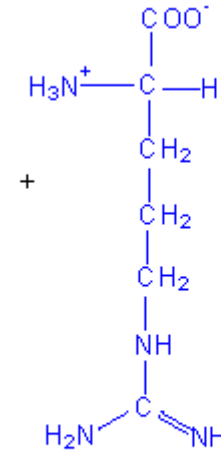
nopaline

nopalina = arginina + *alpha*-cetogluturato
 octopina = arginina + piruvato
 mannopina = glutamina + manosa

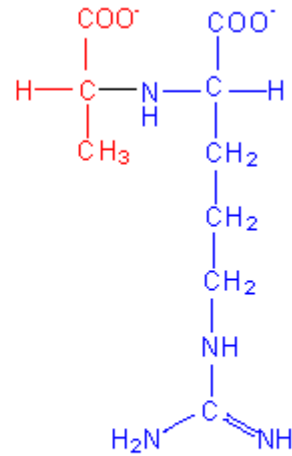
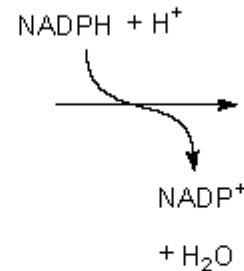
Reacción de la Octopina Sintetasa (OCS)



pyruvate



arginine



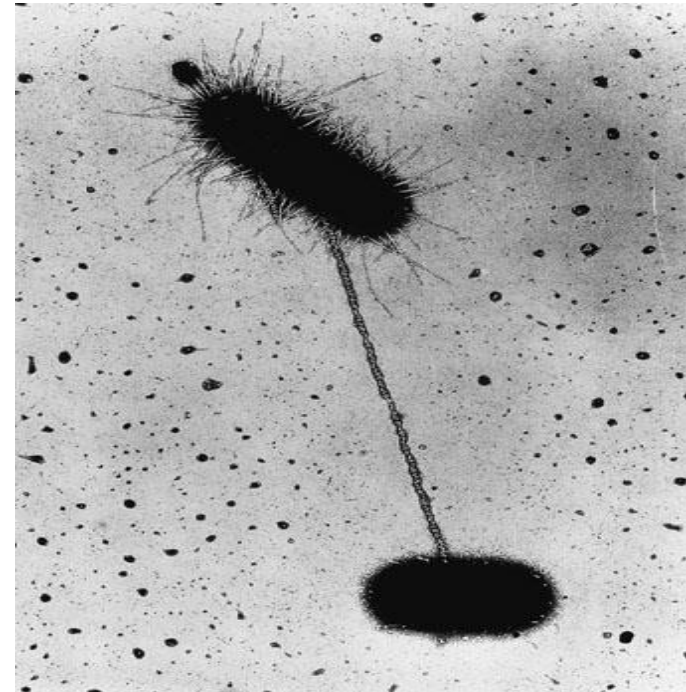
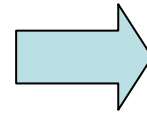
octopine

Las Opinas son nutrientes inductores

Las células de la planta comienza a segregar **opinas**
Codificadas por el ADN-T “inyectado desde la célula bacteriana

Las opinas difunden
hacia las células circundantes
y sirven de moléculas-señales
para la conjugación
de los agrobacterium

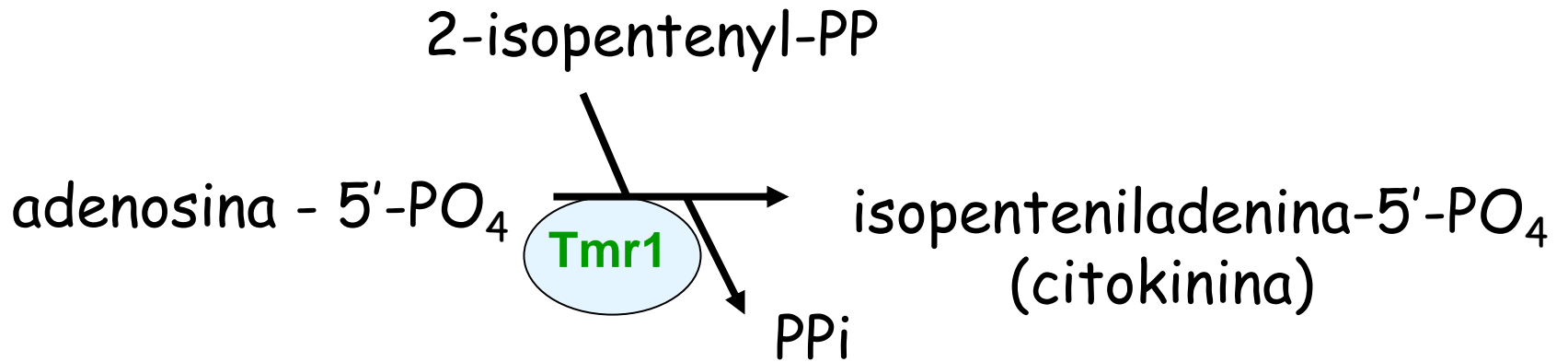
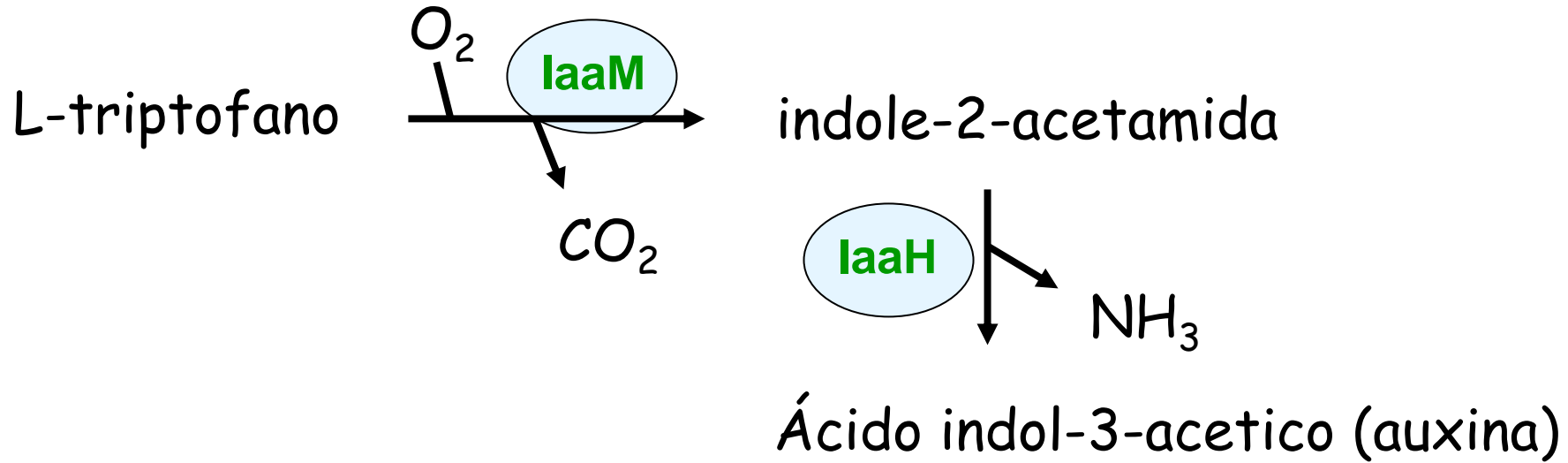
(Estimulación en Quorum)



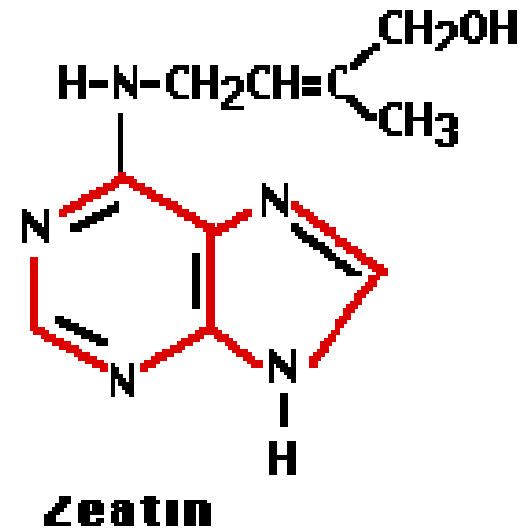
Genes del ADN-T y la Formación de Tumores

ADN-T de cepas salvajes de *Agrobacterium* también codifican enzimas para la síntesis de **fitohormonas**

La producción de fitohormonas es catalizada por 2 productos génicos (Tms1 y Tms2) que convierten el triptofano en ácido indol-3acético acid (IAA), y otro (Tmr/Ipt) que convierte la adenina en isopentenil adenine.



Citokininas son hormonas vegetales derivadas de la purina **adenina**.



Zeatin es una de las citokininas cuya Síntesis puede estar codificada en el Plásmido-Ti

Aislada del maíz (*Zea mays*).

Expresión célula-específica de la Citokinina en la célula infectada por *A.tumefaciens*.

Genes Importantes Codificados por el Plásmido Ti

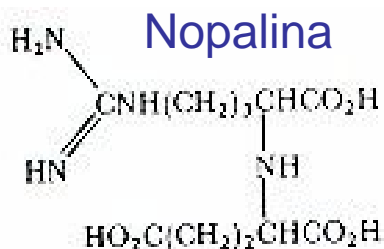
1. Citokinas

(hormona vegetal promueve la división celular y el crecimiento tumoral)

2. **Enzimas de la síntesis del ácido indoleacético (auxina)** Hormona vegetal (induce elongación del tallo y hojas, induce partenocarpia y previene el envejecimiento)

3. **Enzimas para la síntesis y liberación de nuevos metabolitos de la planta:**

Las **opinas** (derivados únicos de **amino ácidos**)
las **agrocinopinas** (derivatives fosforilados de azúcares) .



Opinas y agrocinopinas son **Nutrientes** para *A.tumefacies*.
No pueden ser usadas por otras especies bacterianas
Provee un nicho ecológico único para *A.tumefaciens*

Bordes del ADN-T

Secuencia de repetición directa de 24-25 bp sobre ambos lados del ADN-T

Region vir

Región de ~35 kb que contiene 6-9 unidades transcripcionales (virA, B, C, D, E, F, G, H, J)

Algunos de estos loci vir tienen **múltiples ORFs** (v.g. virB Tiene 11 ORFs), por lo que codifica ~23 proteínas putativas proteins are encoded

TABLE 1 Functions of Ti-plasmid–encoded virulence proteins in *Agrobacterium* and in plants

Virulence protein	Function in <i>Agrobacterium</i>	Function in the plant ^a	References
VirA	Phenolic sensor of a two-component regulatory system	N/A	3, 49, 94, 109, 133, 194, 207, 224
VirG	Phenolic response regulator of a two-component regulatory system	N/A	92, 115a, 194
VirB1-11	Synthesis and assembly of the T-pilus (VirB2 encodes a prepropilin)	N/A	12, 30, 54, 95, 97, 98, 108, 226
VirC1	Putative “overdrive” binding protein; enhancement of T-DNA transfer (?)	N/A	206a
VirD1	Required for T-DNA processing in vivo, and for double-strand T-DNA border nicking in vitro	N/A	90, 177
VirD2	1. T-DNA border-specific endonuclease 2. Putative “pilot protein” that leads the T-strand through the transfer apparatus and into the plant	1. Nuclear targeting of the T-strand 2. Protection of the T-strand from 5' exonucleolytic degradation 3. T-strand integration into the plant genome	47, 62, 90, 163, 191, 197, 214, 215, 230 52, 62, 77, 84, 221, 223, 232 34, 78, 85, 105, 106, 142, 206 52 142, 147, 205
VirE1	1. Required for VirE2 export from <i>Agrobacterium</i> 2. Chaperone for VirE2	N/A N/A	198 45a, 198a, 234a

(continued)

Resumen de las funciones de las proteínas vir (virulence)

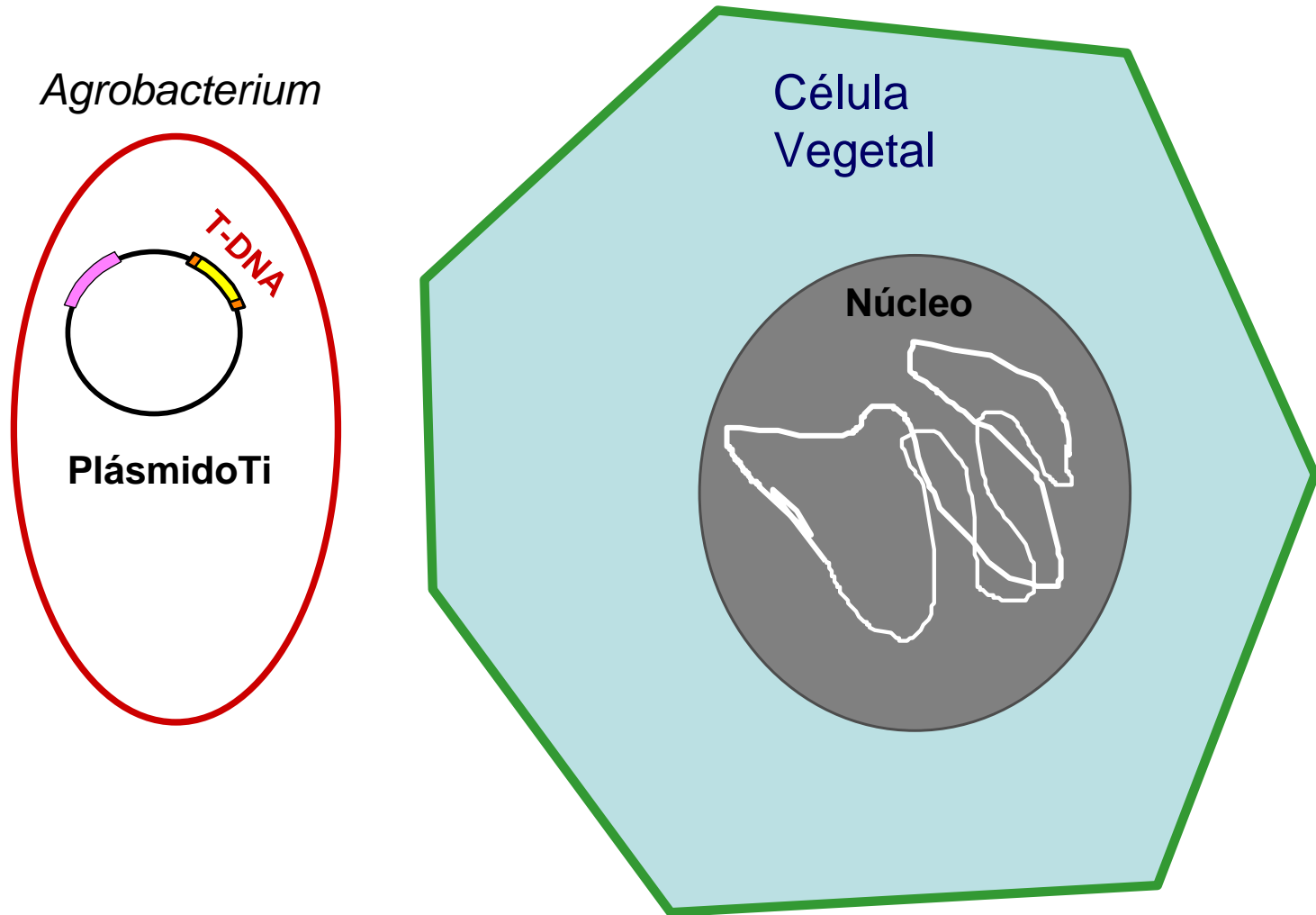
TABLE 1 (Continued)

Virulence protein	Function in <i>Agrobacterium</i>	Function in the plant ^a	References
VirE2	1. Formation of a putative "T-complex" in <i>Agrobacterium</i>		83
		1. Formation of a putative "T-complex" in the plant	66
		2. Protection of the T-strand from nucleolytic degradation	175, 233
		3. Nuclear targeting of the T-strand	34, 36, 326
VirF	?	4. Passage of the T-strand through the nuclear pore complex	33
		1. Host range factor	134, 167
		2. Possible interaction with Skpl proteins to regulate plant cell division cycle	Paul Hooykaas, personal communication
VirH (PinF)	1. Putative cytochrome P450 enzyme	N/A	100a
VirJ/AcvB	1. Putative T-strand binding protein; T-strand export from <i>Agrobacterium</i> (?)	N/A	228

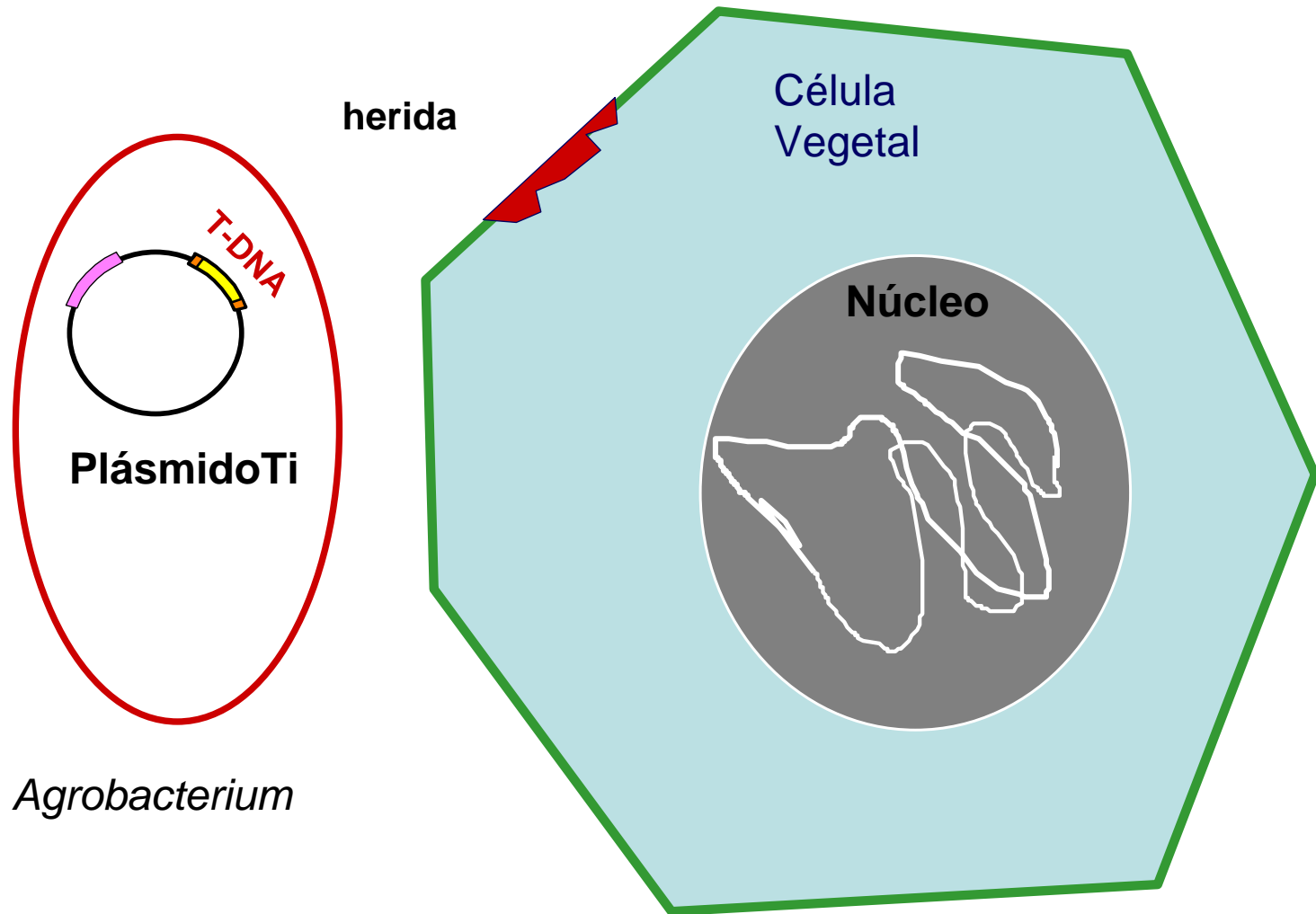
^aN/A, not applicable.

Resumen de las funciones de las proteínas vir (virulence)

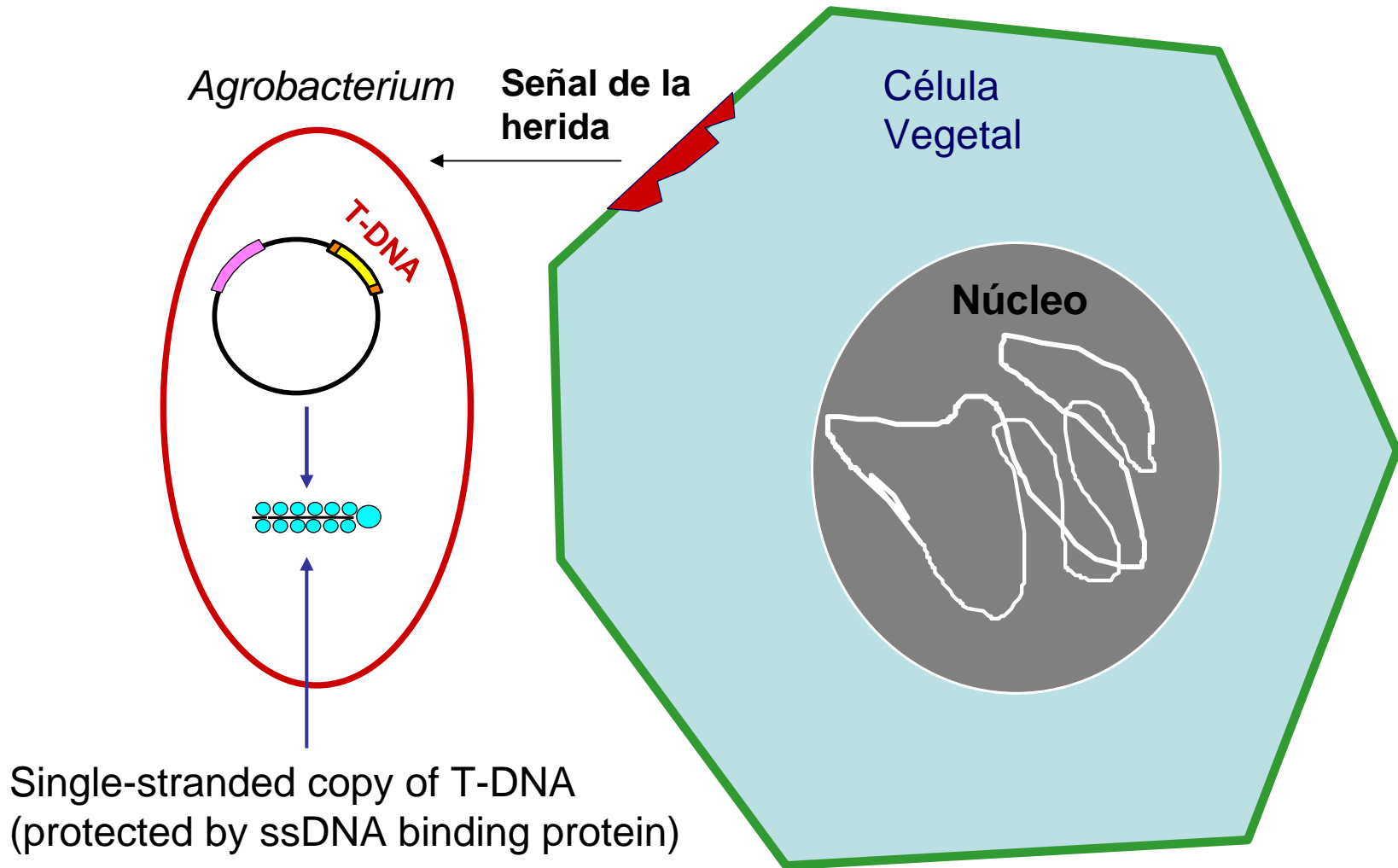
Transferencia del ADN-T desde el *Agrobacterium* a la célula vegetal

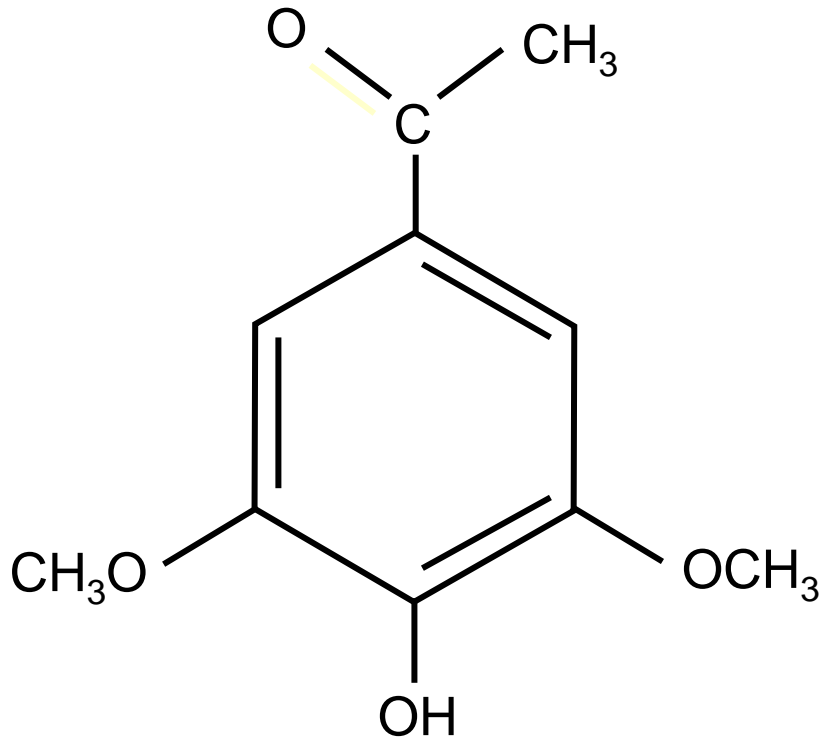


Transferencia del ADN-T desde el *Agrobacterium* a la célula vegetal

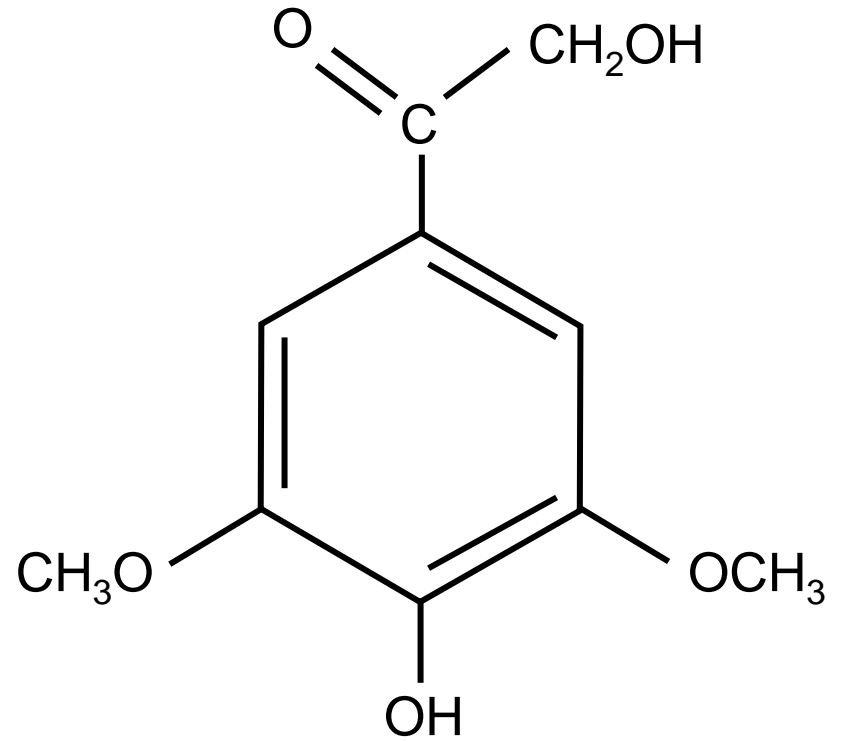


Transferencia del ADN-T desde el *Agrobacterium* a la célula vegetal





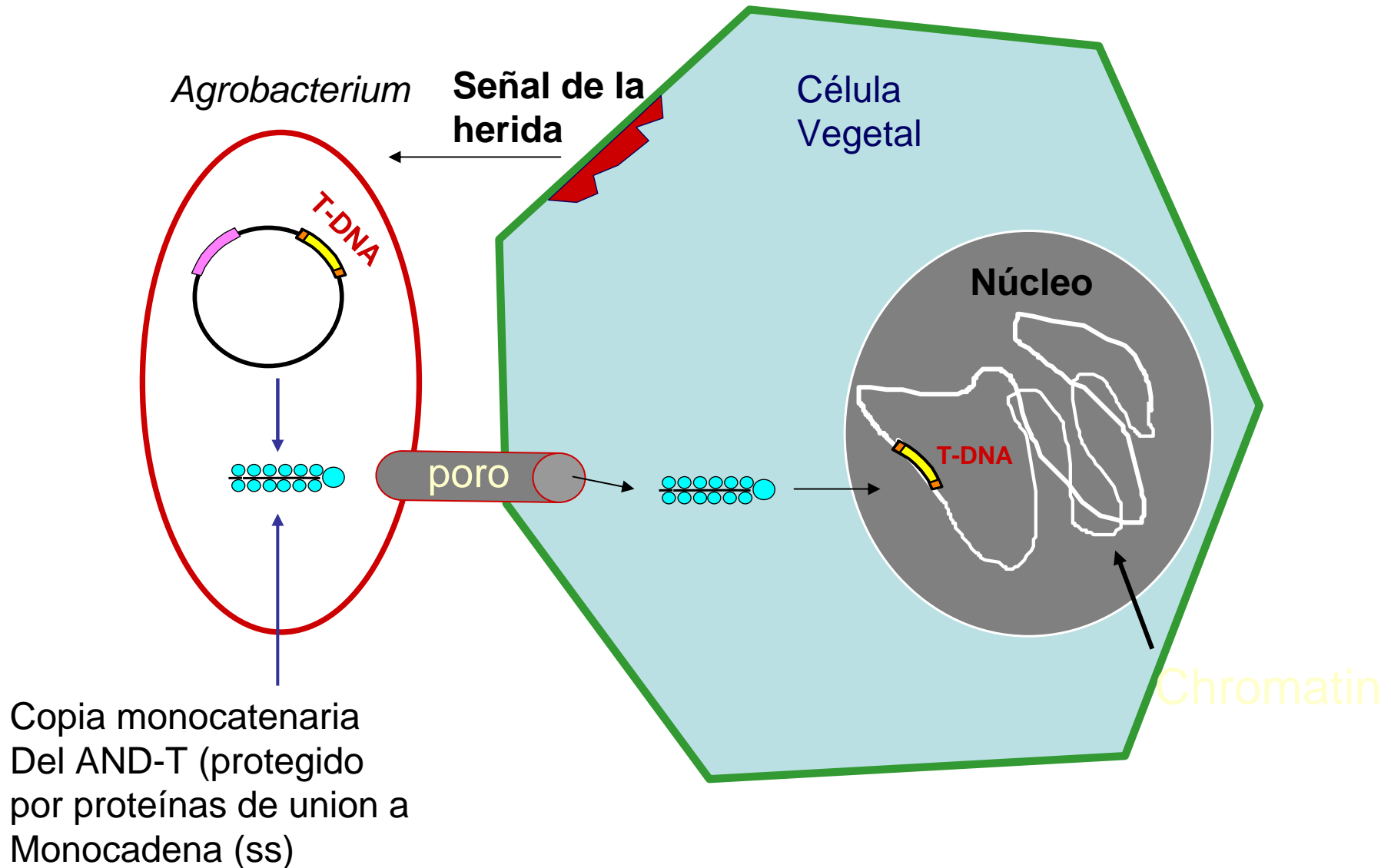
Acetosiringona



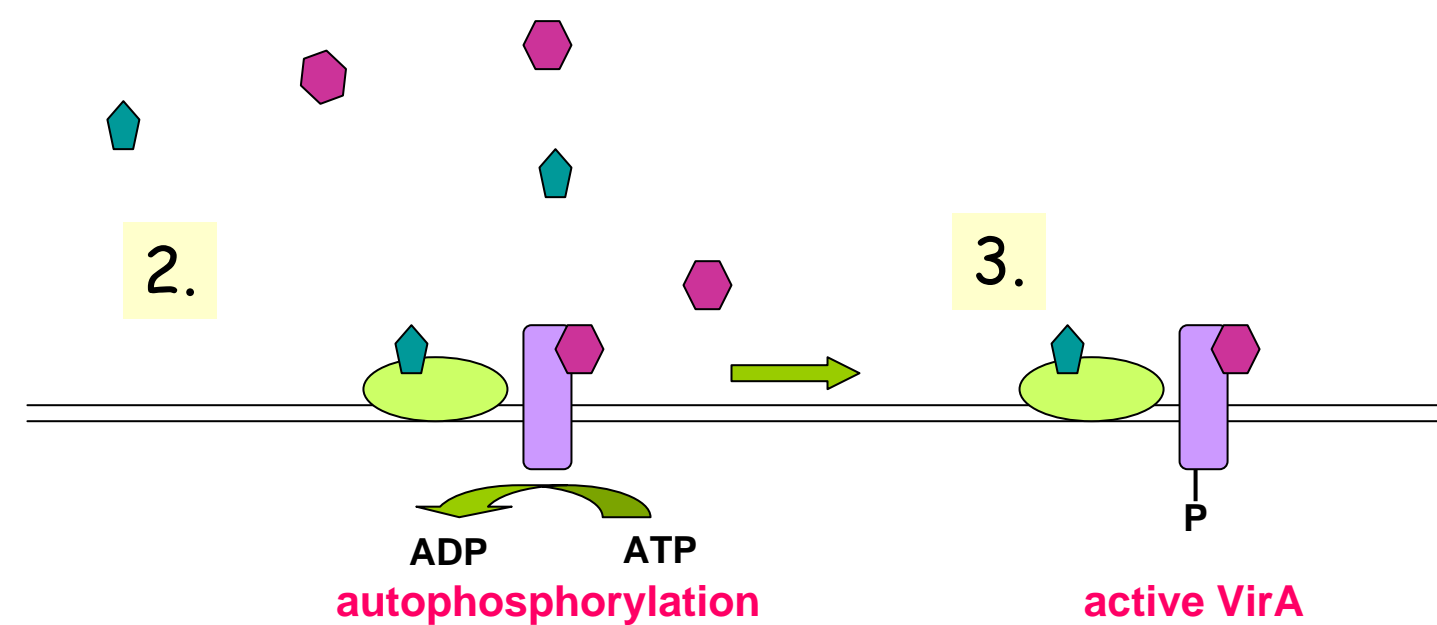
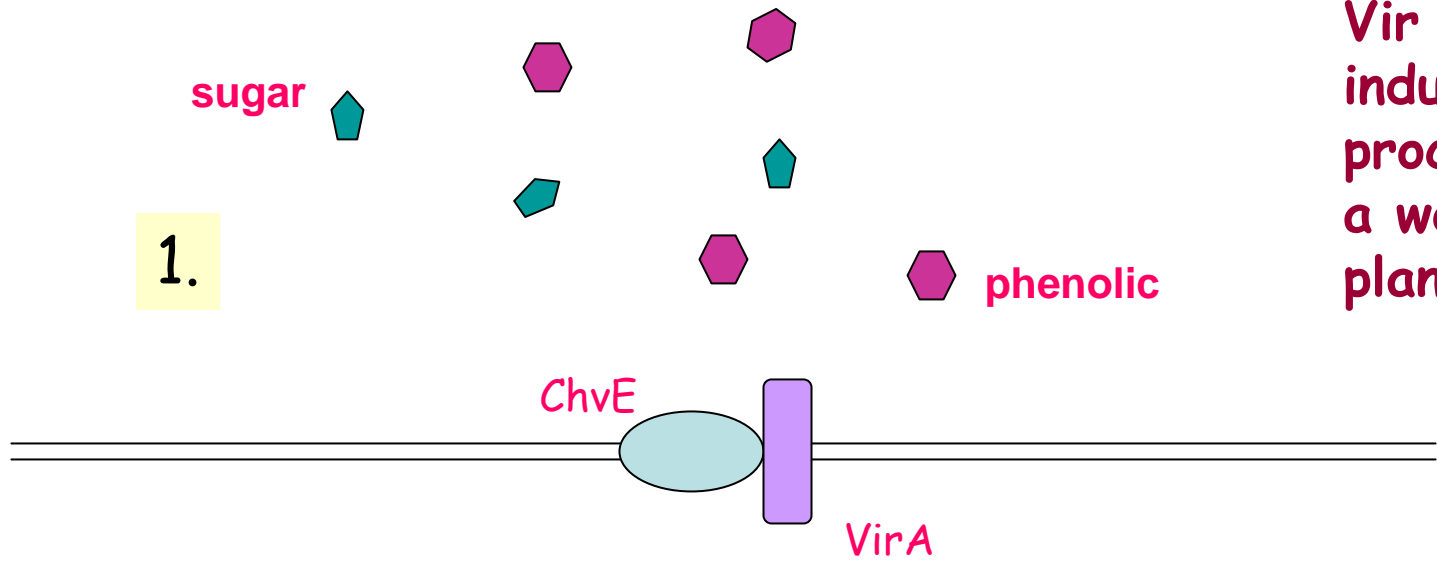
Hidroxiacetosiringona

Induce la activación de los genes de virulencia (vir) ubicados en el plásmido Ti

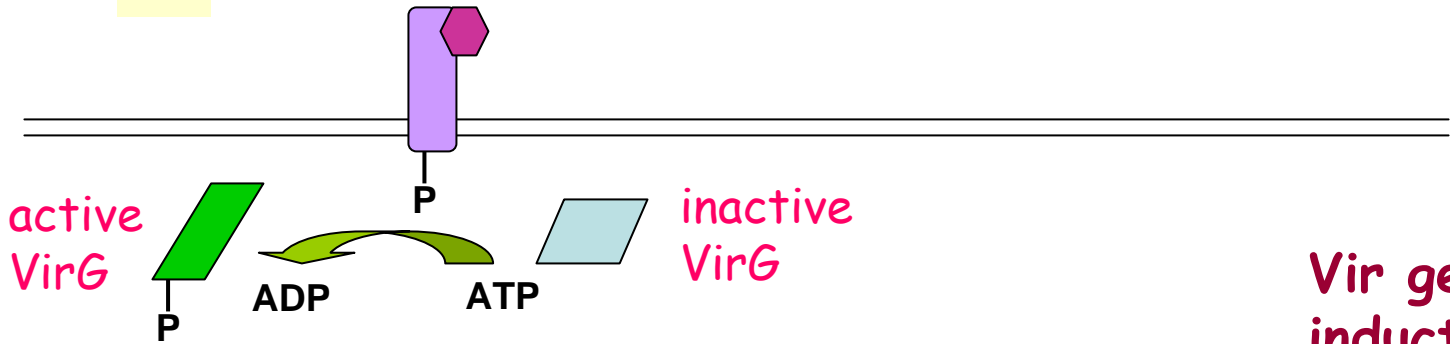
Transferencia del ADN-T desde el *Agrobacterium* a la célula vegetal



Vir gene
induction
process on
a wounded
plant

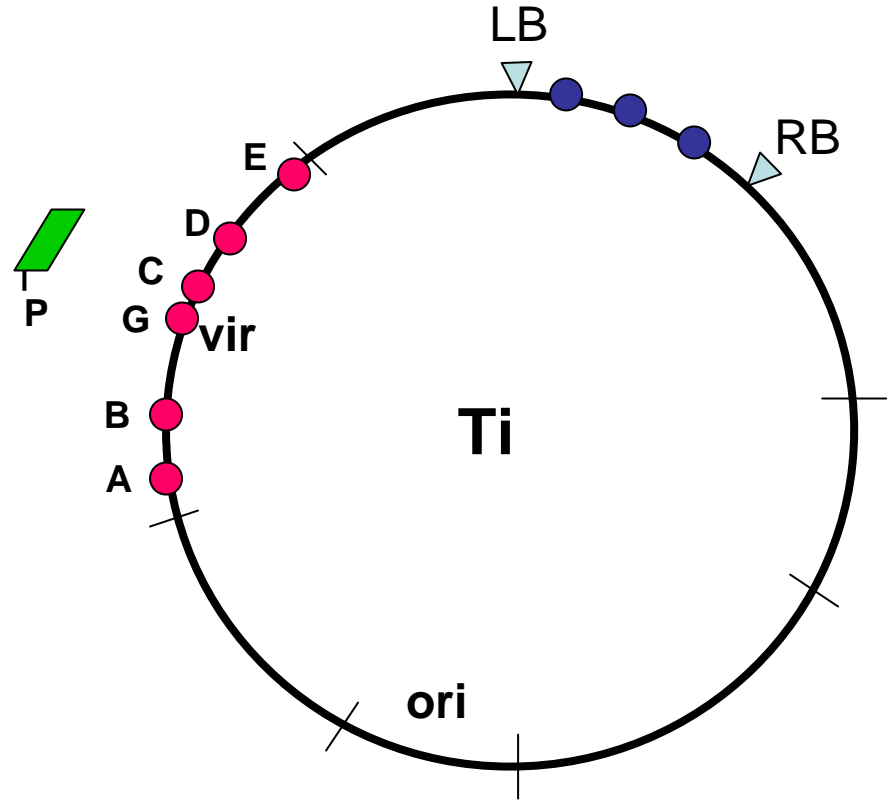


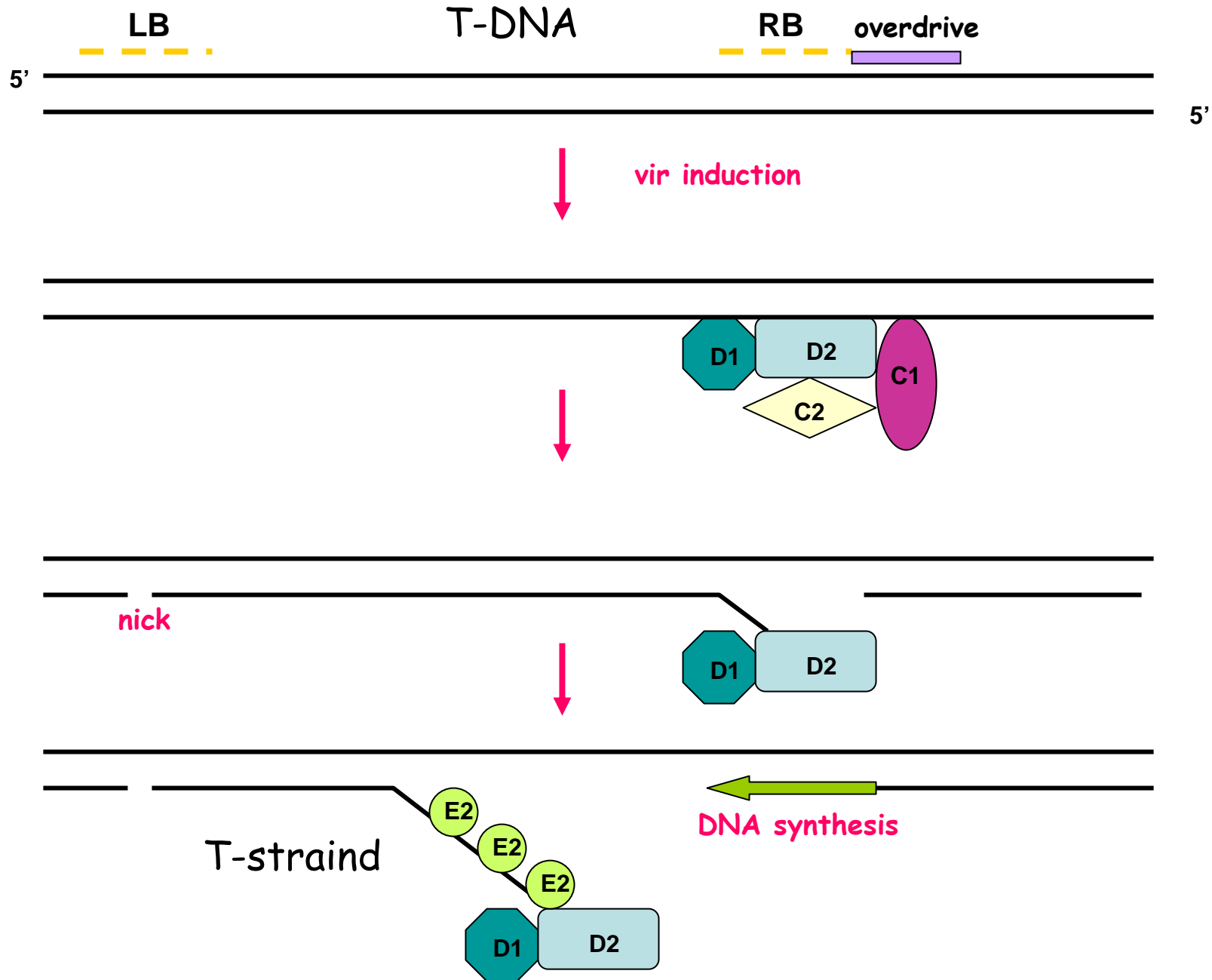
4.



Vir gene induction process on a wounded plant

5.





Agrobacterium y La Ingeniería Genética Vegetal

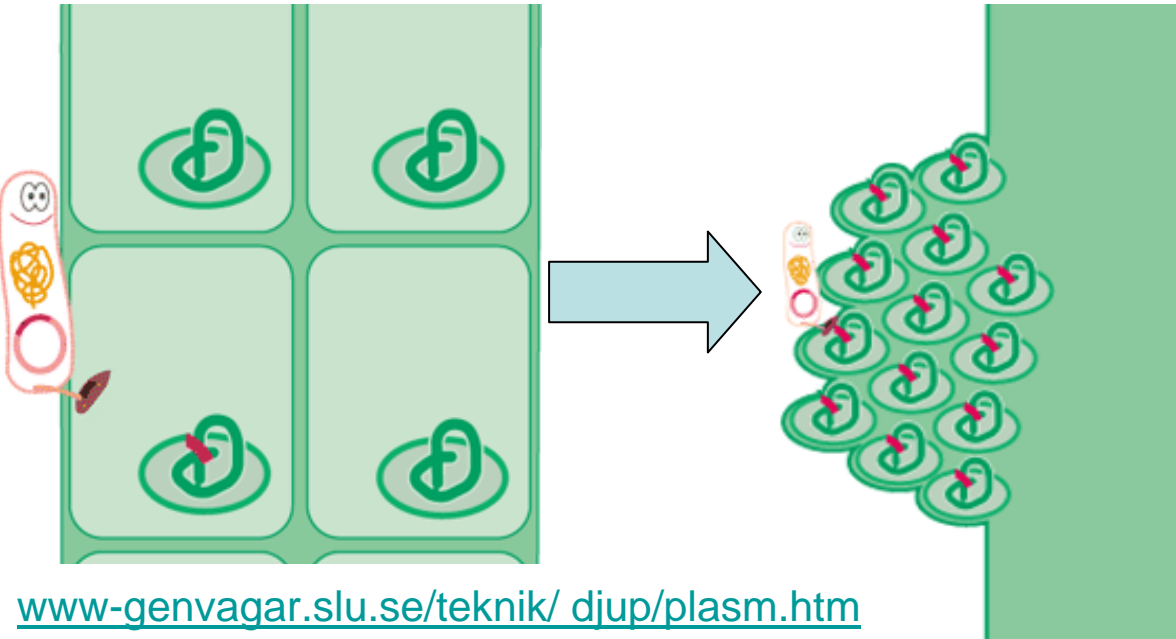
Aspectos Clave

El ADN-T es incorporado en forma **permanente** en el Genoma de la célula huésped.

Ninguno de los genes codificados en el ADN-T son Necesarios Para este fin- sólo los **bordes** del ADN-T y de las funciones **vir** functions son requeridas

Biología de *A. tumefaciens*

Produce los callos

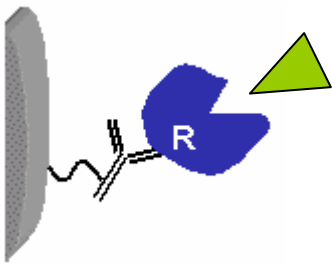


A. tumefaciens vive alrededor de la superficie de la (en la rizosfera) donde obtiene los Nutrientes a partir de los tejidos de la raíz.

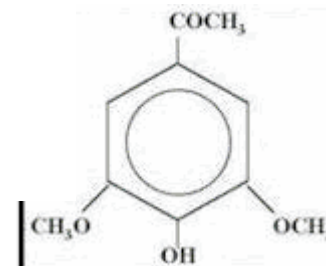
infecta sólo a través de heridas actuando a las células Quimiotácticamente.

www-genvagar.slu.se/teknik/djup/plasm.htm

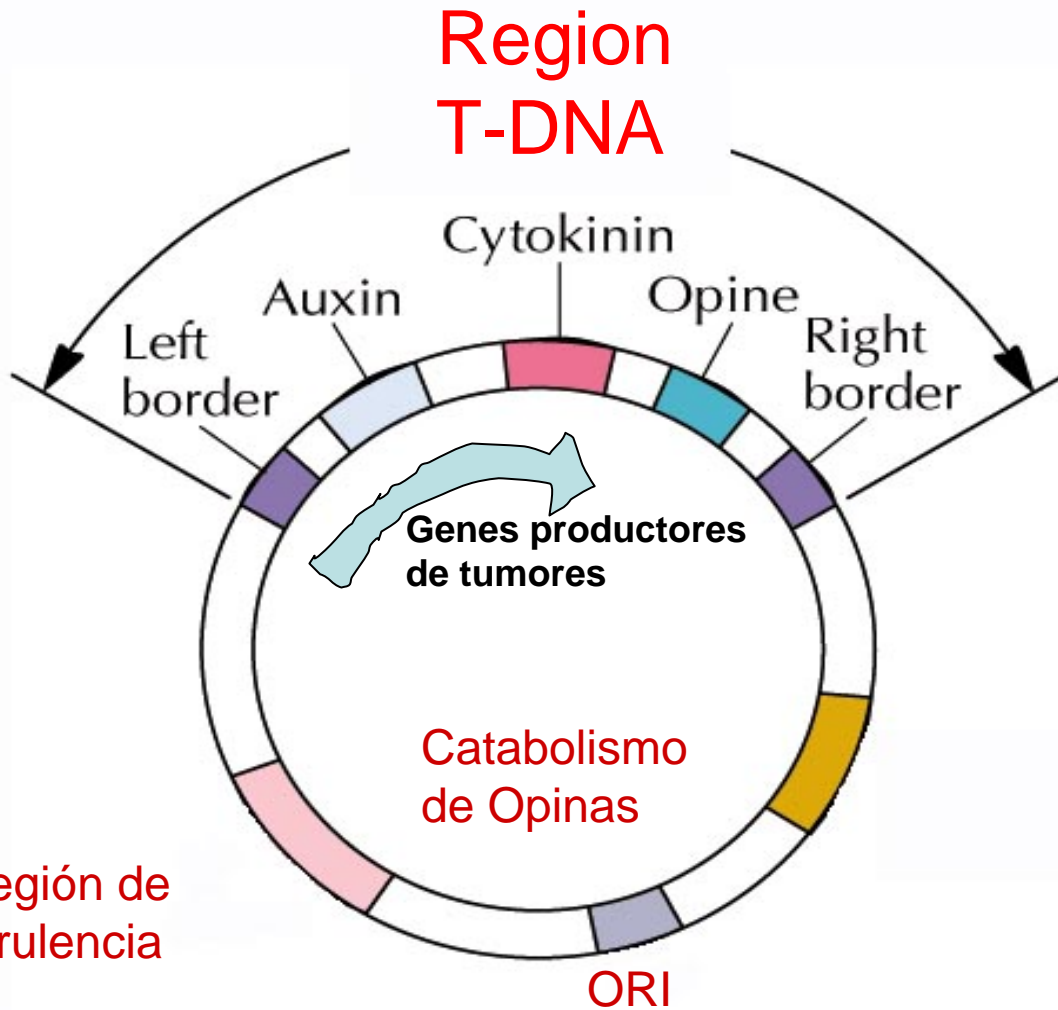
El plásmido Ti produce receptores para acetosyringona



Las heridas de la Planta Producen acetosyringona



Plásmido Ti

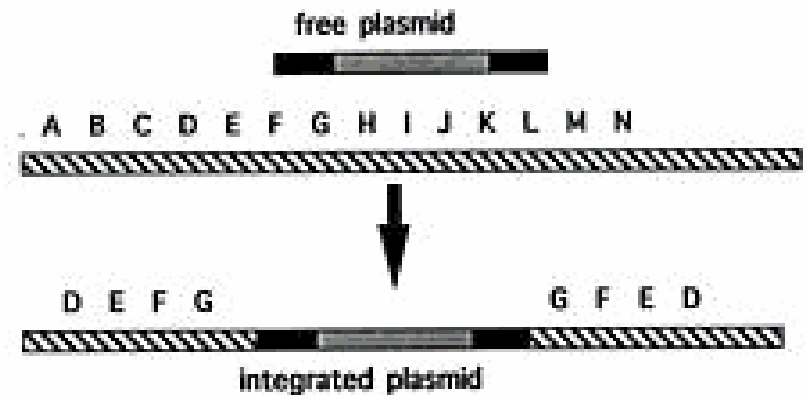
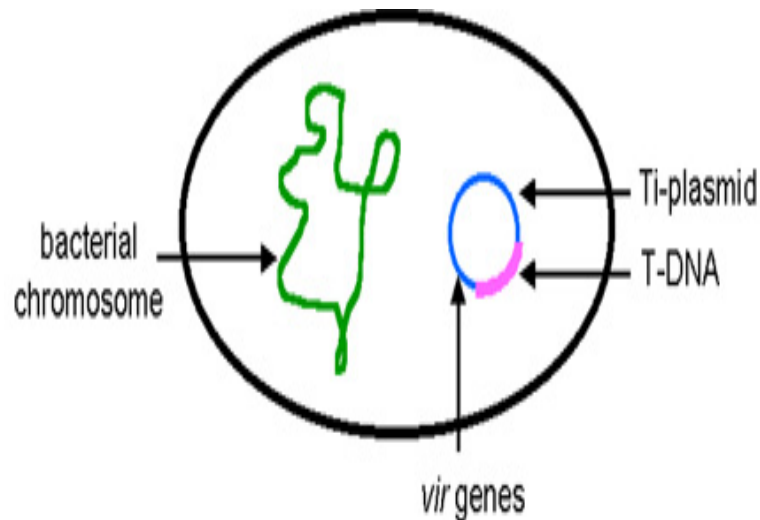


El ADN entre los bordes L y R es transferido a la planta como ssDNA.

Los genes codificados en el ADN-T pueden ser sustituidos por genes de interés.

Las bases de la Ingeniería Genética mediada por *Agrobacterium*

- ADN-T de *A. tumefaciens* es escindido e integrado al genoma de la planta como parte del proceso de infección.
- Cualquier ADN foráneo puede insertarse en el T-DNA y podrá ser integrado al genoma vegetal



Vectores basados en Plasmido-Ti

Sistemas Binarios

Requiere 2 vectores:

Plasmid- Ti Desarmado
Porta gen de interés
(sin genes vir)

Vector Helper
Para la infección
(porta genes vir)

Vectores Co-integrados

Requiere 3 vectores

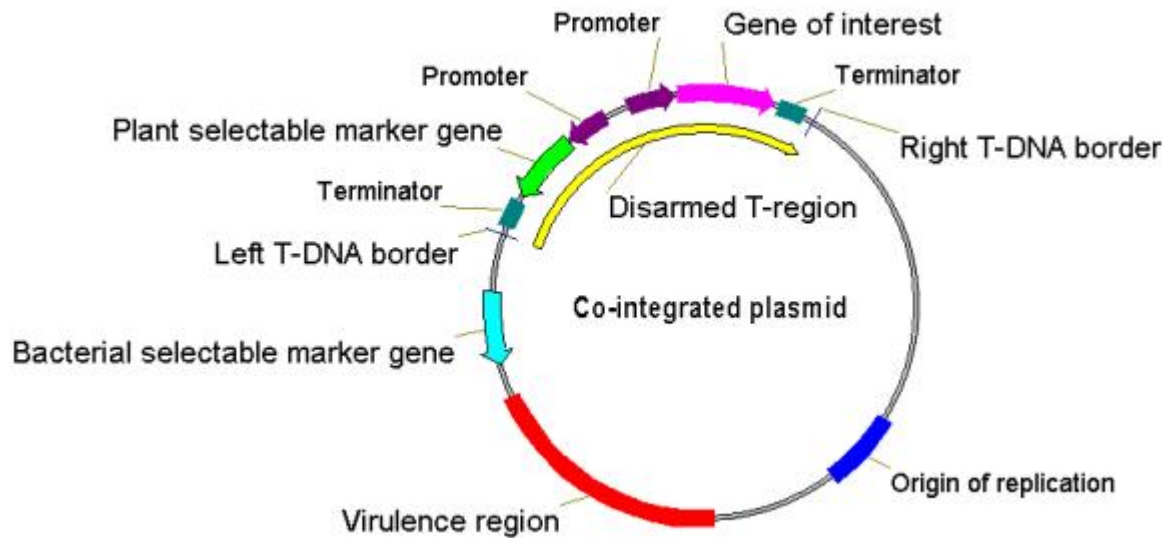
Forman
Un plásmido co-integrado
Luego de la
recombinación
homóloga sobre
el ADN-T

Plásmido Ti Desarmado
Capaz de infectar

Vector Intermedio
Con la región-T y gen de inter
(transferido por conjugación)

Vector Helper para transferir el
plásmido intermedio hacia into A.tum

Vectores Co-integrados (Plásmidos ti-híbridos)



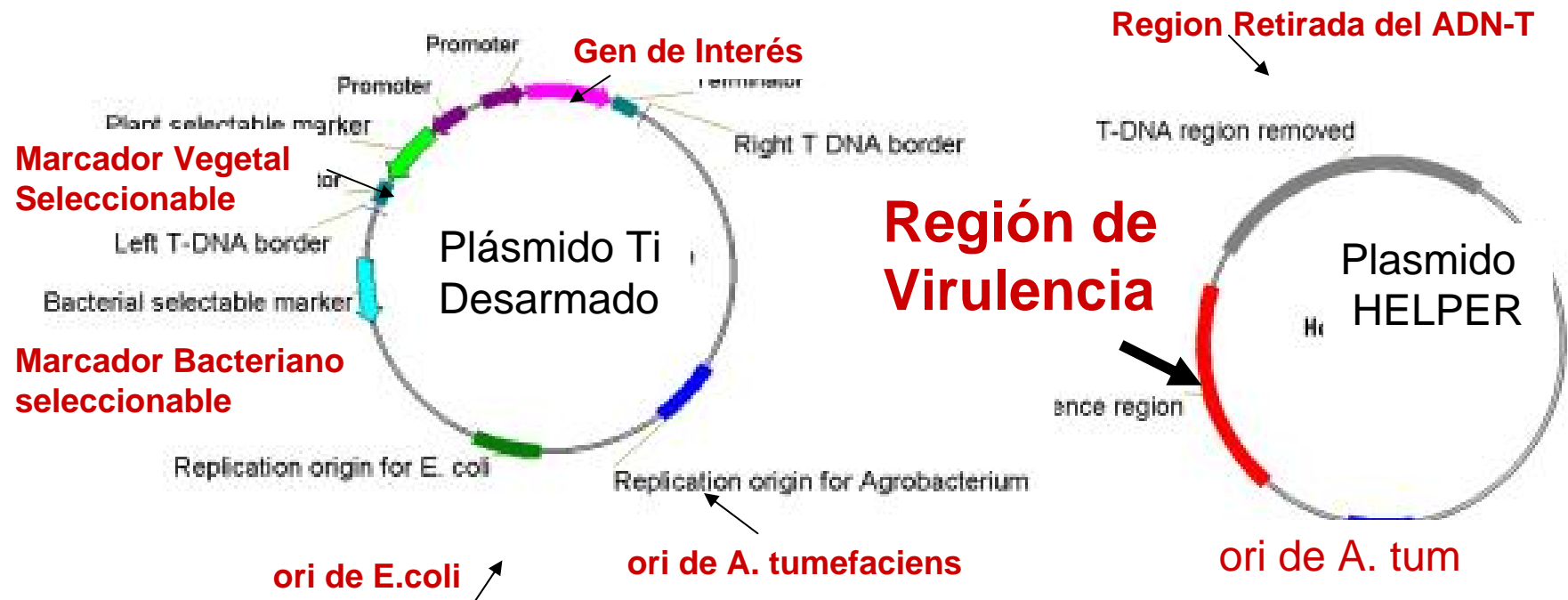
Poco usados
actualmente

DESVENTAJAS:

1) Requiere extensas regiones de homología entre el plásmido Ti
Y los plásmidos de *E. coli* (**vectores Intermedios** basados en pBR322)
Haciéndolos difíciles de construir y usar

2) Transferencia génica relativamente ineficiente comparado
Con los vectores binarios

Los sistemas de vectores de Plásmidos-Ti Funcionan como vectores binarios



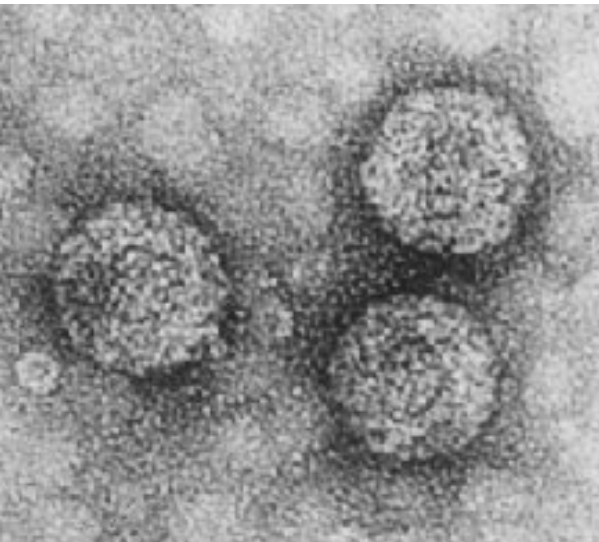
DESVANTAJA: Dependiendo de la orientación, los plasmidos con dos ori diferentes pueden ser inestables en *E. coli*

VENTAJA: se emplean vectores pequeños, lo que incrementa la eficiencia de transferencia desde *E. coli* hacia *Agrobacterium*.

No se requiere recombinación intermolecular.

Promotor de expresión empleado en plantas transgénicas

Promotor 35S, del Virus del Mosaico del Coliflor.



**El CaMoV (Virus del Mosaico del Coliflor)
Tiene un genoma de ADN circular.**

**CaMoV 35S es un promotor fuerte muy activo
en todos los tejidos de las plantas
dicotiledóneas**

Procedimiento Para la Creación de una Planta Transgénica

1. Se transforma *A.tumefaciens* con ambos plásmidos
2. Se infectan con *A.tumefaciens* las células vegetales en cultivo
3. Los productos de los genes Vir copian los genes de interés ubicados en el ADN-T y lo transfiere al cromosoma de la planta



4. Las células vegetales transformadas se seleccionan Con kanamicina
5. Se confirma la presencia del transgen mediante PCR.
6. Una planta completa puede ser cultivada a partir de una única célula transformada

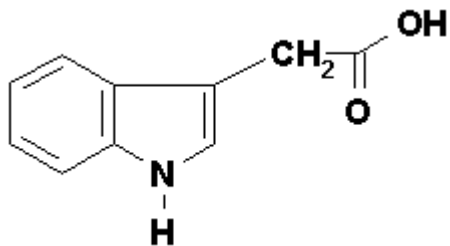
Se pueden producir Callos por manipulación externa de las concentraciones de hormonas vegetales

Hormonas Vegetales Principales

Auxinas

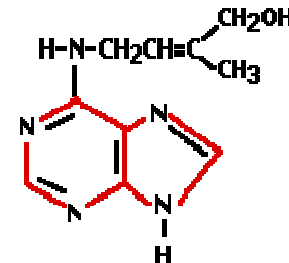
Citokininas

Auxina Natural es **indoleacetic acid (IAA)**



Meristema Apical es el sitio principal de la síntesis de Auxinas

Relacionado estructuralmente con la adenina



Zeatin

Producida por tejidos en activo crecimiento
Raíces, embriones y frutos

auxina < CITOKININA → brotes
AUXINA > citokinina → raices
auxina = citokinina → callo indiferenciado

Callos

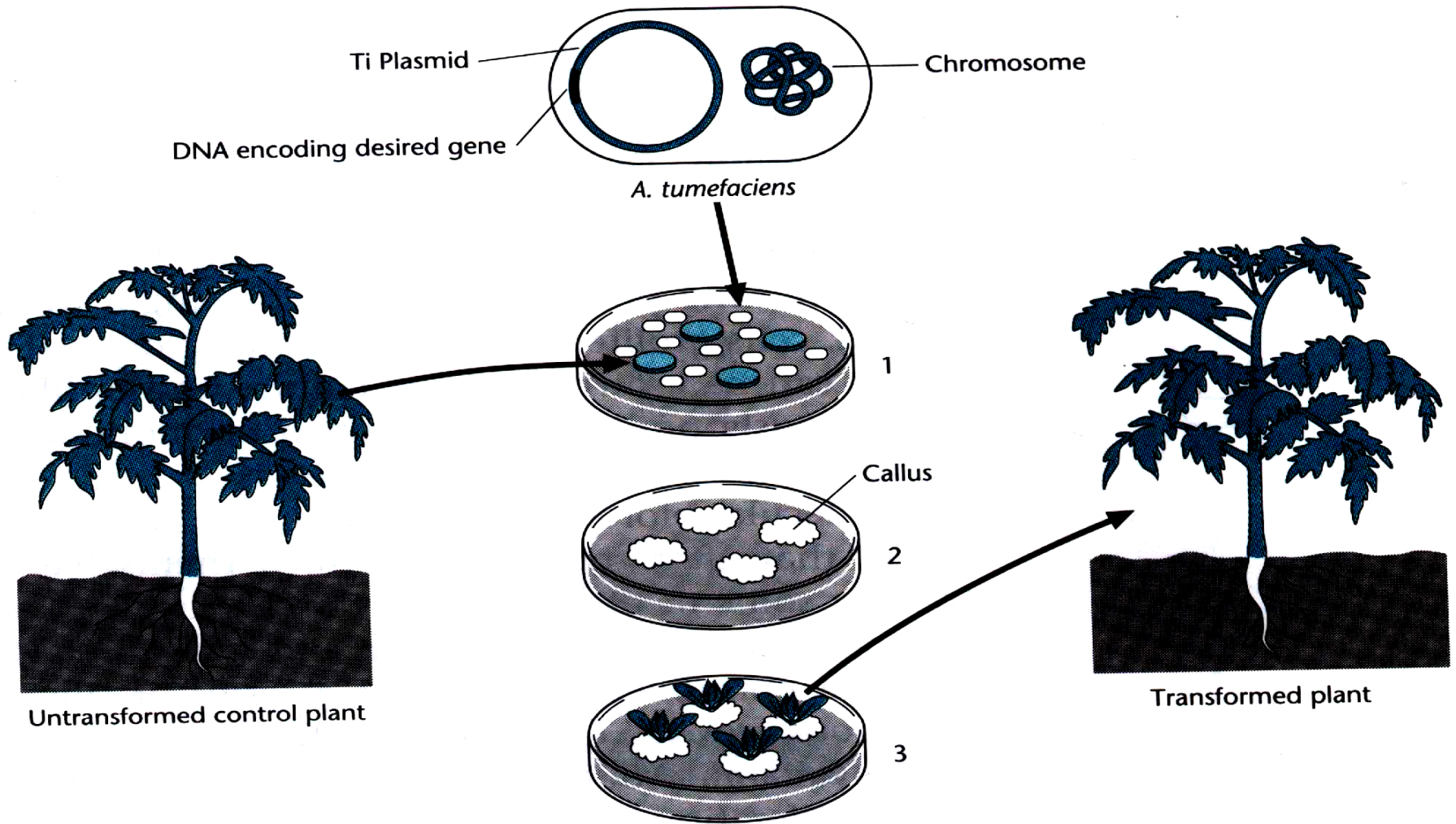
Tejido vegetal especializado
Que se forma sobre una herida
Se forma corcho (cambium)
Y las células producidas sellan
gradualmente la herida

Células del Callos

**Son muy fácilmente transformables
(debido que tienen las paredes
celulares muy finas)**

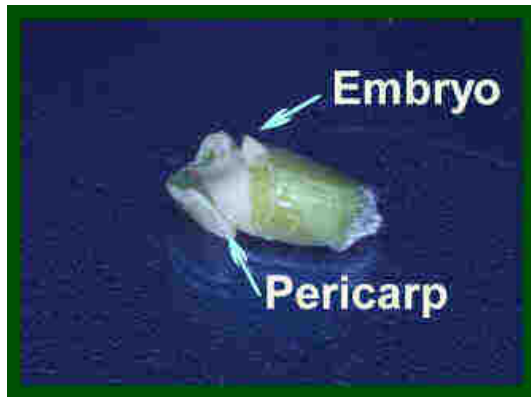
Protoplastos

**(sin pared celular) aún más fácilmente
transformables, Pero es muy difícil
de lograr el crecimiento a partir de ellos.**

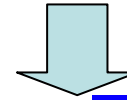


(b) Transformation in the Laboratory

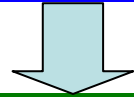
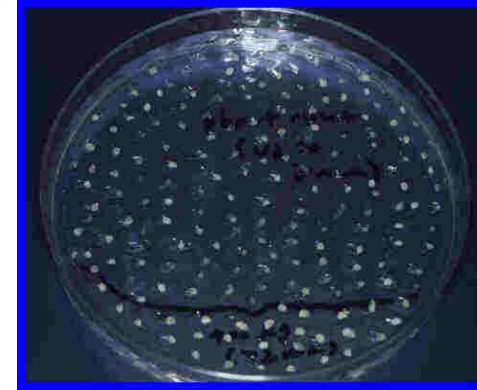
Las monocotiledonas son difíciles de manipular—
los callos son difíciles de iniciar su desarrollo, y
A.tumefaciens no es patógeno para las monocots



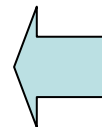
1. El Pericarpio debe ser retraído y se retira el embrión inmaduro (0.5 - 1.0 mm).



2. El embrión inmaduro es colocado en el medio inductor de callos

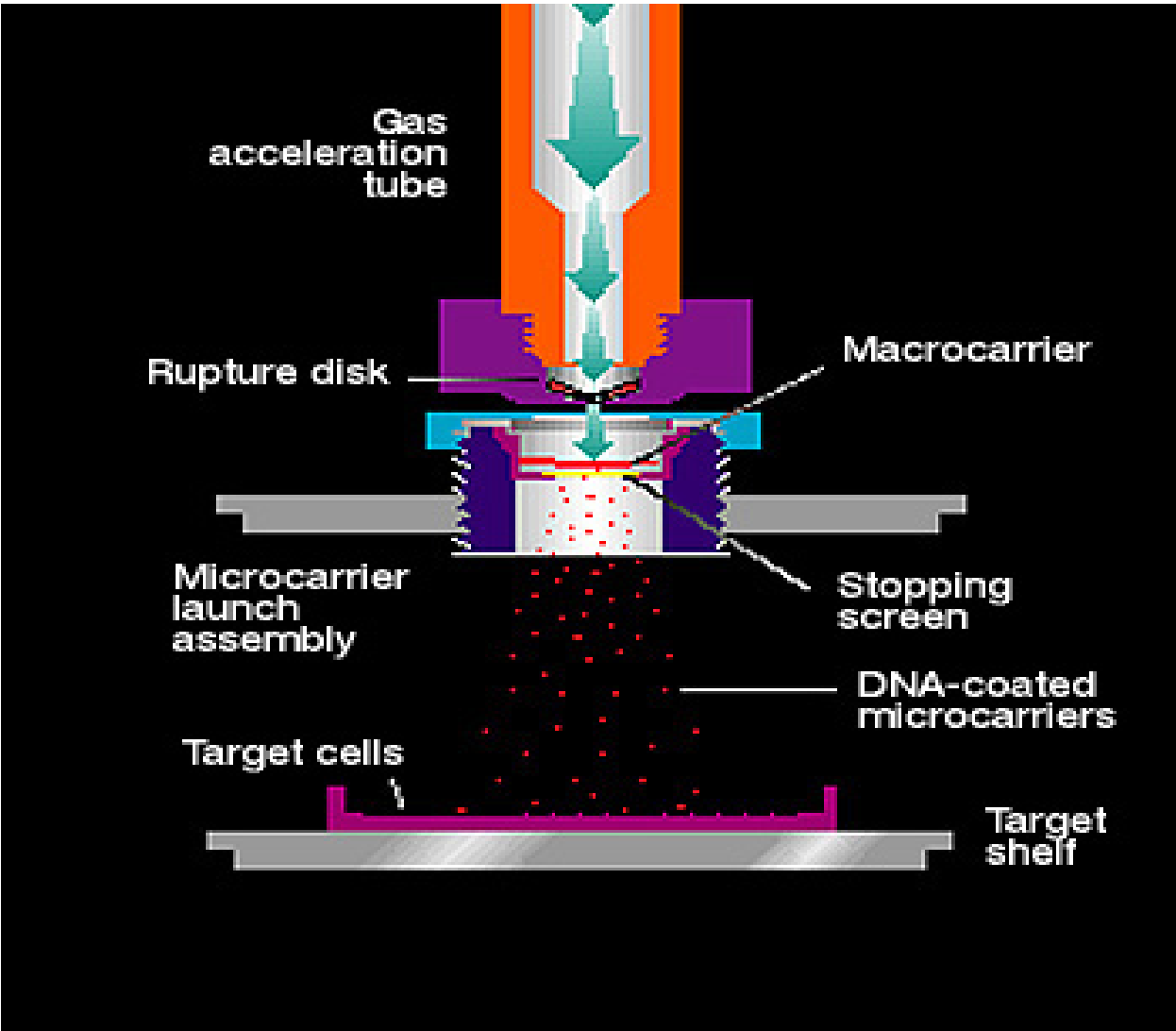


La Transformación se realiza mediante por el método de **la pistola biolística**



Un medio con alta endósmosis prepara los callos para la transformación

plantsciences.montana.edu/.../transform1.htm



Bombardeo con partículas Pistola Biolística



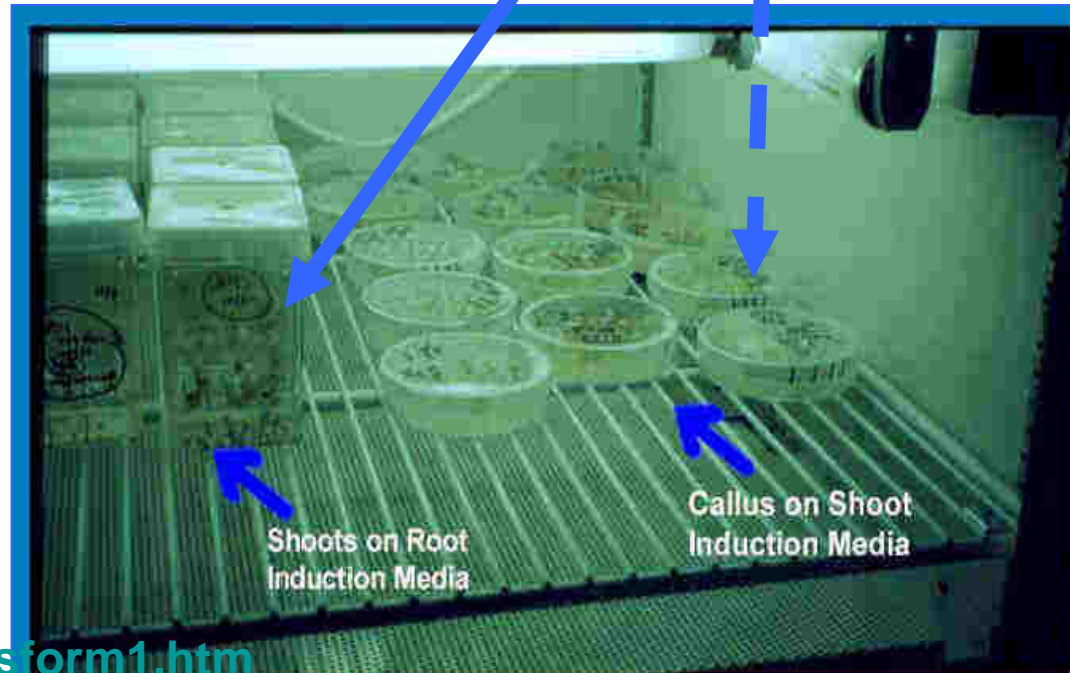
El promotor de Ubiquitina es específico para monocotiledóneas y regula al gen reporte bacteriano denominado *gusA*, en arroz transgénico..

Una vez disparados los callos se colocan en un medio selectivo conteniendo herbicidas durante tres semanas.



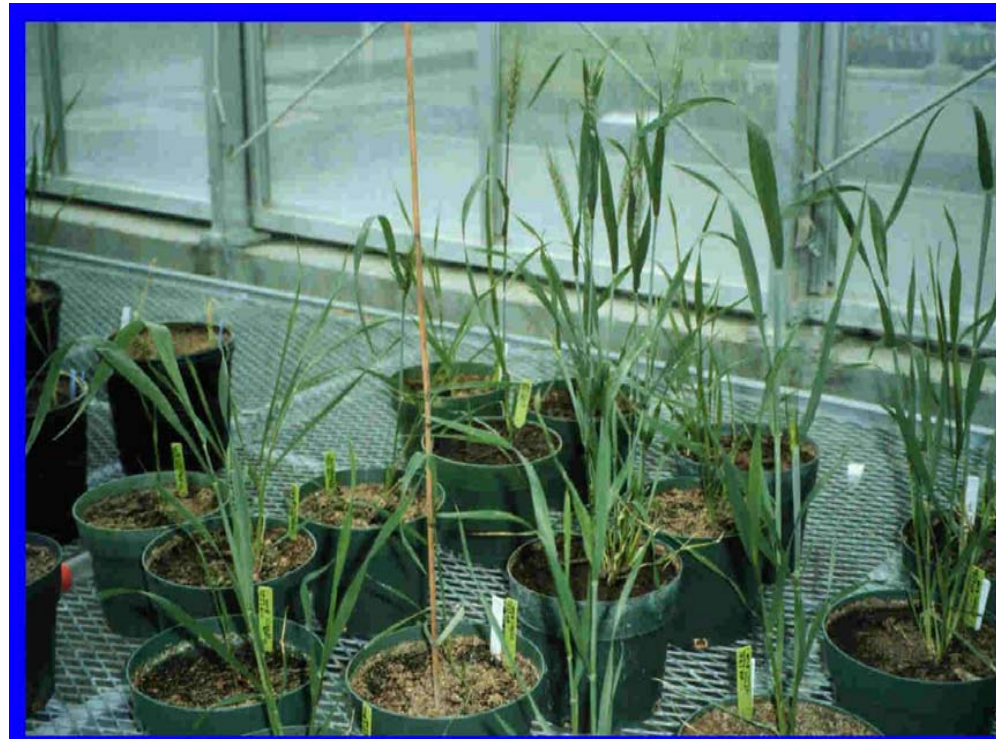
Luego los callos se transfieren a un medio que induce la brotación.

Una vez brotados son transferidos a recipientes oscuros con un medio inductor de raíces..

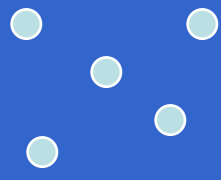


Las plántulas se transplantan a tierra y acumuladas bajo condiciones de muy alta humedad

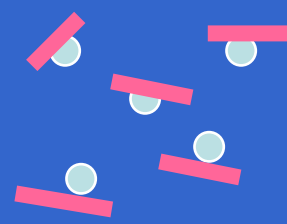
Con los procedimientos habituales sólo 10-20% de las plantas son transgénicas, por lo que es necesario probarlas para la expresión de los transgenes.



Método de la "Pistola de Genes" ("Gene gun")



pellets

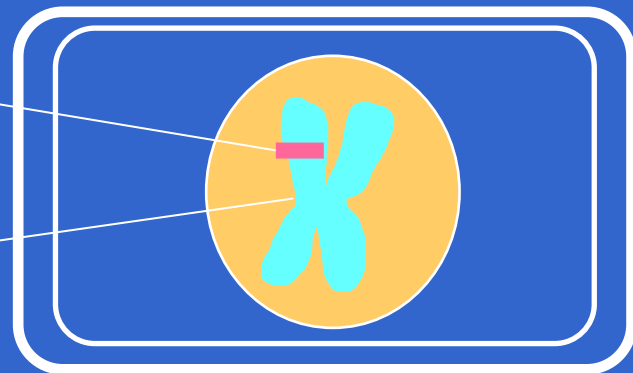


DNA



Célula vegetal transformada

Gen insertado



Cromosoma de la planta

Creación de un Constructo Génico



Promotor

Secuencia Bt
codificante

Secuencia de
Terminación

- **Promotor** inicia la transcripción; afecta cuando, donde y cuanto producto génico es sintetizado.
- **Secuencia de terminación** marca el fin del gen.

Construcción con el Gen Bt

Gen de resistencia a
antibiótico o a
herbicida

Gen Bt



 Promotor

 Secuencia de
Terminación

Promotores Transgénicos

- El más usado es el promotor CaMV 35S (cauliflower mosaic virus). Es un promotor constitutivo (siempre encendido en todo momento y en todos los tejidos), brinda altos niveles de expresión en plantas.
- Actualmente se están desarrollando promotores más específicos: específicos de tejidos, tiempo y condiciones ambientales (inducibles).

Secuencia de Terminación

- La más comunmente usada es la correspondiente al terminador de transcripción de nopalina synthasa (*nos*) de *Agrobacterium tumefaciens*.

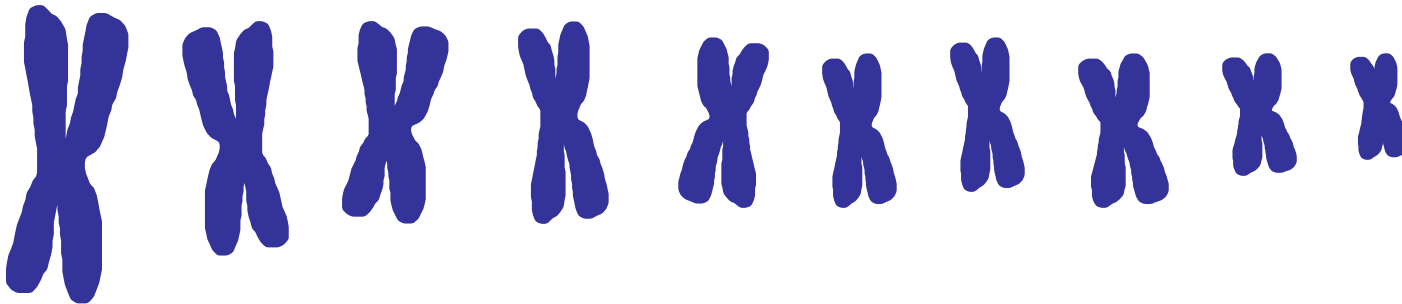
Agregado de Marcadores Detectables

- **Ya que la transferencia génica es un proceso ineficiente (éxito esperado de 1 a 5%), se requiere un sistema que nos permita identificar aquellas células que tengan los genes “nuevos”.**
- **Típicamente, genes de antibioticos o de resistencia a herbicidas se usan como marcadores..**

“Evento Transgénico”

Evento = Transformación exitosa

Los eventos difieren en los componentes genéticos específicos, y en el lugar de inserción del ADN foráneo en el cromosoma huésped.



El maíz contiene 10 cromosomas, cualquiera de los cuales puede incorporar el transgen.



The Cow Pock or the Wonderful Effects of the New Inoculation!
James Gillray (1757-1815) Photographic reproduction of an etching appearing
in Vide--The Publications of ye Anti-Vaccine Society, June 12, 1802, National

Generalidades Vegetales

Parte# 1



Particularidades Genéticas

Parte# 2



Modificación Genética

Parte# 3



OGM

Identificar o crear
variabilidad genética

Selección de
recombinantes deseable

Estabilizar y multiplicar
materialal de plantado y liberar
al medio

Particularidades Genéticas

➤ Genética Cuantitativa

- ✓ Variación Continua

- ✓ QTL

Riesgo/Beneficio del Maíz-Bt

- Investigaciones demostraron que los granos de Maíz-Bt eran menos contaminados por fusarium y fumonisin que el maíz convencional.
 - Studies found a 90-93% reduction in fumonisin in Bt ears
- Trabajos en PNAS demuestran que la mariposa monarca no está en peligro.
- No se hallaron anticuerpos específicos Cry9C en ninguno de los que pretendían haber tenido respuesta alérgica.



Alimentación de insectos es una de las vías principales por el cual los hongos infectan a los granos

Beneficios de la Plantas Tolerantes a Glifosato

Puede emplearse en cualquier momento

Esperar hasta que sea necesario

Reduce el empleo de herbicidas

Muy efectivo

- Pastos muy sensibles
- Cultivos GM muy resistentes

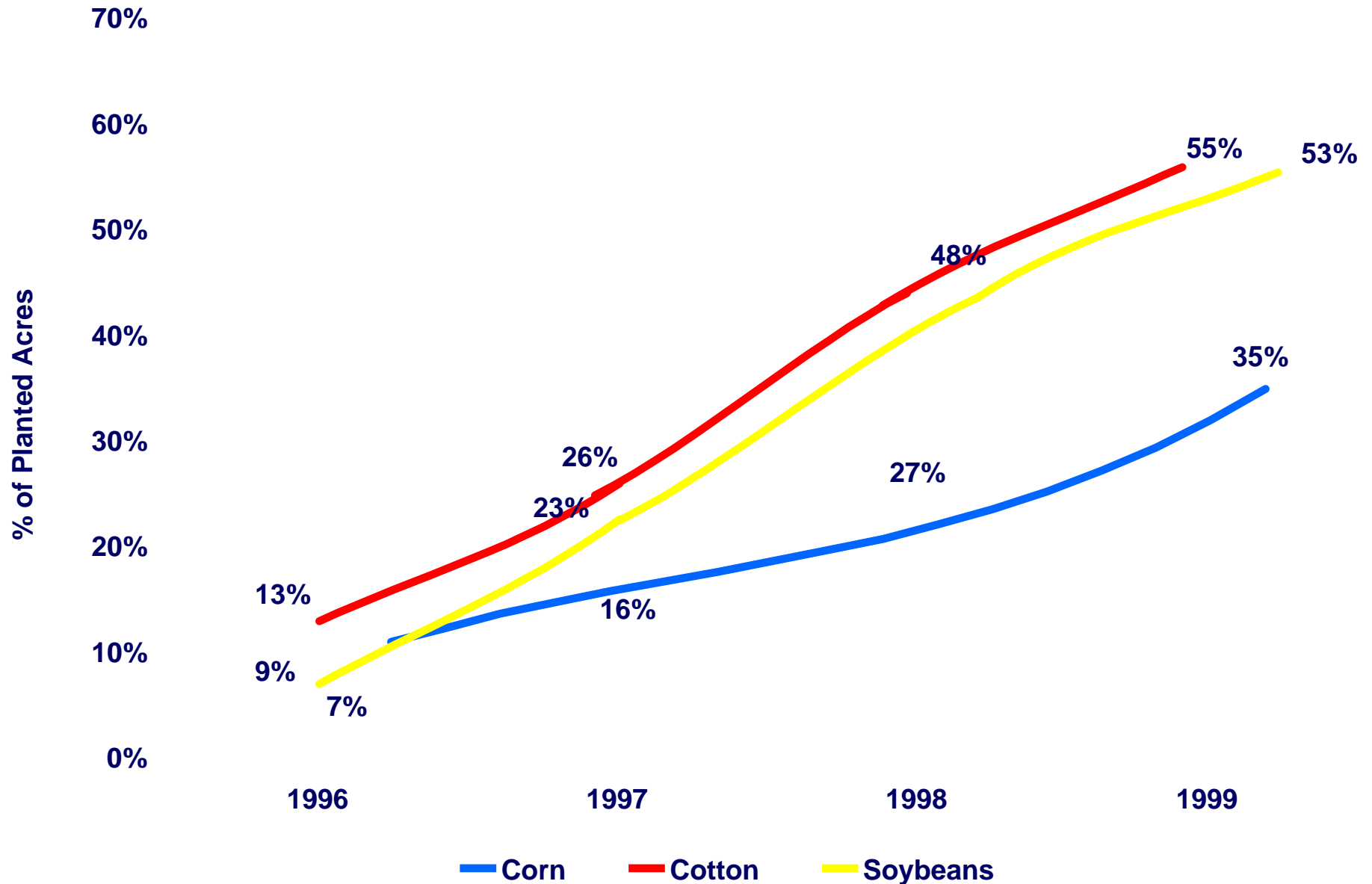
Canola GM rodeada por pastos



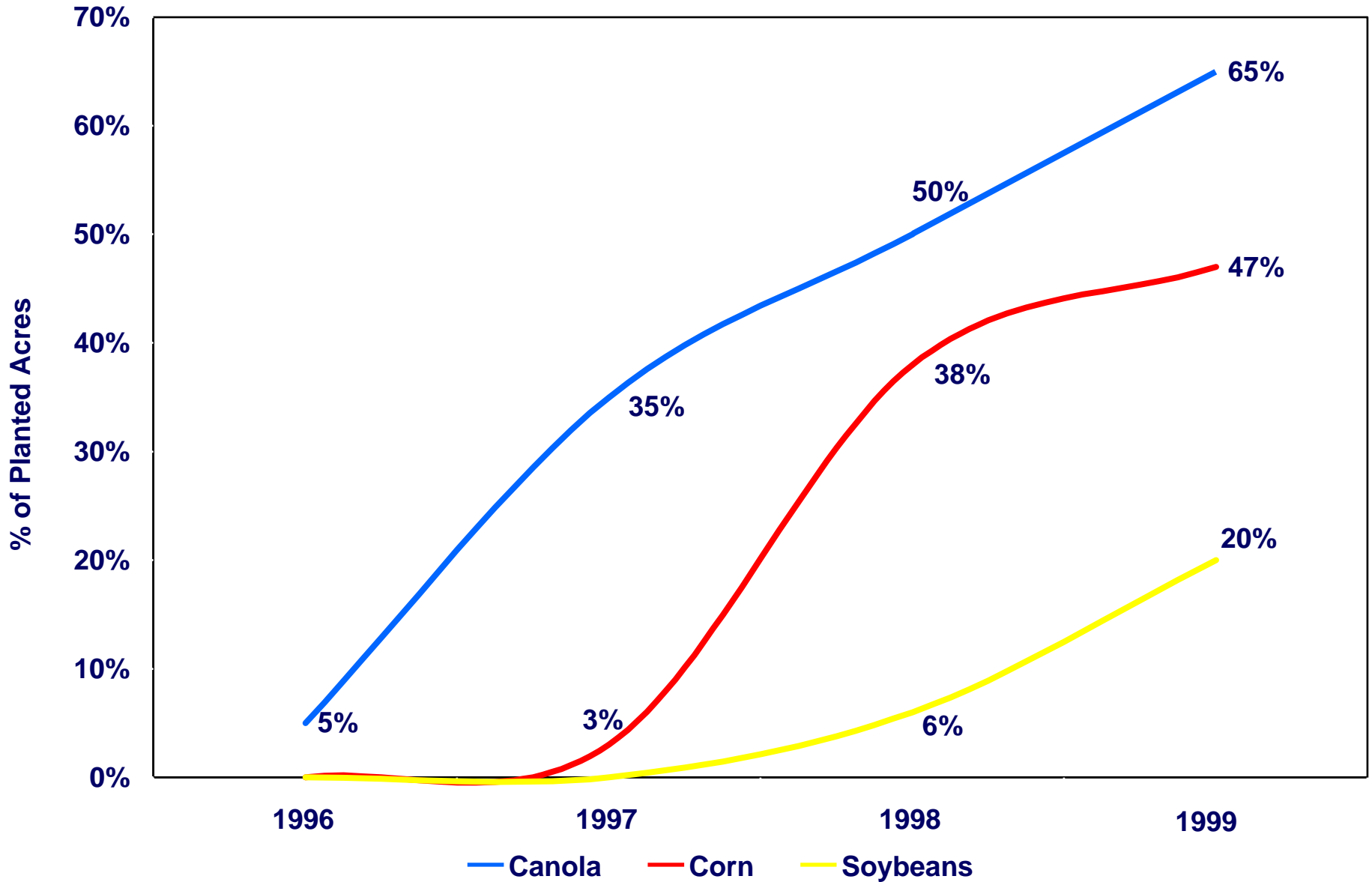
- glifosato

+ glifosato

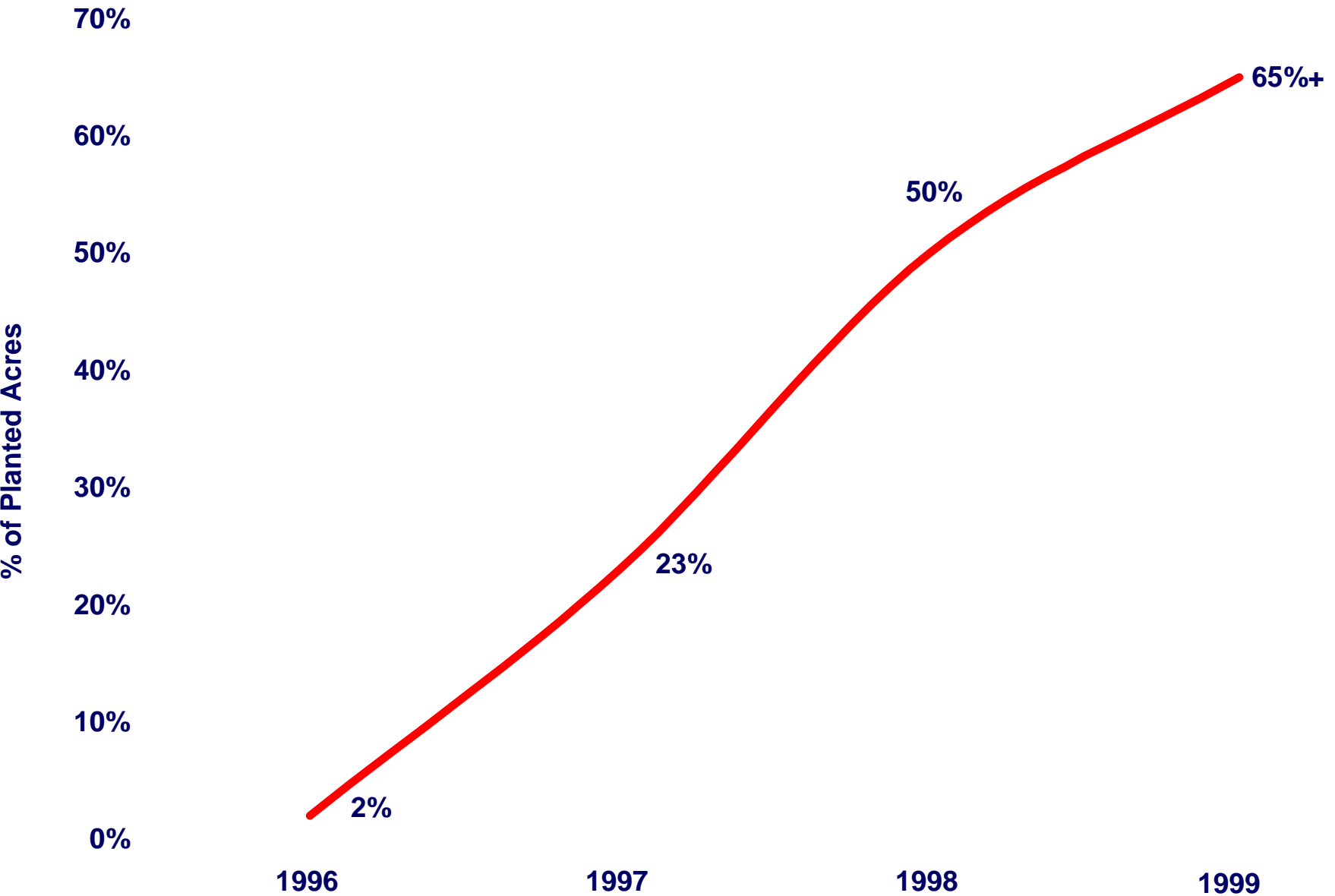
United States: Tasa de Adopción



Canada: Tasa de Adopción



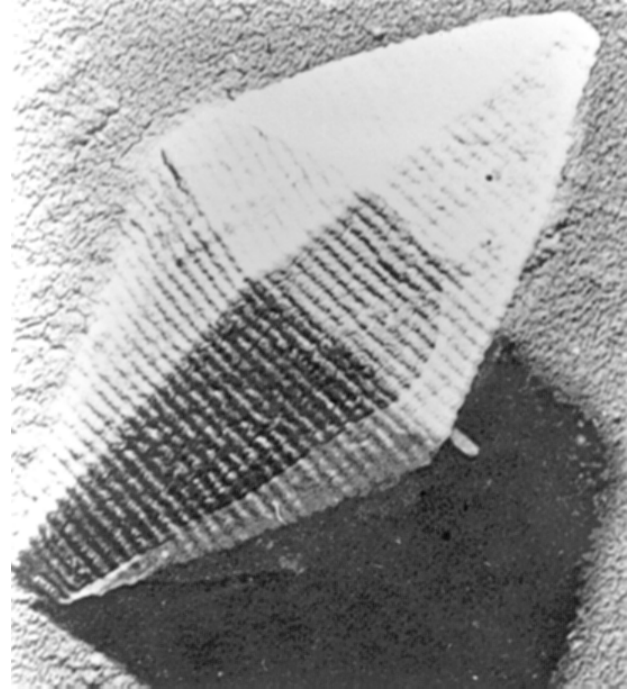
Argentina: Soja Roundup Ready



Toxinas de *Bacillus turingiensis* (Bt)

Toxinas forman cristales proteicos

Toxinas codificadas por el gen
Cry



Actividad de la Toxina;

- La protoxina es clivada en el intestino medio por proteasas + pH alcalino
- La protoxina se une a un sitio específico de la pared del intestino medio
- se producen ulceraciones/ disminuye el apetito
- se rompen las pared del intestino, la larva del insecto muere

Cultivos Bt

Cultivos (algodón, maíz, papa, etc.) han sido transformadas con diferentes genes *Cry* que producen toxinas activas para cada una de las pestes de cada cultivo.

- Hasta el momento han sido usados más de 40 genes *Cry*

Los genes han conferido resistencias muy efectivas

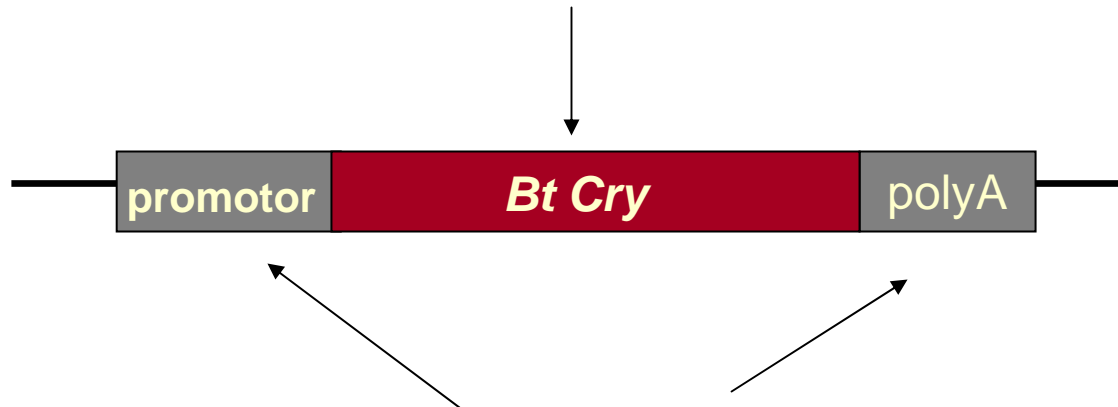
El uso de insecticidas bajó drásticamente con los cultivos Bt

- Se incrementó la diversidad de las poblaciones de insectos
- La producción se ha incrementado



Transgenes Bt Introducidos en Plantas

Se modificaron las secuencias de codones para optimizar la Expresión en plantas y para eliminar sitios críticos de splicing



Secuencias Reguladoras son reconocidos por la planta (tanto genes de la planta y de sus virus).

Habitualmente se usa el promotor 35S CaMV

Incrementando la Expresión de Transgenes Bt??

Los transgénicos convencionales se insertan en el núcleo

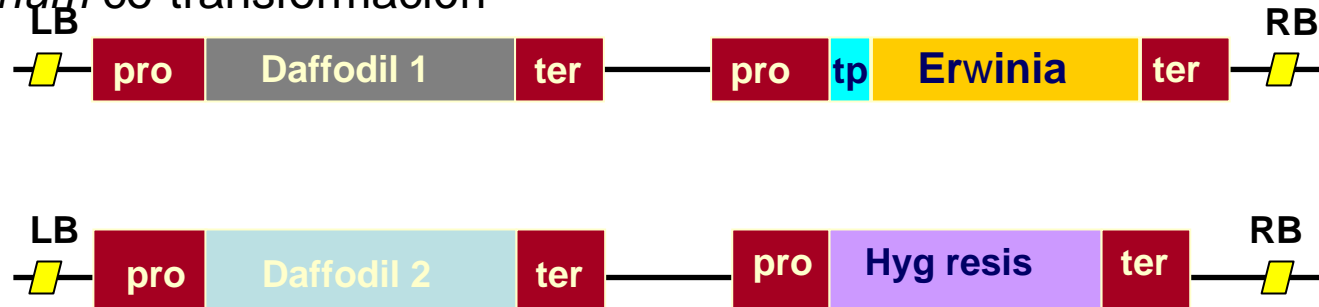
Se desarrollaron protocolos para insertar transgenes en el genoma de cloroplastos

- Expersión incrementada debido a la multiplicidad de plástidos por célula y múltiples copias por plástidos
- Se previene de genes extraños ya que el polen carece de plástidos
- no hay necesidad de modificar los genes bacterianos ya que la maquinaria de transcripcional y traduccional es procariótica
- Pueden expresarse operones bacterianos completos con multiples genes de una vez.

'Engineering provitamin A (β -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm'.

Ye et al., Science 287,303-305 (2000).

2 AND-T codificantes de 3 genes para la pro-vitamina A (además de genes marcadores seleccionables) se introdujeron en forma conjunta mediante *Agrobacterium* co-transformación



Daffodil 1 = fitoeno synthasa
Daffodil 2 = licopeno β -cyclasa

Con un peptide de transito propio y con un promotor de arroz específico de endosperma glutelin (GT1)

Erwinia = Erwinia desaturasa doble – *con un peptide de transito agregado expresado mediante un promotor 35SCaMV*

Los granos resultantes del arroz transgénico presentan un color amarillo dorado

- La mejor línea contenía 85% de sus carotenoides como β -caroteno

- “La biotecnología responsable no es un enemigo; el Hambre lo es. Sin suministros adecuados de alimentos a precios alcanzables, no podemos esperar que exista salud ni paz en el mundo.”

- **Presidente Jimmy Carter**

Febrero de 1999

Fin