

- **MEJORAMIENTO GENETICO DE LAS PLANTAS :**

Clásico

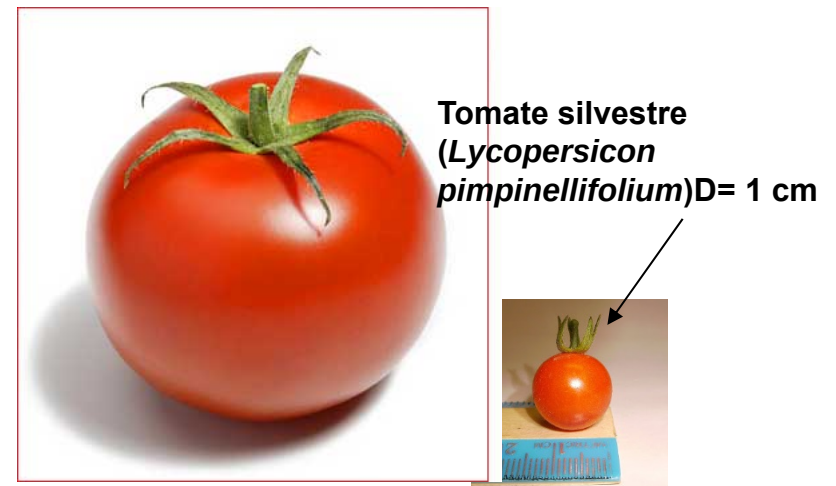
Transformación

- **CLASICO**: basado en la variabilidad genética para los caracteres que se desean mejorar. **Limitación**: reproducción sexual para la incorporación de los mismos (existen barreras de especies) y el tiempo para estabilizar la nueva variedad (10-20 años o más), la creación de variedades es un proceso acumulativo.

LOGROS DEL MEJORAMIENTO GENETICO CLASICO



El maíz sería una forma domesticada del teocinte (antecesor silvestre)



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

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS

(en 1983 aparecen las primeras plantas transgénicas)

Permite introducir genes por métodos No sexuales (no existen barreras de especies) y aporta variabilidad genética sin alterar el background (se pueden agregar características favorables sin perder las mejoras logradas anteriormente)

Planta transgénica: aquella en la cual se ha incorporado un gen por una técnica no sexual

PLANTAS TRANSGENICAS, PARA QUÉ?

- Aumentar la resistencia a pestes, plagas, virus
 - Dar resistencia a herbicidas no selectivos
- Aumentar la productividad • Aumentar la resistencia a distintos tipos de estrés: sequía, salinidad del suelo, frío, luz.
 - Cambiar cualitativamente la composición de las semillas.
 - Retardar la maduración. • Crear mutantes macho estériles.
 - Producir fármacos, vacunas y productos para la industria.
- Estudiar la función de los genes y la regulación de los procesos fisiológicos.

- **Totipotencia**: Capacidad de regenerar una planta completa a partir de una única célula (condición indeterminada: cel. meristemáticas, cel de la corteza, callos: proliferación rápida)
- **Introducir** : Genes de otras especies vegetales (distintas formas alélicas)
- Genes de especies alejadas evolutivamente (hongos, bacterias, virus)
- Silenciar genes residentes (tecnología antisentido, RNA interferencia, cosupresión)

Transformación estable: transgén se integra en el genoma, la planta es regenerada y el transgén se hereda a la progenie.

Transformación transitoria: el transgén entra a la cel de la planta, puede ser integrado en el genoma y expresado, pero luego no se regenera una planta completa de las cel transformadas. Ventaja: rápida, se pueden hacer screenings.

• **VECTOR**: • **Promotor de plantas**: dónde, cuánto, y cuándo ??

• **Constitutivo**: CaMV (35S Cauliflower mosaic virus), **Inducible** : por factores ambientales, estradiol, dexametasona, cobre, etc. Tejido específico : tubérculos, frutos, etc.

• Señales de poliadenilación, • marcador de selección (nptII), gen reportero (uidA o gus)

• ori y gen de R para amplificar en *E.coli*

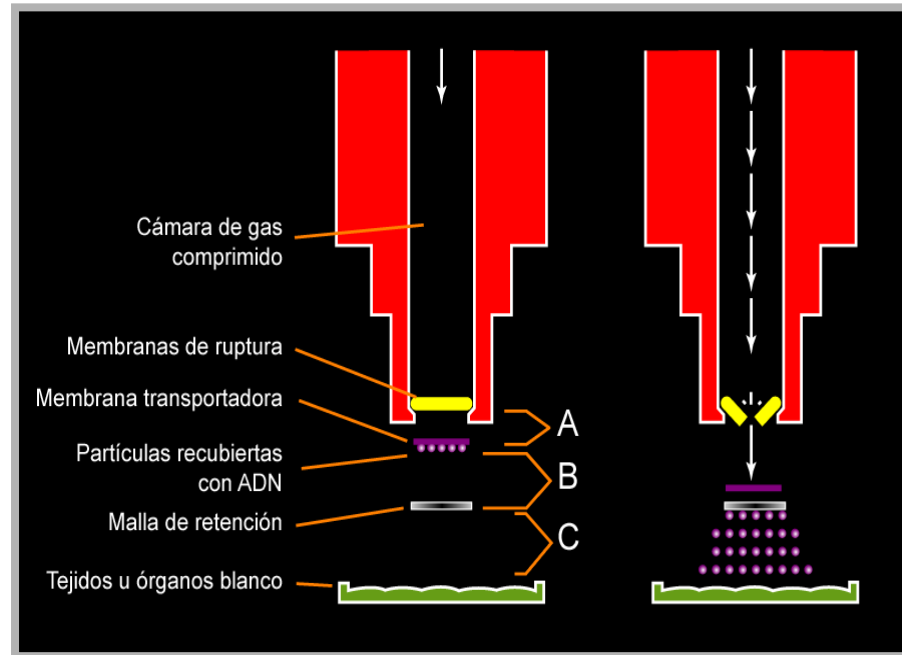
METODOS DE TRANSFORMACION

DIRECTOS: Permiten la entrada de ADN exógeno en la célula vegetal por medio de mecanismos físicos o químicos.

Bombardeo de partículas por “gene gun” o biobalística o método biolístico (1985): usa micro-proyectiles impulsados a alta velocidad. Se puede usar en tejidos intactos.

- Introducir ADN en el núcleo de células y organelas (cp y mt) por medio de microproyectiles disparados a alta velocidad. Propulsión: descarga eléctrica, gas comprimido (He), requiere ajustar la presión del gas y el tamaño de la partícula. El ADN se disocia de la partícula y se integra en el genoma
- Transformantes estables o transitorias; independiente de la especie o el genotipo respecto de la transferencia del DNA, pero requiere de la regeneración por cultivo de tejidos para obtener transformantes estables.
- **MICROPROYECTILES**: Partículas de oro o tungsteno, paladio, platino, iridio, etc.
- Alta densidad, inertes, capacidad par formar un complejo organo-metálico con el ADN y que se disocie, buena capacidad de dispersión. Oro es el más usado.
- Tamaño: 0,5- 3 micras (partículas más pequeñas producen menos daño)

GENE GUN



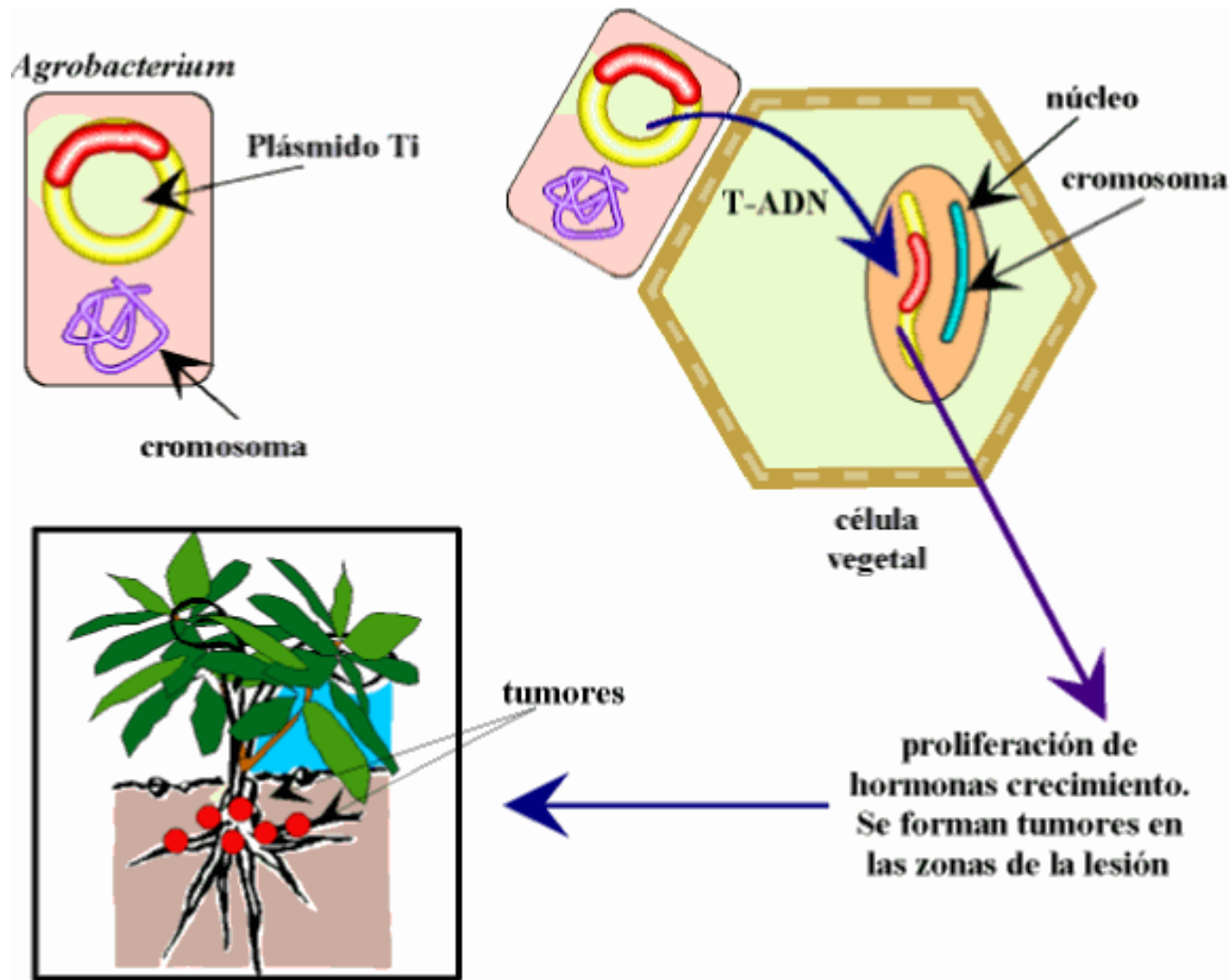
Actual pistola de genes

Gene delivery by the Helios™ Gene Gun



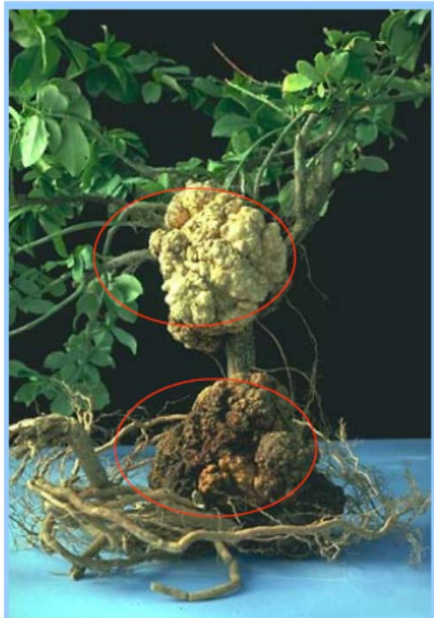
Figure 1. Bombarding birch leaves with the Helios™ Gene Gun.

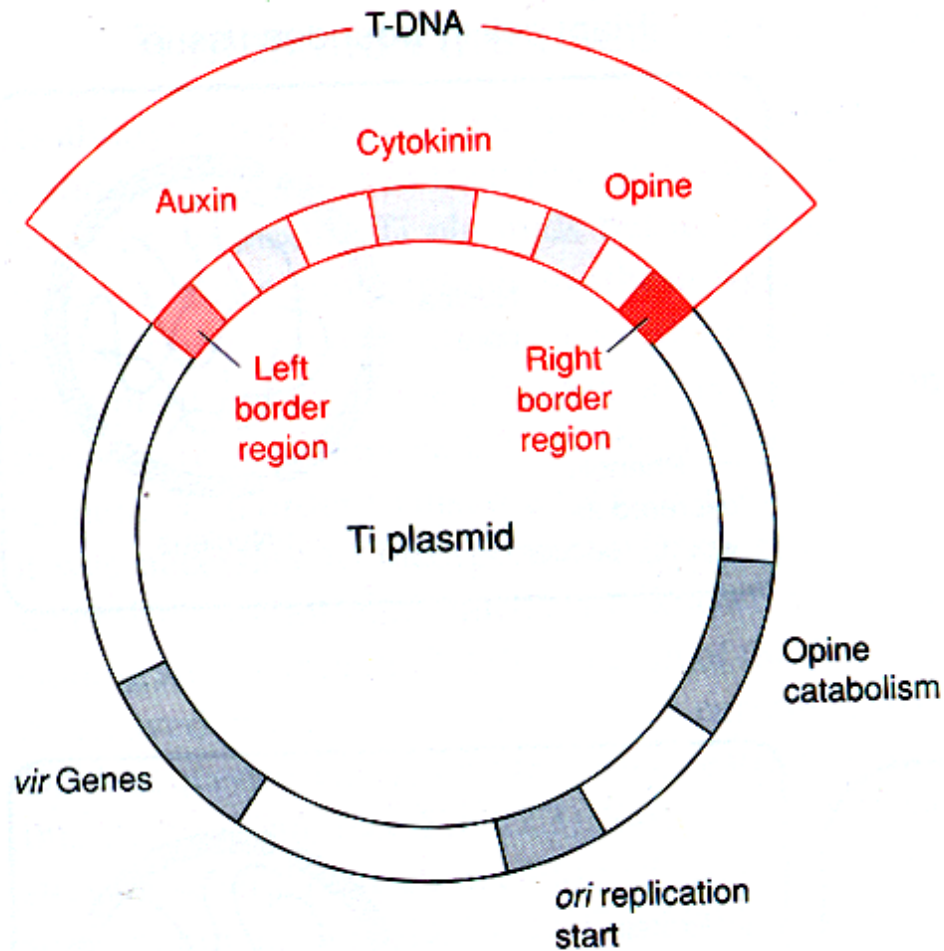
BIOLOGICO: usando *Agrobacterium*, fitopatógeno que transfiere genes propios a la planta y produce una “colonización genética”.



Agrobacterium tumefaciens: angiospermas dicotiledóneas y gimnospermas
Smith y Townsend: 1907; Zaenen (plásmido Ti): 1974. Agalla de la corona (crown gall)-

Agrobacterium rizogenes: tumores en las raíces, plásmido Ri





Plásmidos Ti: 200-800 Kb,

T-DNA: 10-30 Kb. Definido por LB y RB (son secuencias muy homólogas de 24-25 pb en orientación directa)

Genes del T-DNA (8-9)

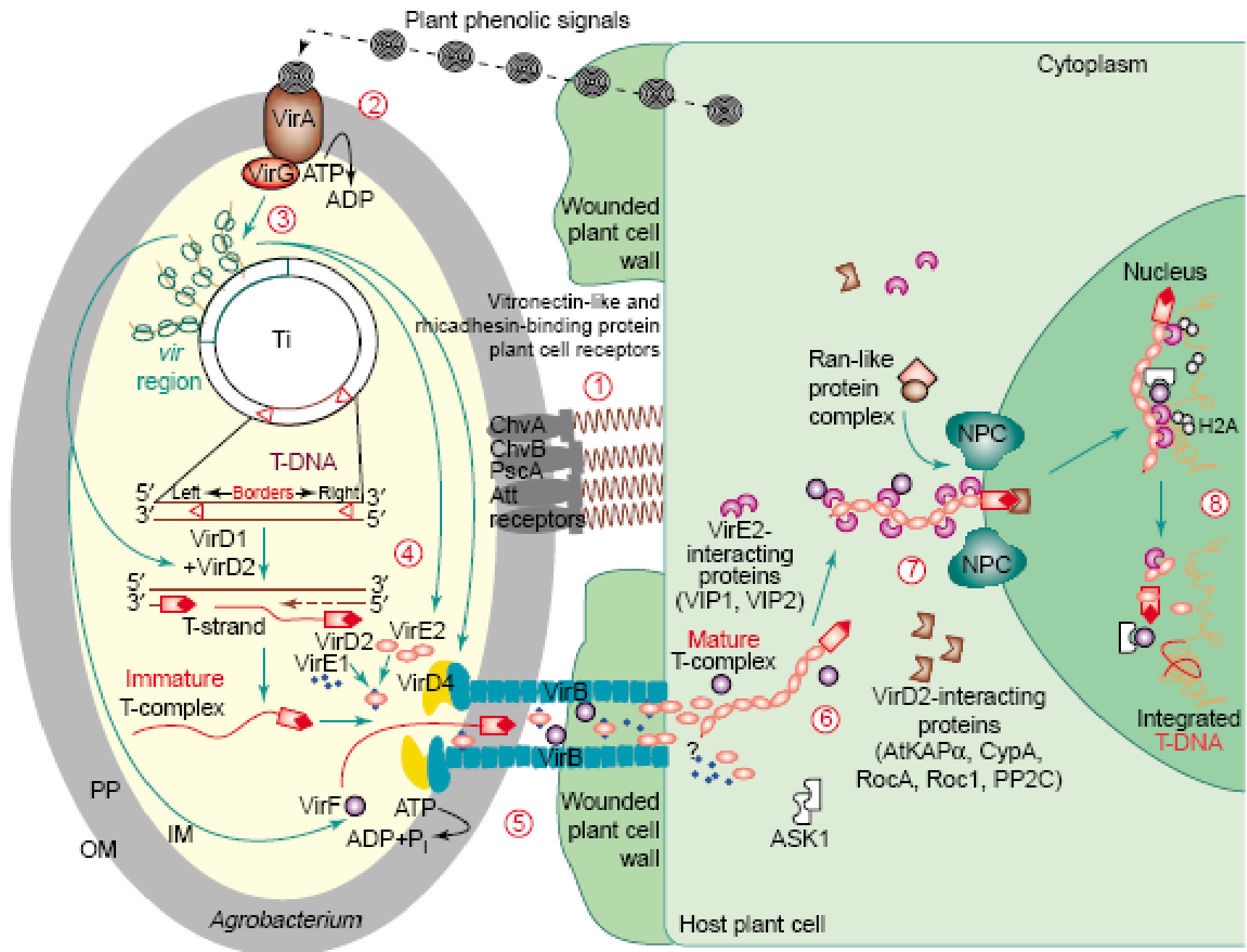
tms1 y *tms2*: codifican enzimas que establecen una nueva ruta biosintética de auxina a partir de triptofano

tmr: síntesis de citokinina

genes moduladores de la actividad de las hormonas. Auxina y citokinina son hormonas que se producen en forma descontrolada generando un tumor.

Síntesis de opinas (nopalina, octopina, etc)

Señales de expresión y regulatorias típicas y funcionales en plantas, y secuencia codificante de origen procariótico (no posee intrones)



- **GENES Vir**: operones A-H, 25 genes (reconocimiento, corte y transporte)
Compuestos fenólicos de la planta herida: quimiotaxis e inducción de los genes vir
- **Vir A**: antena periplasmica, se extiende por la membrana interna (kinasa) censa compuestos fenólicos y se autofosforila, fosforilando VirG.
- **Vir G**: Activa el resto de los genes Vir. Sistema de dos componentes. Ambos genes son de expresión constitutiva. Proteína clave para la virulencia
- **Vir D2 (VirD1 endonucleasa que interactúa con VirD2)**: se une
- al extremo 5' del T-DNA de cadena simple (cadena bottom) en forma covalente y corta entre los nt 3-4 del RB y LB y participa en la integración del T-DNA en la planta. Tiene "NLS": señales de localización nuclear.
- **Vir E2**: no se sabe si se une al T-DNA en la bacteria o en la planta. Tiene "NLS" protege el DNA de la degradación.
- **Vir B**: (11 proteínas conforman el aparato de secreción de tipo IV), VirB4, VirB11 y VirD4 ATPasas que proveen energía. VirB1 es secretada y produce hidrólisis del peptidoglicano. VirB2, VirB5, Vir6 y VirB7: componentes estructurales del T-pilus (filamento flexible ≈ 10 nm)
- **Genes de virulencia cromosómicos de Agrobacterium**: reconocimiento cel-cel: *att*, *chvA* y *chvB*. Condiciones de Temperatura 25-27° y PH : 5-5,8, son óptimos para la transferencia e inducción de los genes Vir

Cepa de *Agrobacterium*



VECTOR BINARIO: LB y RB

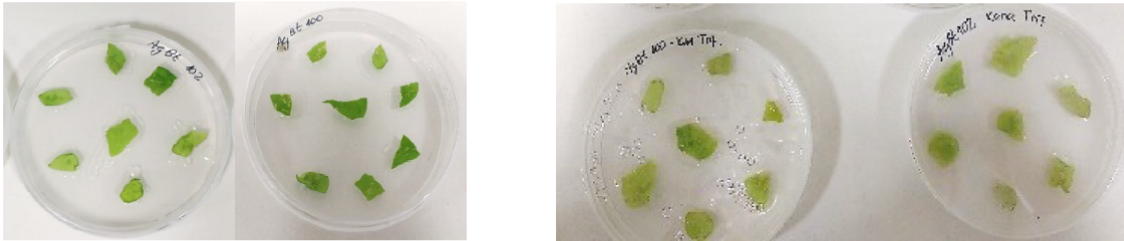
ORI: *Agrobacterium* y *E. coli*

Gen de interés: debe tener un promotor de plantas y señales de poliadenilación

Marcador de selección: debe tener un promotor de plantas y señales de poliadenilación



A



B



C



Transformación de discos de hojas con *Agrobacterium* y regeneración de la planta por cultivo de tejidos:

La herencia del transgén es mendeliana. Cada planta transformada que recuperamos es un **EVENTO** y es distinta a otra transformante obtenida con el mismo vector.

Expresión??? Impredecible

Autopolinización de la T0: Semillas T1

Si hubiera 1 copia del transgén:

25% Homocigotas

50 % Heterocigotas

25 % No transgénicas

T0

T1

**T2, T3, T4, etc
Transformación estable**

Figura 21. Transformación de hojas de tabaco por infección con *A. tumefaciens*. (A) discos de hojas de tabaco incubados con *A. tumefaciens* antes de llevar a oscuridad (izquierda) y en medio de regeneración y selección (derecha). (B) vástagos crecidos a partir de los bordes de los discos (izquierda) y luego transferidos a cajas magenta (derecha). (C) plantas transformantes transferidas a tierra creciendo en macetas (izquierda) y plantas transformantes florecidas (medio y derecha).

COMO CORROBORAMOS LA INSERCIÓN DEL TRANSGEN??

Es importante determinar el número de copias y la cigosis

- 1) PCR: PCR COMPETITIVA/SEMICUANTITATIVA, qPCR**
- 2) SOUTHERN BLOT**

LA EXPRESIÓN DEL TRANSGEN?

- 1) WESTERN BLOT, MEDIDAS DE ACTIVIDAD**
- 2) PUEDE TENER EFECTO FENOTÍPICO**

Transformación transitoria: (transient) el transgén entra a la célula de la planta (infiltración), aunque no esté integrado en el genoma puede ser expresado, y podemos detectarlo, luego no se prosigue con el cultivo para regenerar una planta completa. Ventaja: rápida, se pueden hacer screenings de promotores

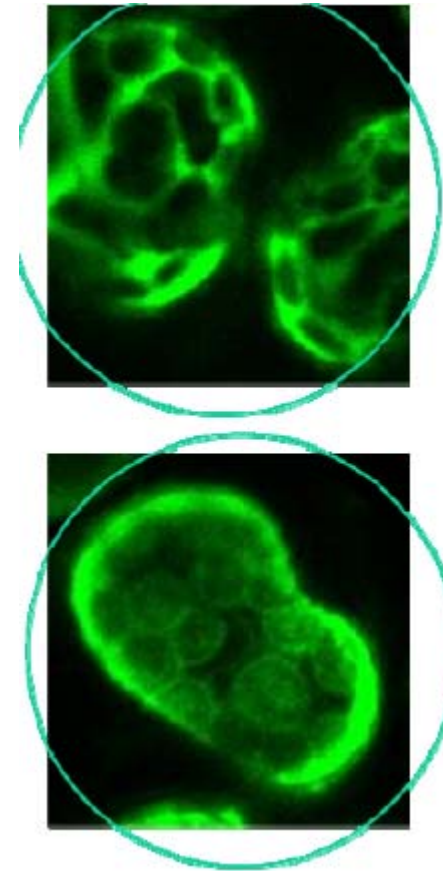


Foto: Transformación transitoria de *Nicotiana benthamiana*-Infiltración con un cultivo de *Agrobacterium* transformado con un vector binario que codifica la proteína GFP que tiene fluorescencia verde.

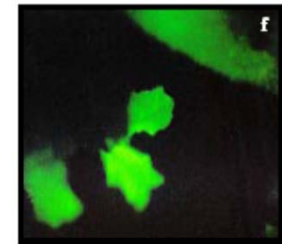
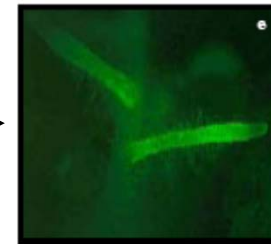
Cómo identificamos las células transformadas??

Marcadores

- Genes de resistencia a antibióticos: *npt II* neomicin phospho transferasa (kanamicina, neomicina). Inhiben síntesis de proteínas en cp y mt de plantas: clorosis e inhibición del crecimiento
- Genes de resistencia a herbicidas.
- Genes que codifican por enzimas que le permiten crecer en presencia de un sustrato particular: fosfomanosa isomerasa, xilulosa isomerasa

Los marcadores se pueden eliminar por distintos tipos de técnicas dejando sólo el gen de interés.

Tejidos de plantas que expresan GFP iluminados con UV →



Genes reporteros

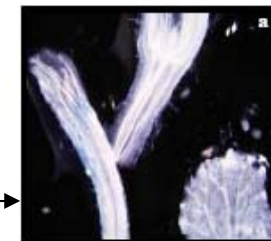
Fusión del promotor de un gen a la secuencia de un gen reportero. Gen reportero: es un marcador que en vez de darle un fenotipo a la célula, codifica por un producto cuya actividad se puede medir o detectar

Ej, gus A, Green fluorescent protein, CAT, etc

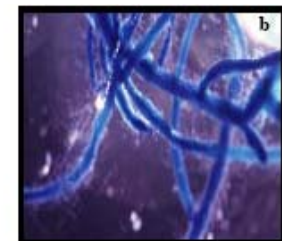
Usos: para caracterizar elementos regulatorios transcripcionales:

Promotores y secuencias adyacentes, enhancers, secuencias que unen factores de transcripción.

Tinción con GUS →



Negativa



Positiva