

Plantas transgénicas

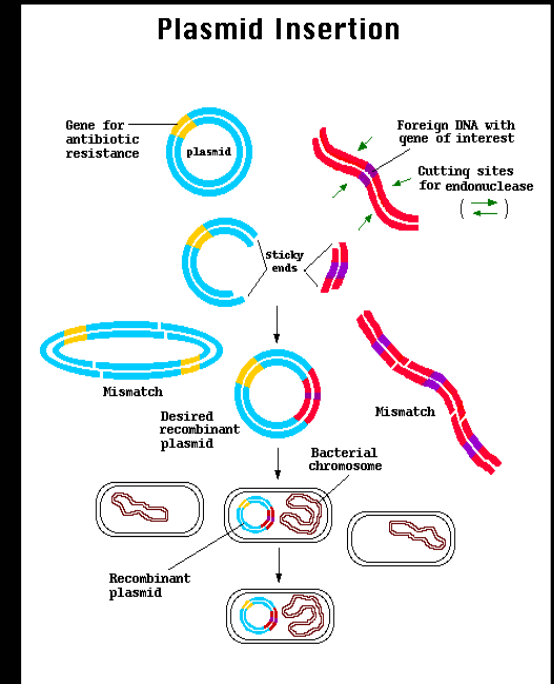
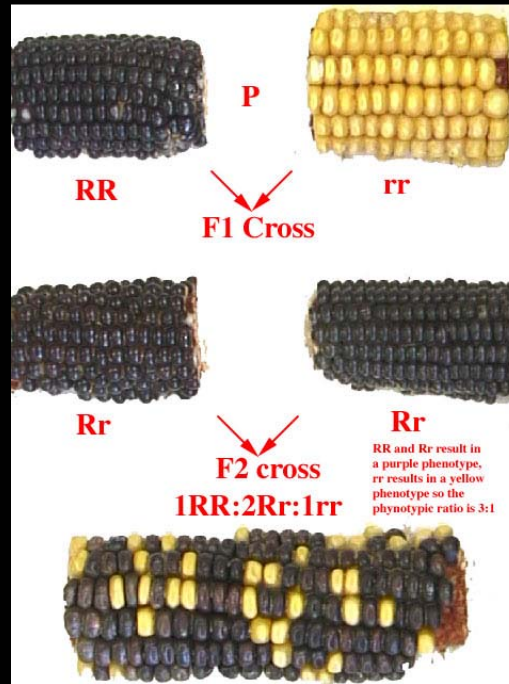
Mauricio González Agüero

Laboratorio de Bioinformática y Expresión Génica

INTA – Universidad de Chile

(maugonza@inta.cl)

Comparación entre hibridización clásica y la transgénesis



Puntos de comparación	Hibridización 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 a 20 años o más	3 - 4 años

Logros de la hibridización clásica



Teosinte

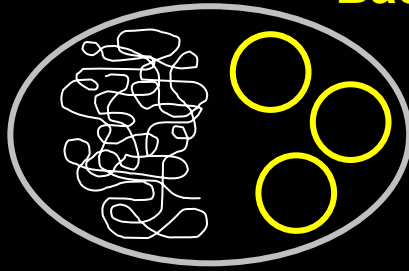
Cob

Maíz



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

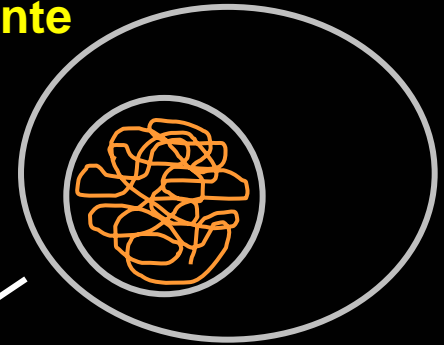
Bacteria



DNA
plasmidial



Célula donante



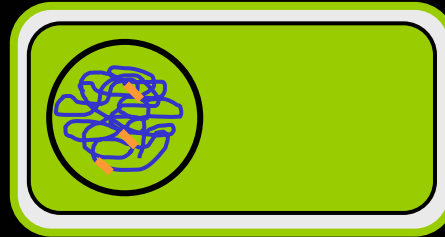
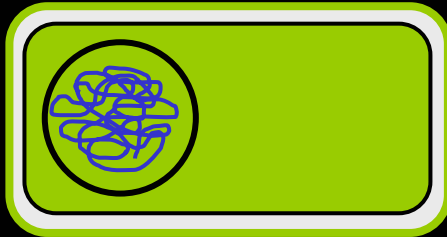
Gen de
interés



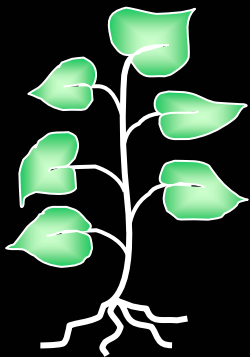
Plásmido portando
el gen de interés



Célula vegetal



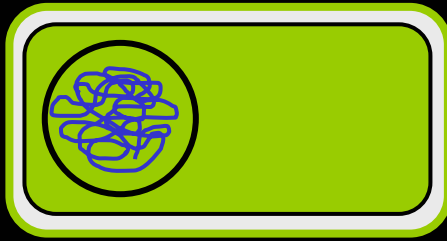
**Célula vegetal
transformada**



Planta transgénica

Organismo genéticamente modificado (GMO):
es un organismo al que se le ha introducido
uno o más genes utilizando técnicas de
ingeniería genética o del DNA recombinante

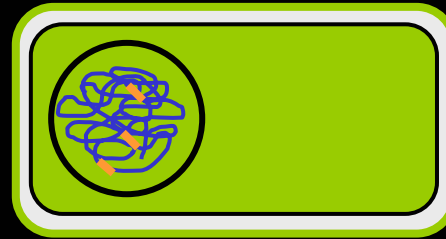




Célula vegetal



Plásmido portando
el gen de interés



Célula vegetal
transformada

Métodos de transformación:
permite introducir el DNA
dentro de la célula

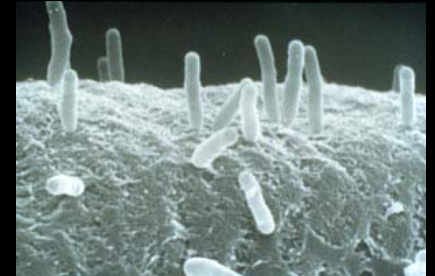
Directos:

- **Biobalística**
- Electroporación
- *Whiskers* de carburo de silicio
- Microinyección.



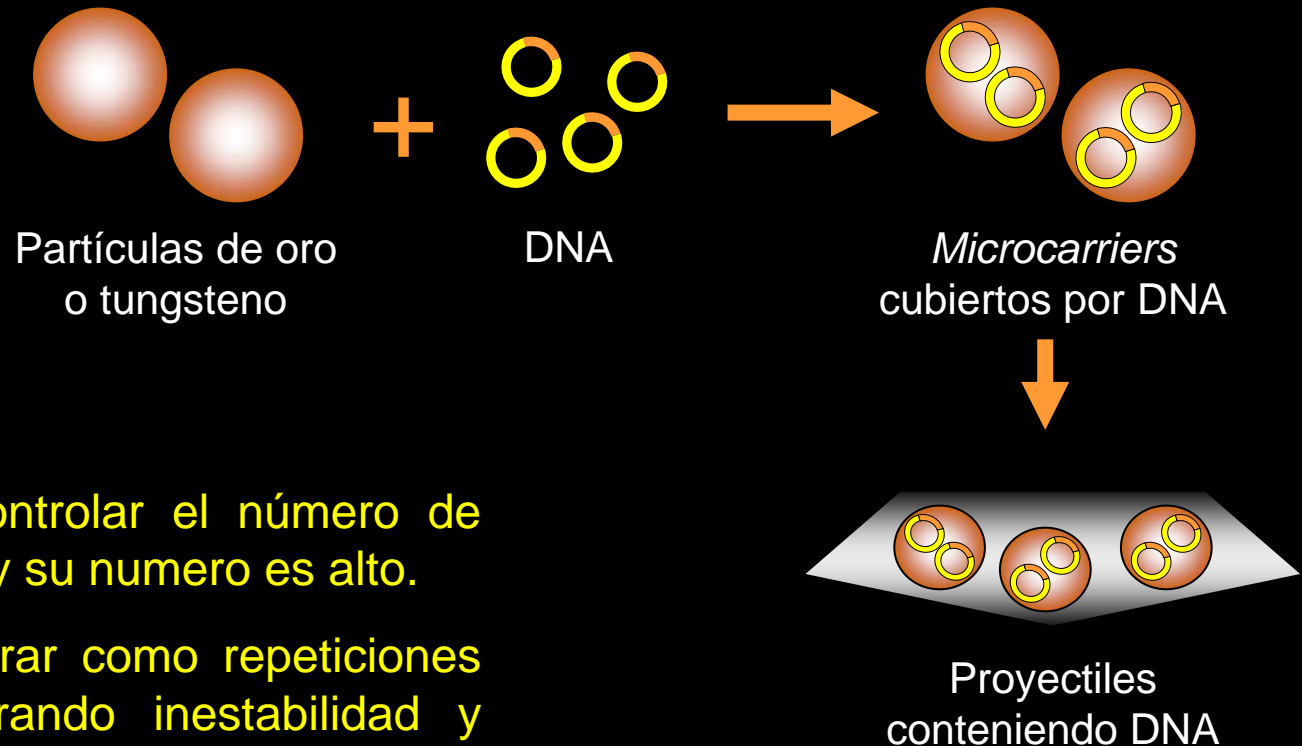
Indirectos:

- ***Agrobacterium tumefaciens***
- *Agrobacterium rhizogenes*
- Sistemas basados en virus vegetales.



Transformación directa: Biobalística

- Se busca penetrar las células vegetales con el DNA adherido a micro esferas (oro o tungsteno).
- Ampliamente usada en monocotiledoneas (maiz, arroz, trigo, **excepción: soya**); permite la introducción de múltiples genes e insertos grandes (> 20 kb)



Desventajas:

- No se puede controlar el número de copias integradas y su número es alto.
- Se pueden integrar como repeticiones en *tandem* generando inestabilidad y silenciamiento de genes.

Transformación directa: Biobalística

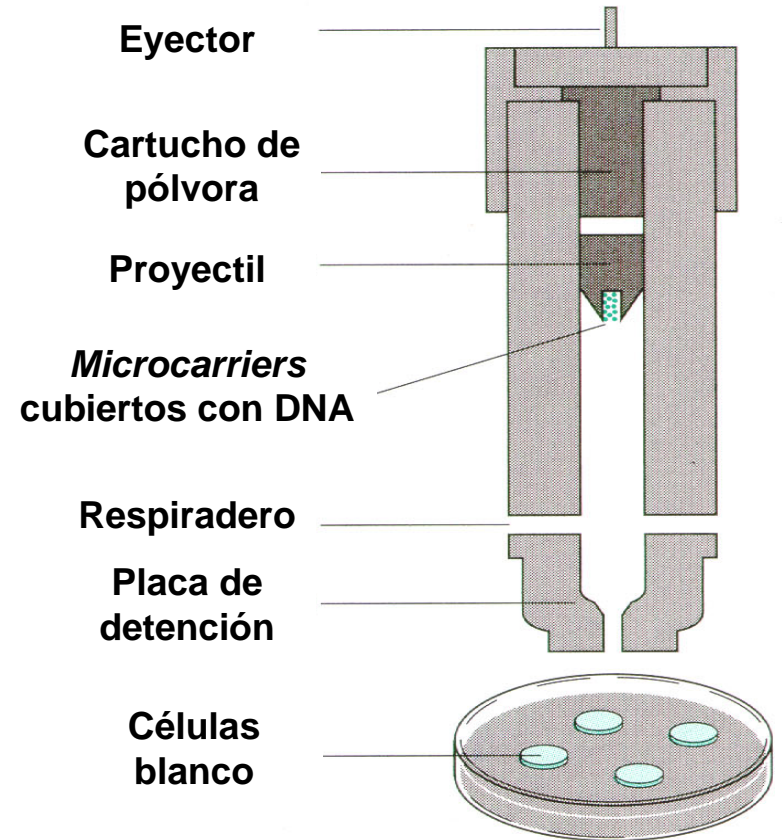


Figure 15.3

DNA Particle Gun. The DNA particle gun, developed by John C. Sanford of Cornell University, fires tungsten pellets coated with DNA into plant cells. The pellets are held by a plastic microprojectile, which is accelerated by a gunpowder charge. The plate stops the microprojectile; momentum sends the DNA-coated pellets into the target. The instrument shown is the Biolistic® system from Bio-Rad, but other instruments using variations of this basic principle have been developed.

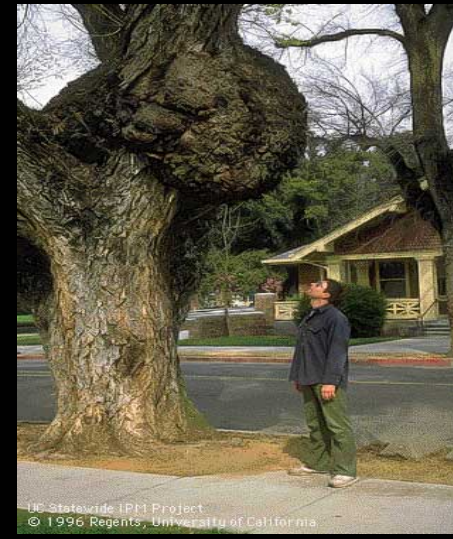
Transformación indirecta: *Agrobacterium tumefaciens*



- Es una bacteria Gram negativa.
- Infecta plantas dicotiledóneas (tomate, tabaco, soya, **excepción: arroz y maíz**), a través de heridas, e induce la formación de tumores.
- Las cepas virulentas contienen un plásmido, denominado Ti (Tumor-inducing).
- Su mecanismo de infección involucra la transferencia y la integración de la región T-DNA (Transfer-DNA) al genoma nuclear de la célula vegetal en un número reducido de copias.



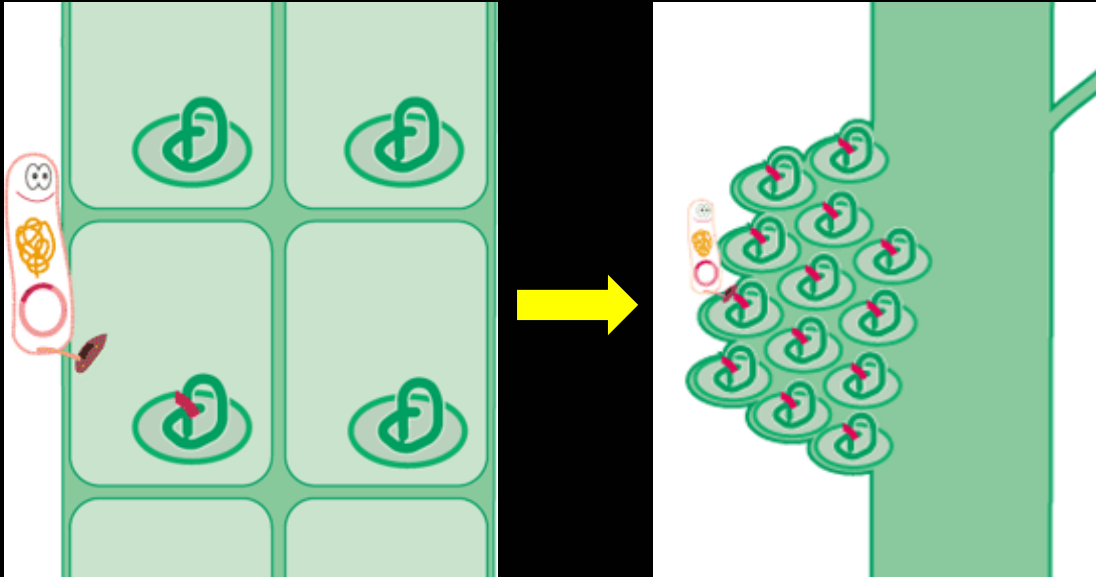
Tumor de tallo provocado por *Agrobacterium tumefaciens*



copyright: IFFF (BOKU)

IPM Biocontrol IPH Project
© 1996 Regents, University of California

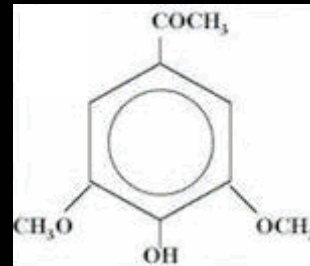
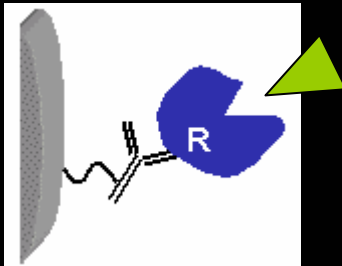
Biología de *Agrobacterium tumefaciens*



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

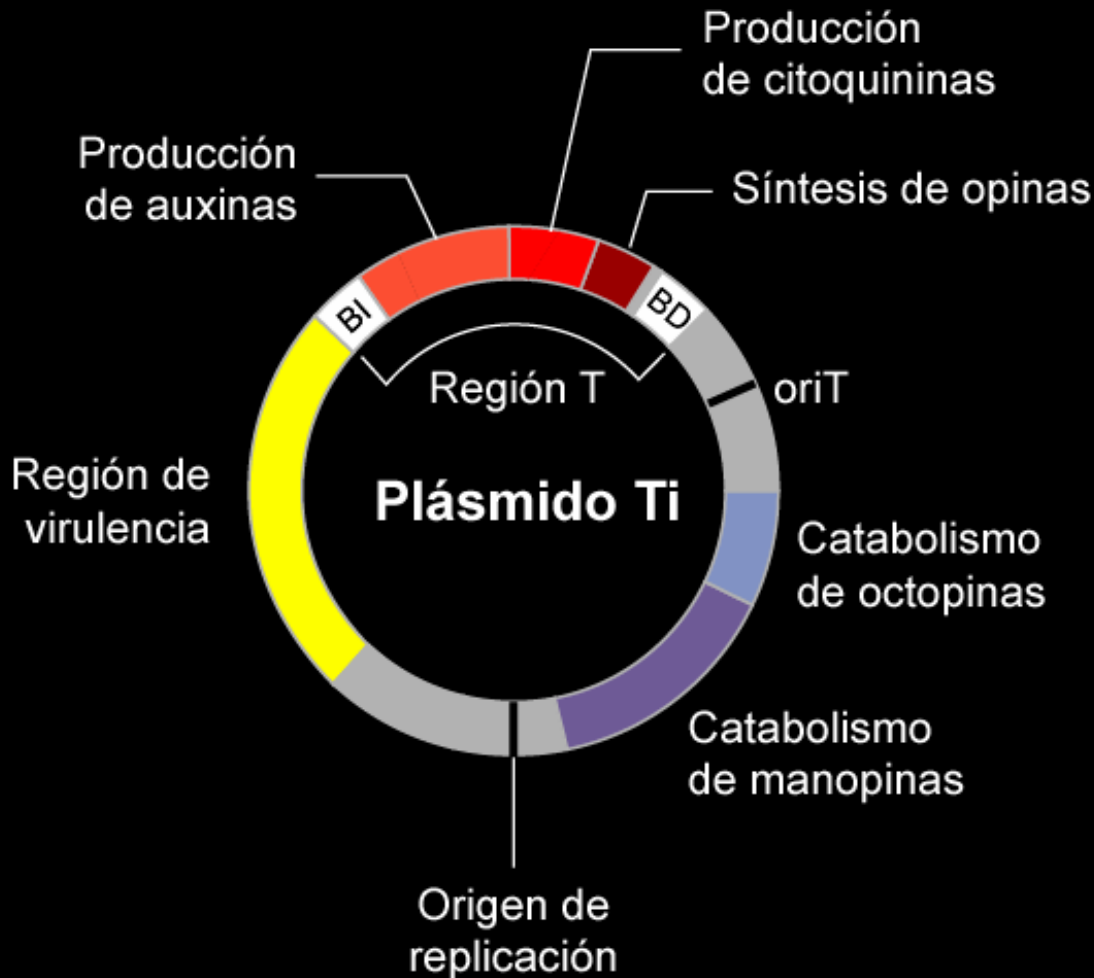
Infecta solamente a través de sitios en la herida y activamente **quimiotáctico** a ellos.

El plásmido Ti produce receptores para acetosiringona



La planta herida produce acetosiringona

Mapa genético del plásmido Ti de octopina



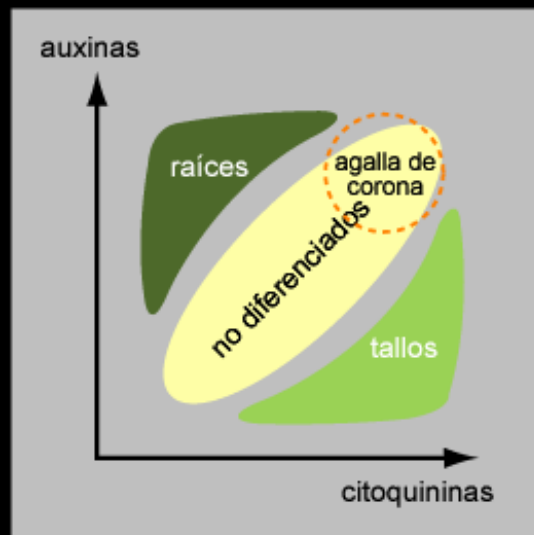
El plásmido Ti determina las características del tumor y la producción de aminoácidos poco comunes denominados opinas (nopalina, octopina).

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 DNA entre los bordes I y D es Transferido a la planta como ssDNA.



El T-DNA contiene genes que pueden ser sustituidos por genes de interés.



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.

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.

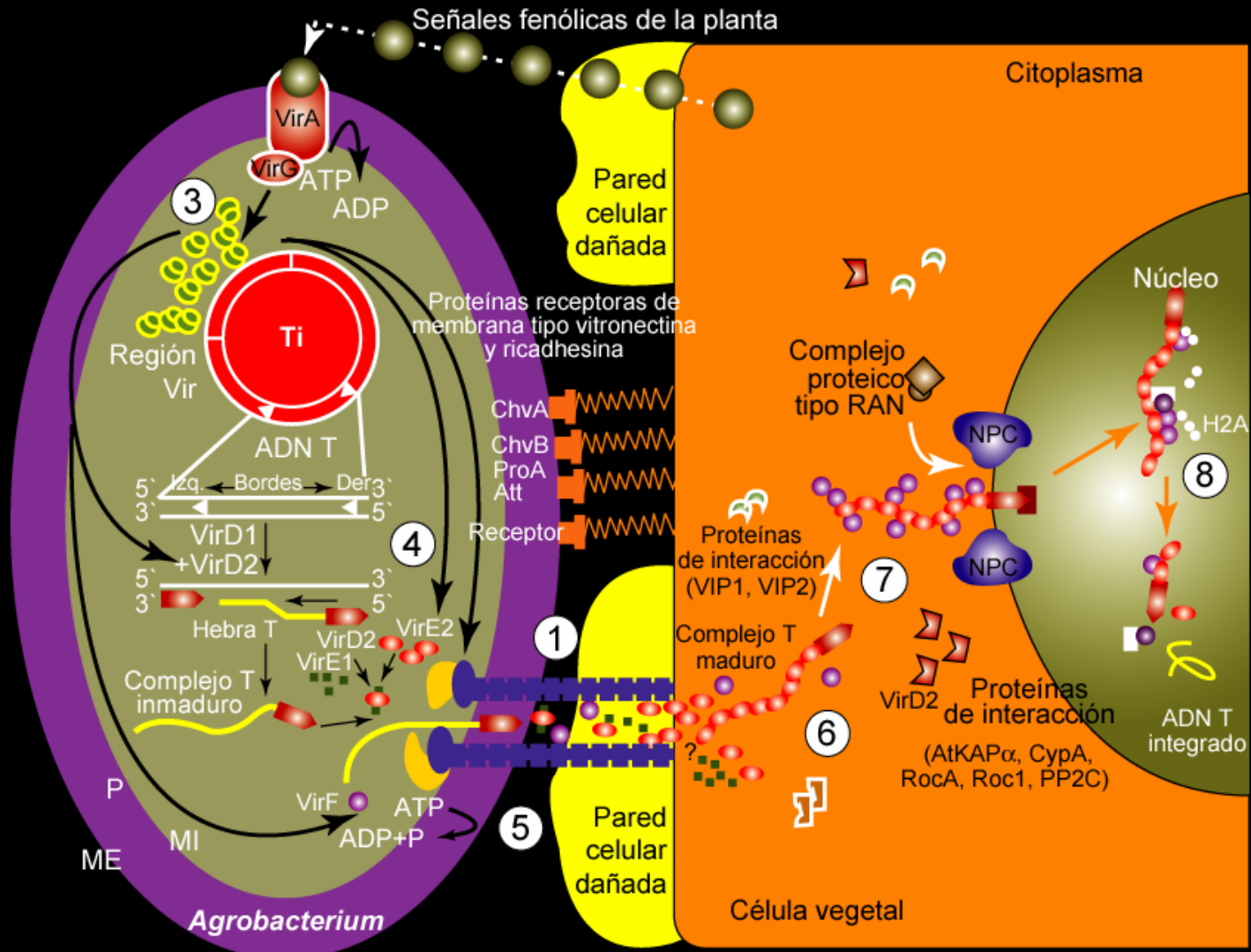
VirD2 y **VirD1**, actúan como endonucleasas, uniéndose al plásmido Ti en los bordes del T-DNA liberándolo. La proteína **VirD2** se une covalentemente al extremo 5' del T-DNA hasta su transferencia a la planta y media la su integración dentro del cromosoma de la planta.

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).

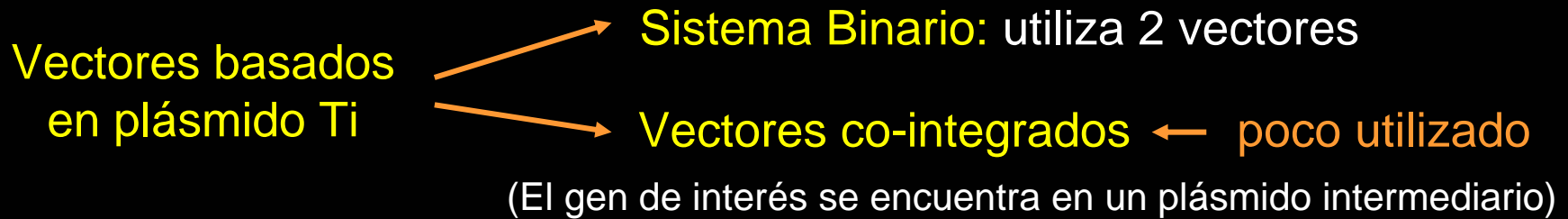
La función de **VirC**, **VirF** y **VirH** son aún desconocidas.

Mecanismos moleculares implicados en la transformación por *Agrobacterium tumefaciens*



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.



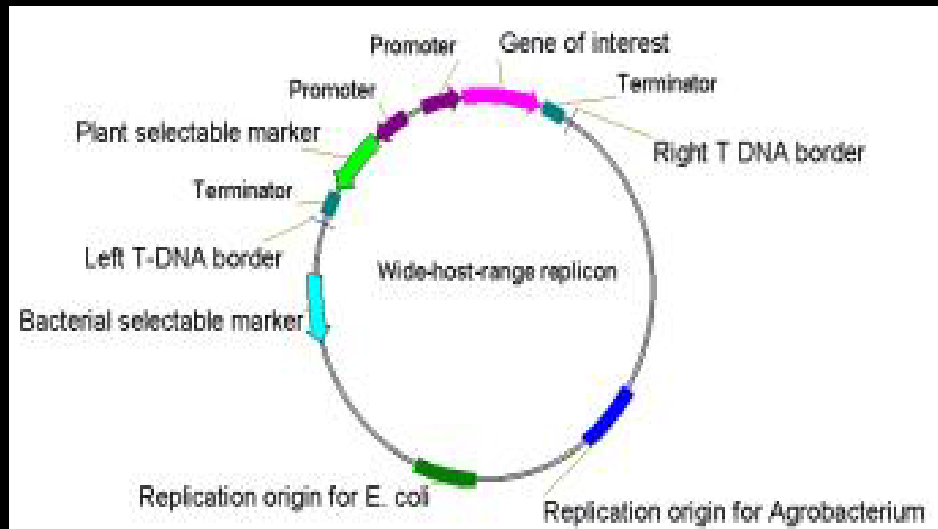
El sistema binario se ha podido desarrollar gracias a dos características del mecanismo de transferencia del T-DNA:

- 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.

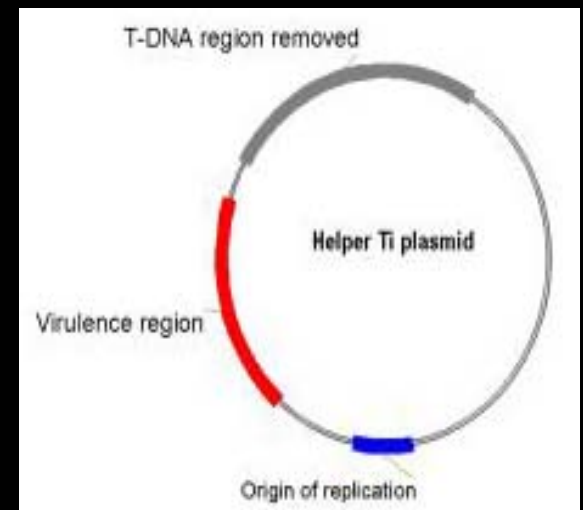
Sistema binario

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 clonado de secuencias. Contiene también un marcador para la selección, por ejemplo resistencia a kanamicina.



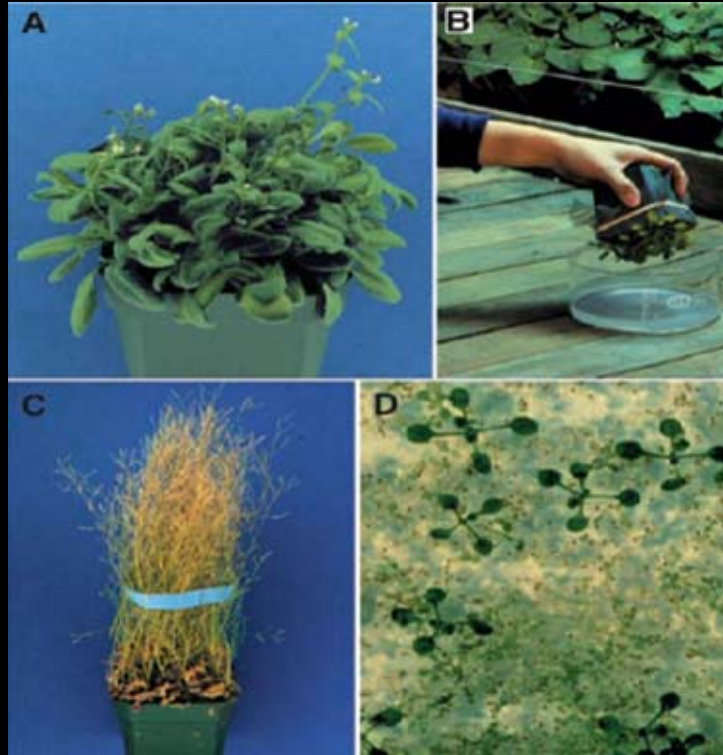
Plásmido Ti desarmado



Plásmido “Helper”

Transformación mediante *floral dipping*

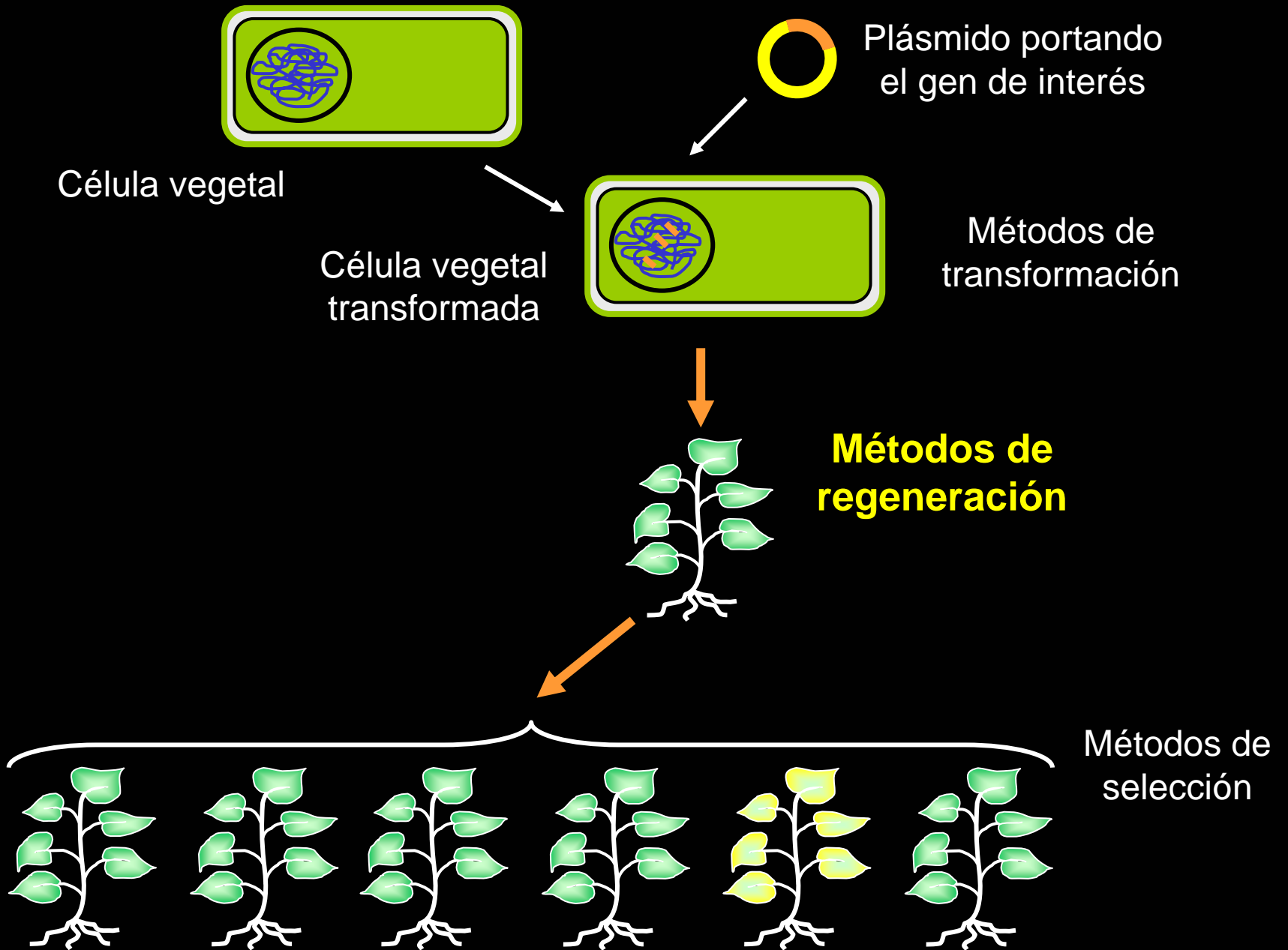
Las plantas de *Arabidopsis* se crecen en maceteros hasta que comienzan a florecer.



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

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

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



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

Posibles vías morfogénéticas:

- 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

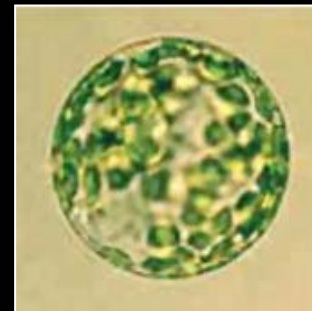
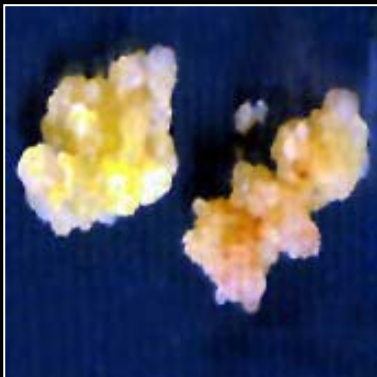
Cultivos diferenciados:

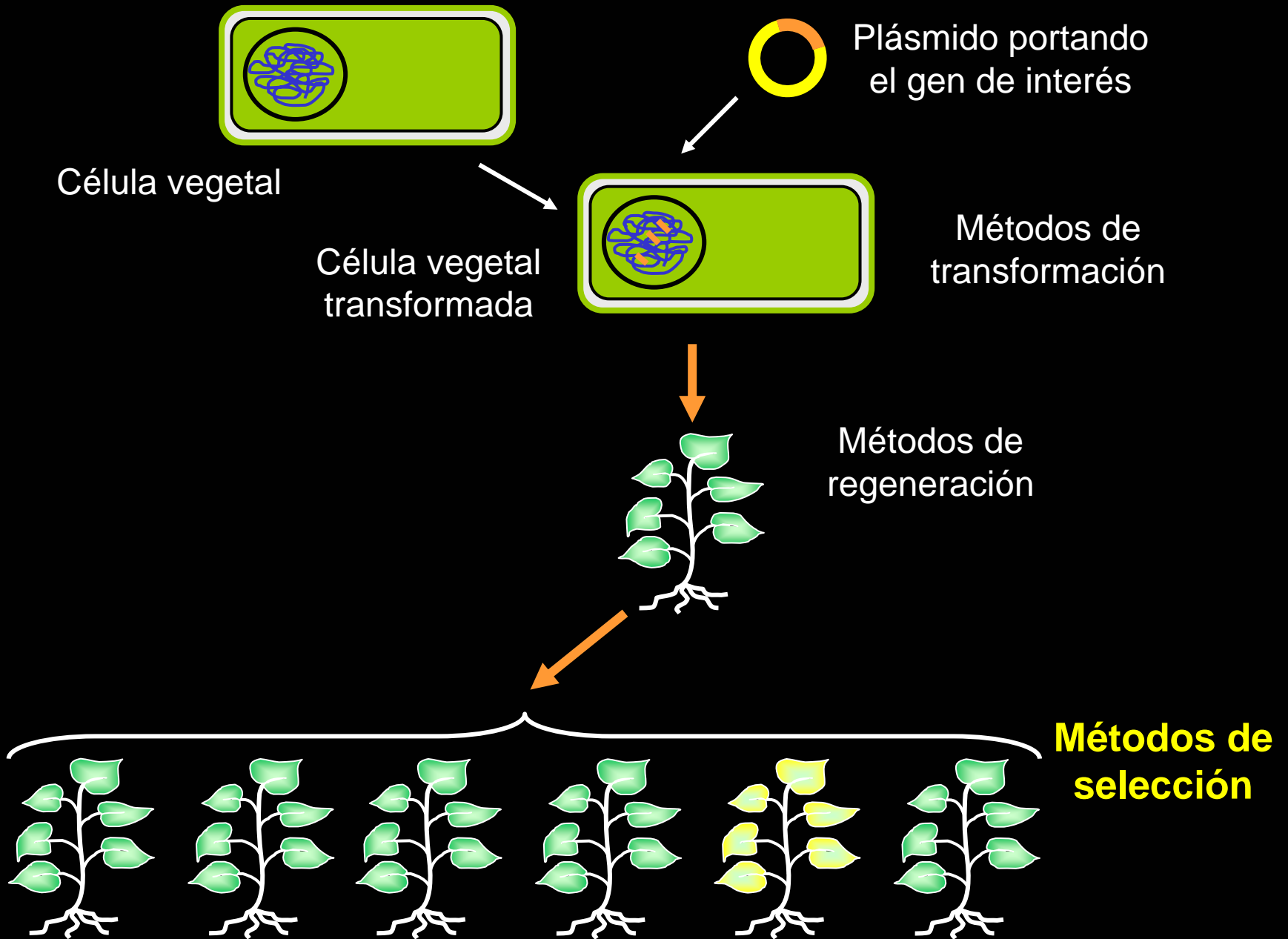
- raíces
- tallos
- embriones
- raíces
- tallos.



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.

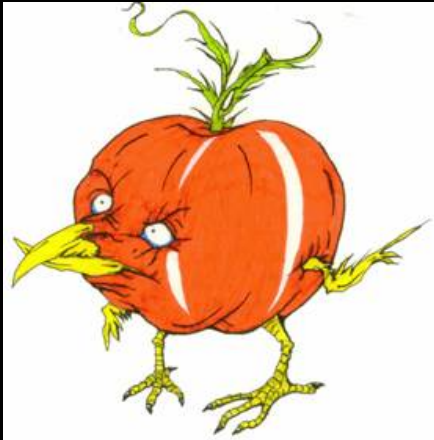
Selección mediante antibióticos y/o herbicidas:

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 *Streptomices hygroscopicus* codifica para la enzima fosfonotricina acetiltransferasa (PAT) que acetila al herbicida **fosfonotrocina** inactivándolo.

Aplicaciones

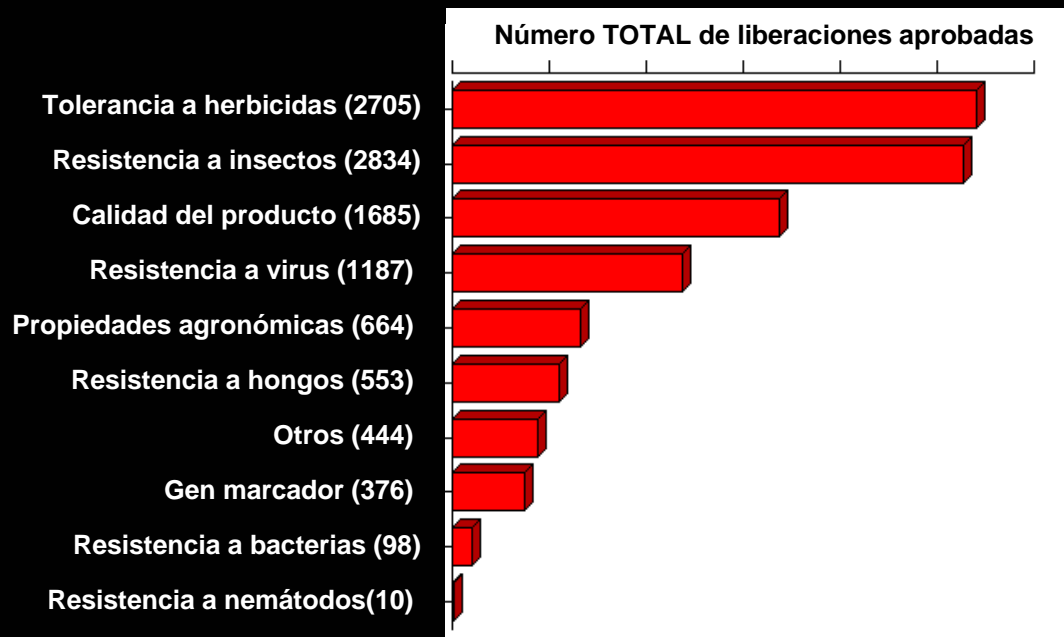


Organismos genéticamente modificados de primera generación

La casi totalidad (99%) de las plantas genéticamente modificadas cultivadas en el mundo son de cuatro especies: soya, 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 **soya 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:

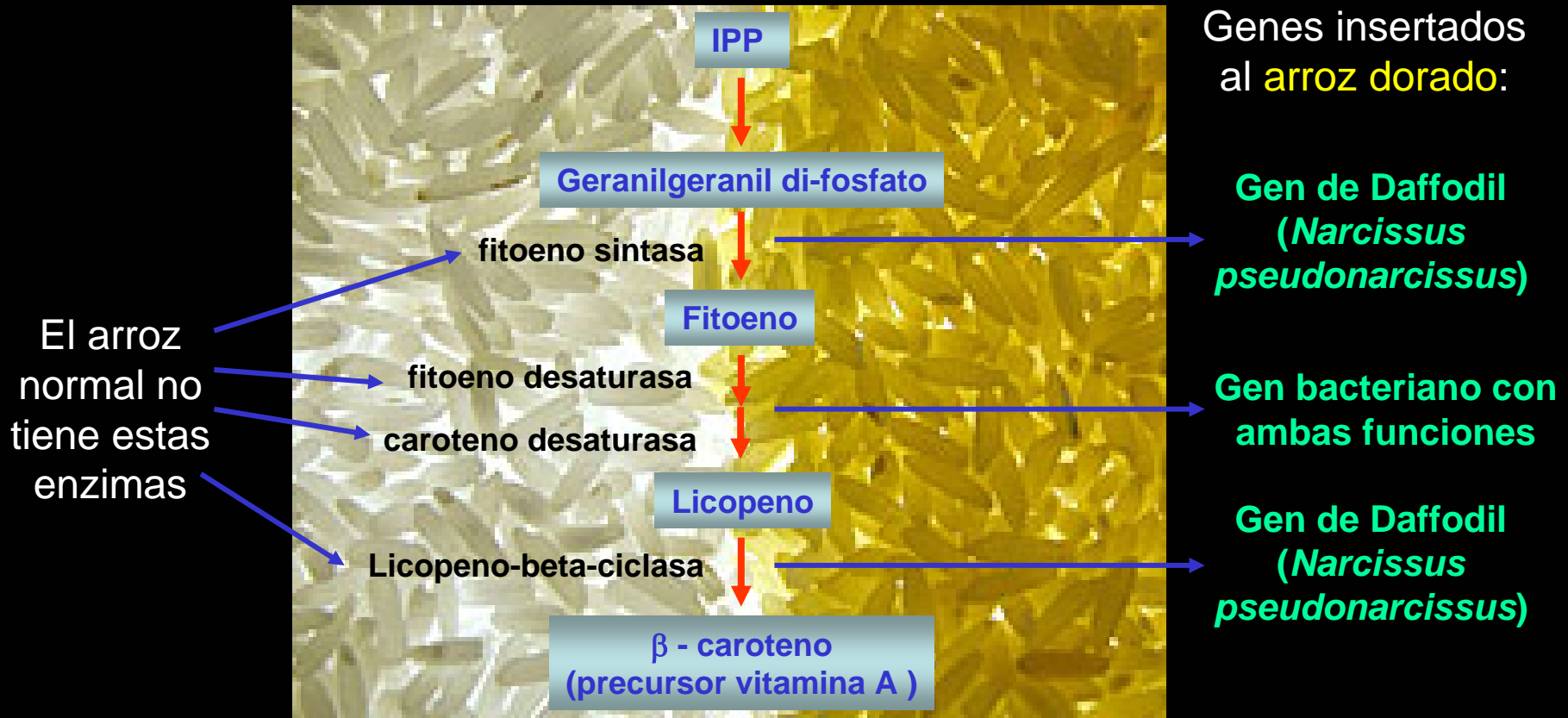
- No es tóxico en humanos.
- 40% de Semilla de maíz Bt en EEUU.
- Reducción potencial de uso de insecticidas.

La **soya Roundup Ready** (RRS) que es Soya GTS40-3-2, lleva el gen que codifica para la enzima CP4 EPSPS (5-enolpyrovylshikimate-3-phospate 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.

Ruta de síntesis de beta caroteno



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 α -interferon	Sustituto de la sangre	tabaco	si	si, (unión a O_2/CO_2)
	Anti-cáncer, antiviral	arroz	si	Actividad antiviral in vitro.
EPO	Estimulador del crecimiento de glóbulos rojos	Células de tabaco	si, (glicanos)	Sin testear
Sero albumina humana		papa	si	Sin testear
Factor de crecimiento epidérmico	Mitógeno	tabaco		Sin testear
Glucocerebrosidasa	Enfermedad de Gaucher	tabaco	si, (glicanos)	si
Hirudina	Anticoagulante	canola	si	si
NPI Defensina	Antibiótico	tabaco		si

Fin

