

INGENIERIA GENETICA

TRANSGENICOS

OGM: ORGANISMOS GENETICAMENTE
MODIFICADOS

OVM: ORGANISMOS VIVOS
MODIFICADOS

REDISEÑO DE GENOTIPOS:
GENERACION DE INDIVIDUOS RECOMBINANTES
(A NIVEL NUCLEAR):
NUEVAS COMBINACIONES DE GENES

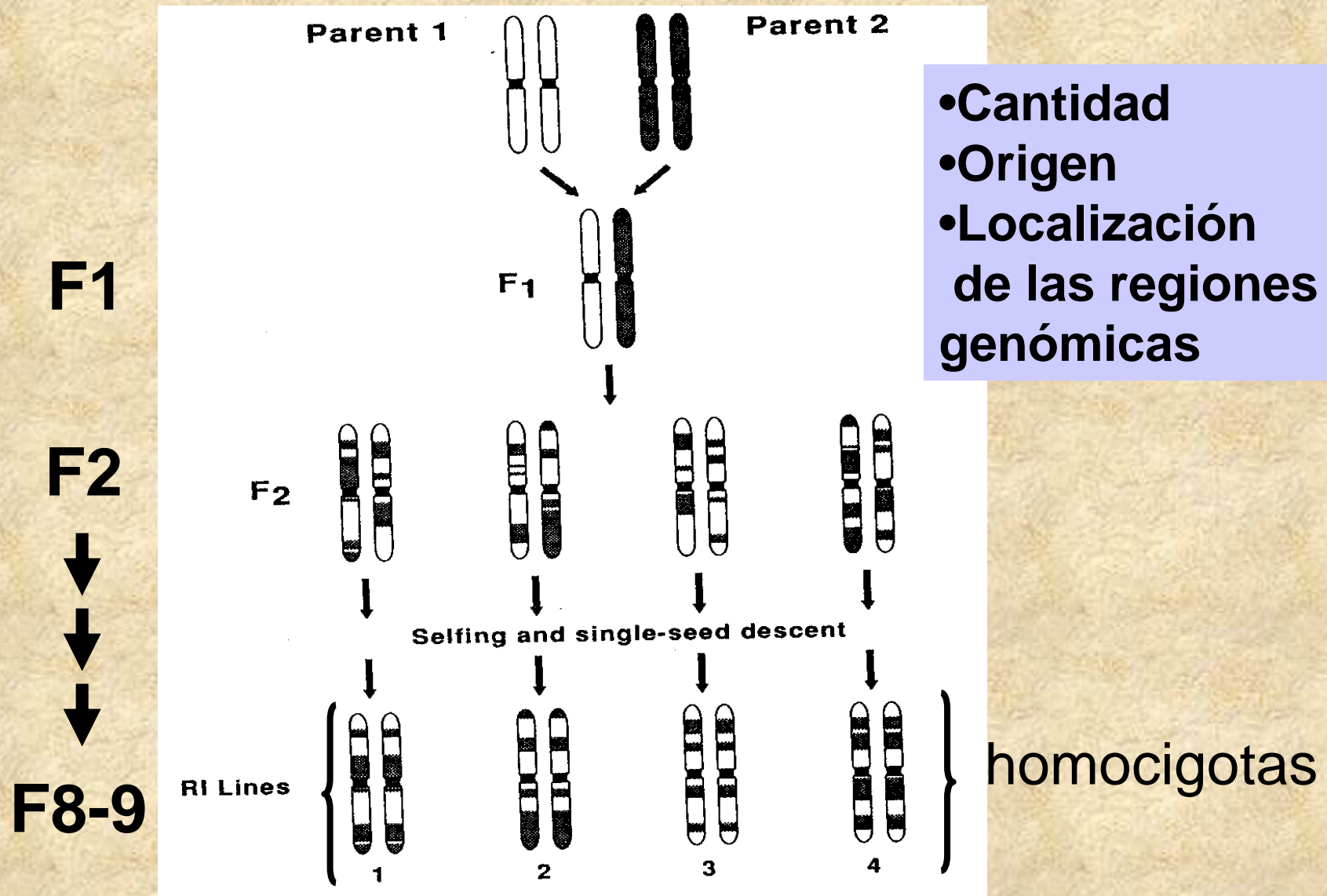
✓ **HIBRIDACION SEXUAL:**

**RECOMBINANTES GENERADOS POR INTERCAMBIOS
RECIPROCOS ENTRE CROMOSOMAS
PATerno/MATerno (ENTRECruzAMIENTO, MEIOSIS)**

✓ **INGENIERIA GENETICA:**

**RECOMBINANTES GENERADOS POR INTRODUCCIÓN
DE SECUENCIAS EXOGENAS (INDEPENDIENTE DE
MEIOSIS)**

Recombinantes por hibridación sexual

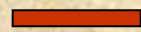


INGENIERIA GENETICA

receptor



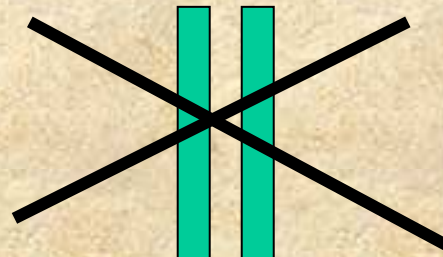
+



Casete de transgenes

MITOSIS

hemicigoto



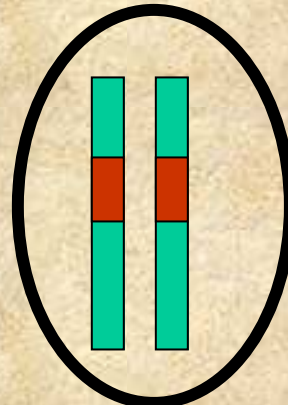
T₀

MEIOSIS

homocigoto

hemicigotos

homocigoto para el transgen



T₁

Con la tecnología de ADN recombinante y otros desarrollos metodológicos ha sido posible:

Aislar un **gran número** de secuencias génicas (regiones reguladoras y estructurales) de virus, bacterias, hongos, plantas y animales.

Identificar las **diferentes señales** en el gen necesarias para su efectiva expresión

Delimitar las **regiones reguladores** y conocer su **patrón de expresión**

Elaborar **catálogos de secuencias reguladoras** con diferentes patrones de expresión

Elaborar catálogos de **secuencias de señalización**

Elaborar catálogos de **secuencias codificantes** de proteínas.

Biotecnología:

Aplicación de técnicas de cultivos celulares y de biología molecular como apoyo al mejoramiento genético y la producción

TRANSFORMACION:

Proceso de alteración del genotipo de una célula mediante la introducción de uno o más genes por vía no sexual

Los transgenes pueden provenir de individuos de diferentes géneros, familias y reinos.

El pool genético a utilizar es ilimitado

2- El desarrollo de plantas transgénicas

- Definiciones
- Requisitos
- Obtención de trigo transgénico

DEFINICIONES

INGENIERIA GENETICA=TRANSFORMACION
transferencia de ADN entre individuos mediante tecnologías distintas de hibridación sexual

TRANSGENE

ADN introducido integrado en el genoma

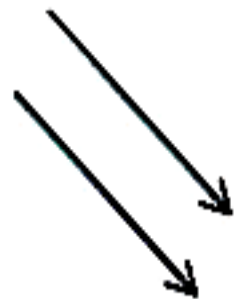
LOCUS TRANSGENICO

unidad heredable detectada por el fenotipo transgénico

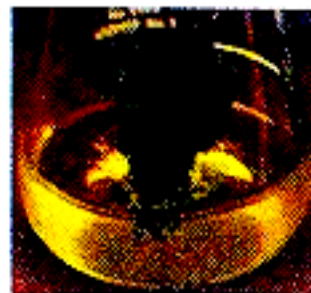


GENES DE INTERES AGRONOMICO

ADN



TRANSFORMACION



REGENERACION
IN VITRO



CULTIVAR MEJORADO

Sistema celular
en activa división
(mitosis)

Requisitos:

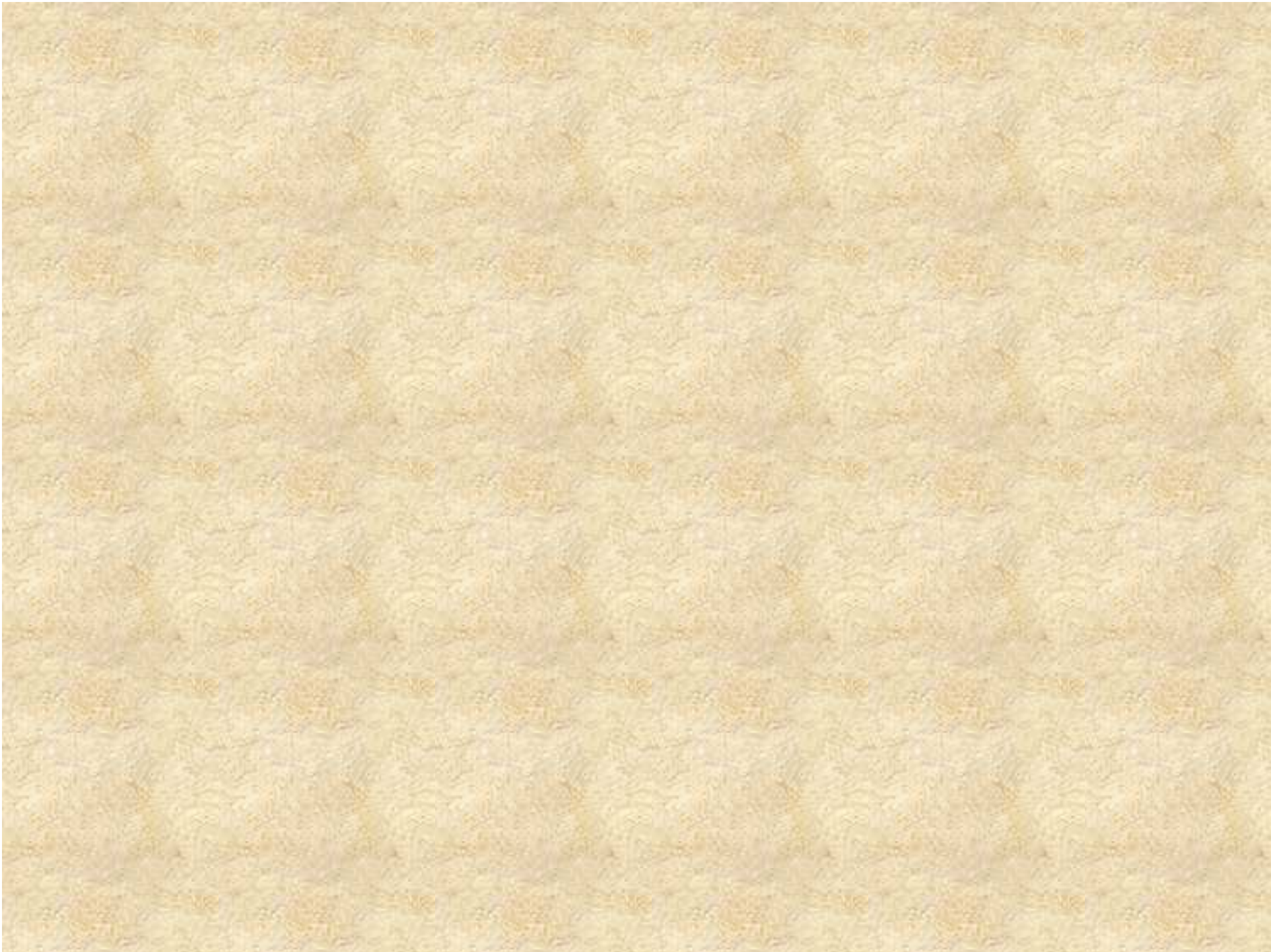
- i) sistema de **regeneración** de células blanco (totipotentes)

PLANTA → CELULAS EN DIVISION → PLANTA

- ii) secuencias génicas (**estructural y reguladora**) necesarias para su expresión

- iii) sistema de **transformación** biológica o física para introducir el gen o los genes

- iv) estrategia de **selección** de células/plantas transformadas



PLANTA

Desdiferenciación

SISTEMA CELULAR

- Protoplasto
- Célula
- Callo
- Meristema

Transformación
(Casete de genes)

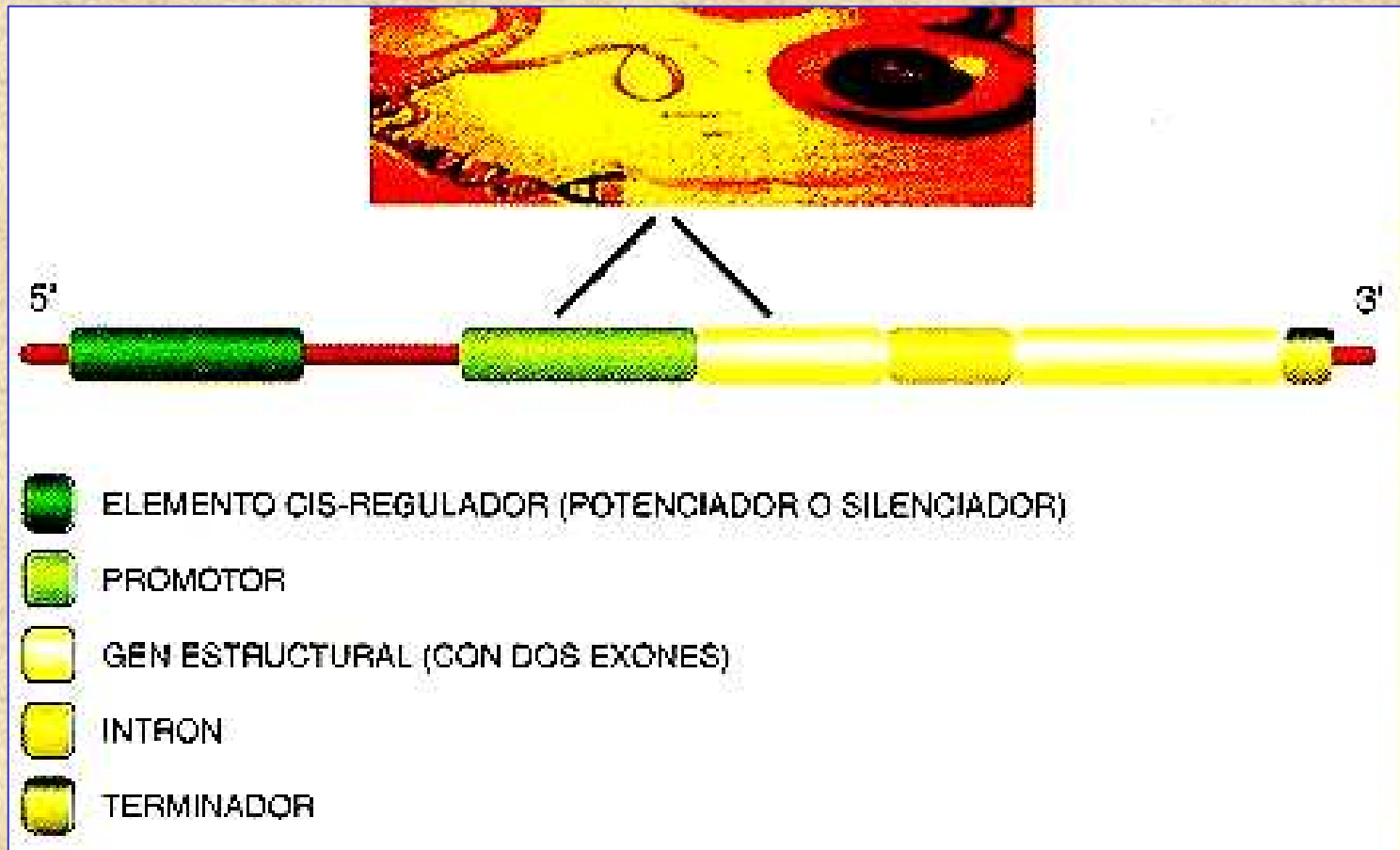
Selección (célula)

Regeneración
(organogénesis)

Selección (planta)

PLANTA (To): TRANSGENICO

Secuencia génicas: reguladoras y estructurales



Expectativa:

El juego de secuencias reguladoras y estructurales es apropiado para obtener los niveles de expresión esperados:

ARNm (cantidad, localización)
proteína (cantidad, función)
fenotipo

Prever modificaciones si el gen es de origen procariota

Sistemas de transformación

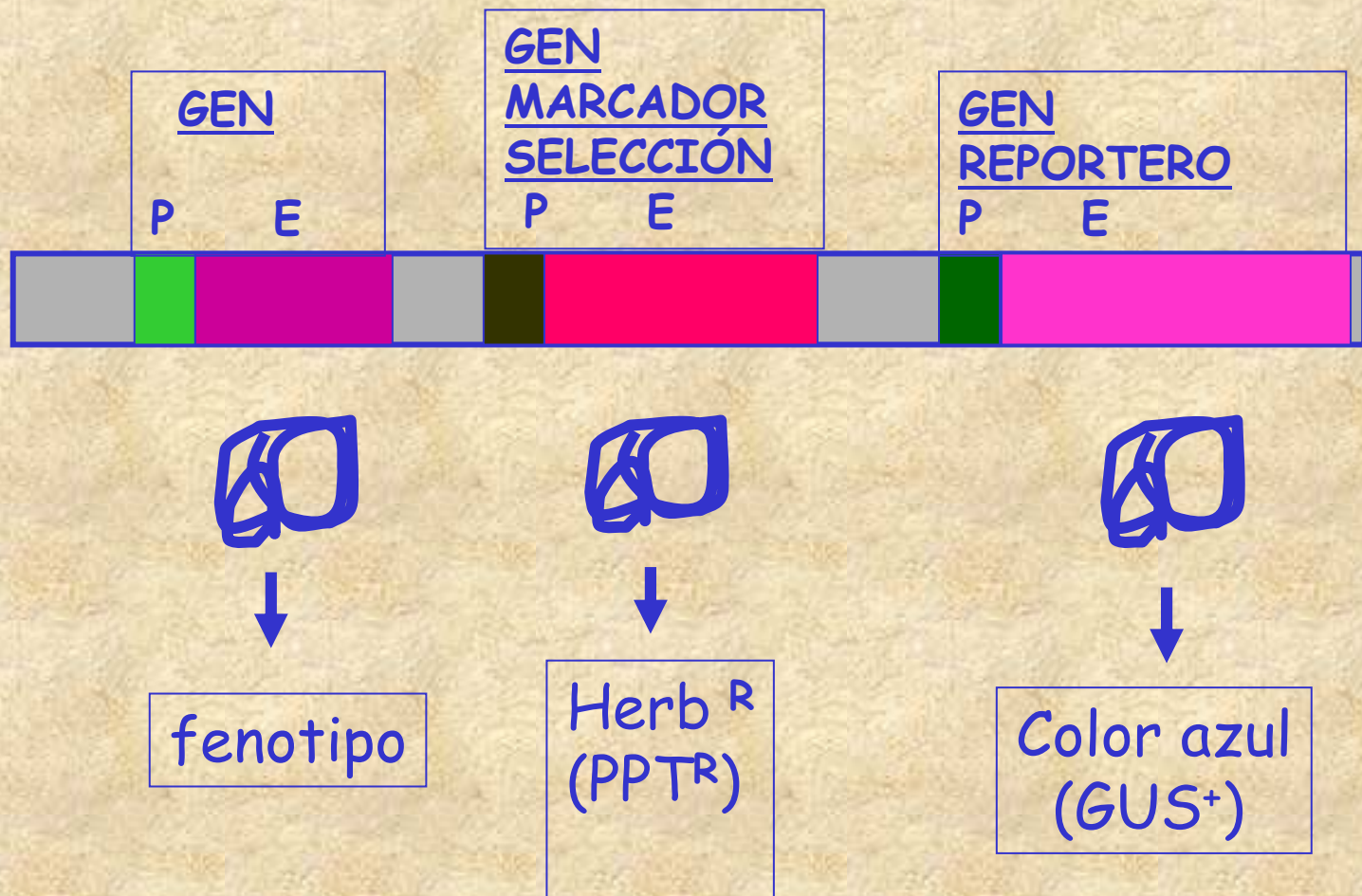
1. Agrobacterium

células blanco (protoplastos, tejido dañado, meristema apical, semillas, planta, callo derivado de embriones inmaduros o escutelo) bajo número de copias, regiones génicas

2. Transferencia génica directa

protoplastos, células, tejidos
microinyección, fibras de silicona, bombardeo de microproyectiles, electroporación

Modelo de vector de transformación



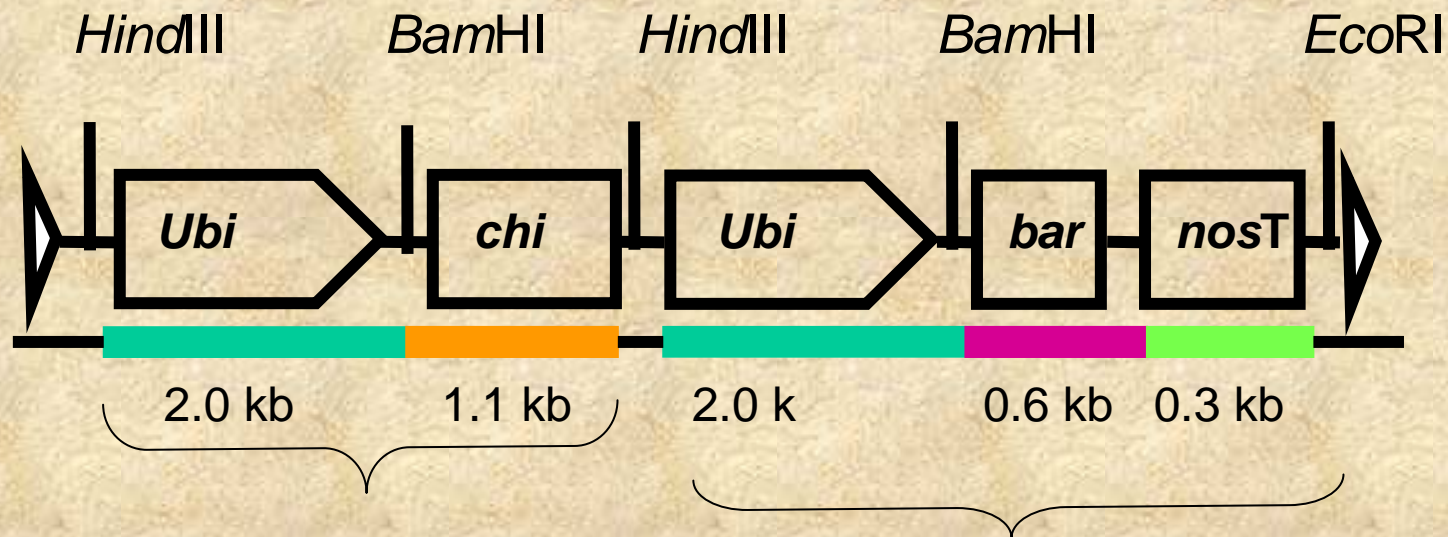
Confirmación de transformación estable

1. Detección de ADN transgene en ADN genómico
2. Detección de ARNm del transgene
3. Presencia de la proteína o actividad enzimática
4. Herencia estable del marcador en plantas T_0-T_n

***Producción rápida de múltiples
líneas independientes
de trigo transgénico fértil***

Weeks et al, 1993

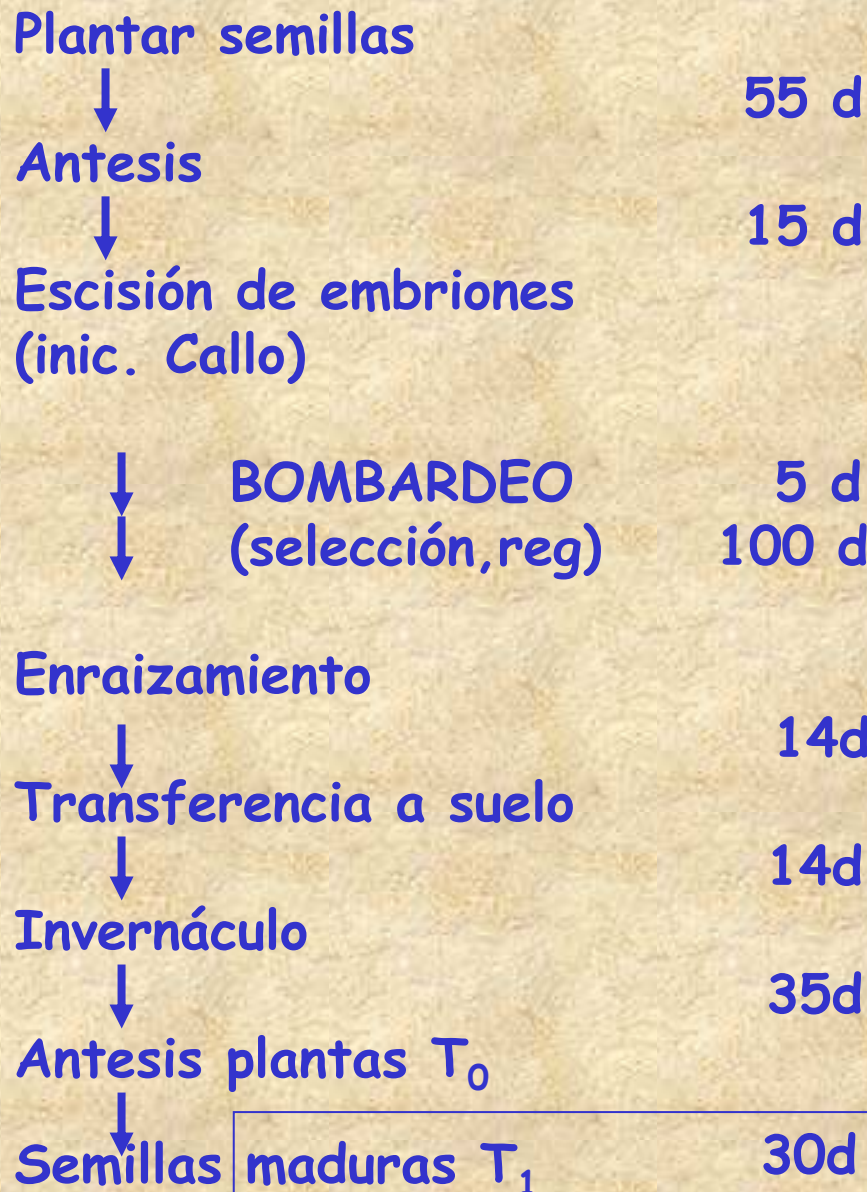
Casete de transgenes



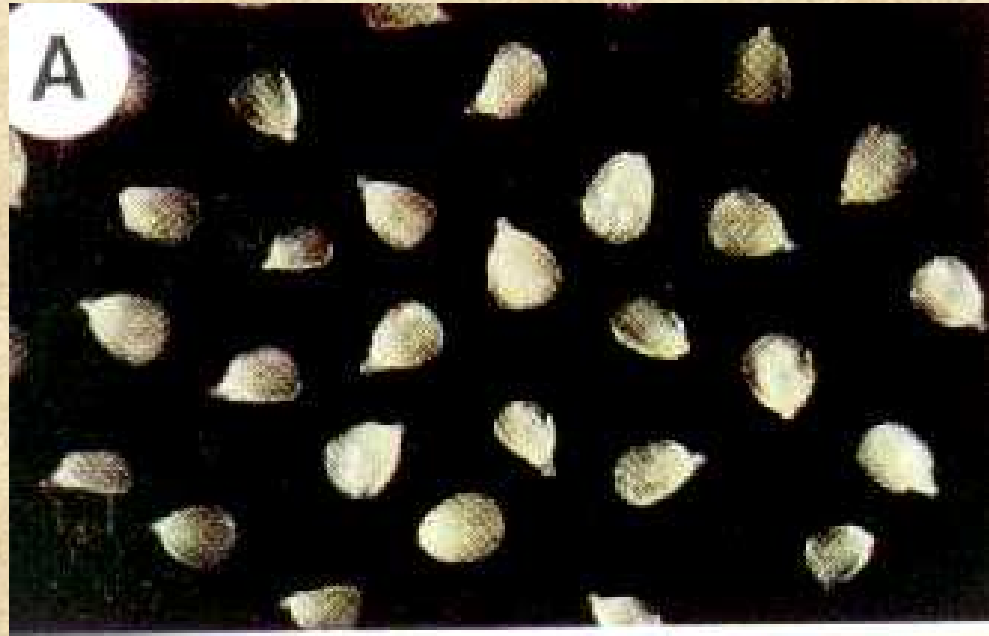
Transgen de interés
Quitinasa
(gen de arroz)

Marcador de selección
Resistencia a herbicida
(gen bacteriano)

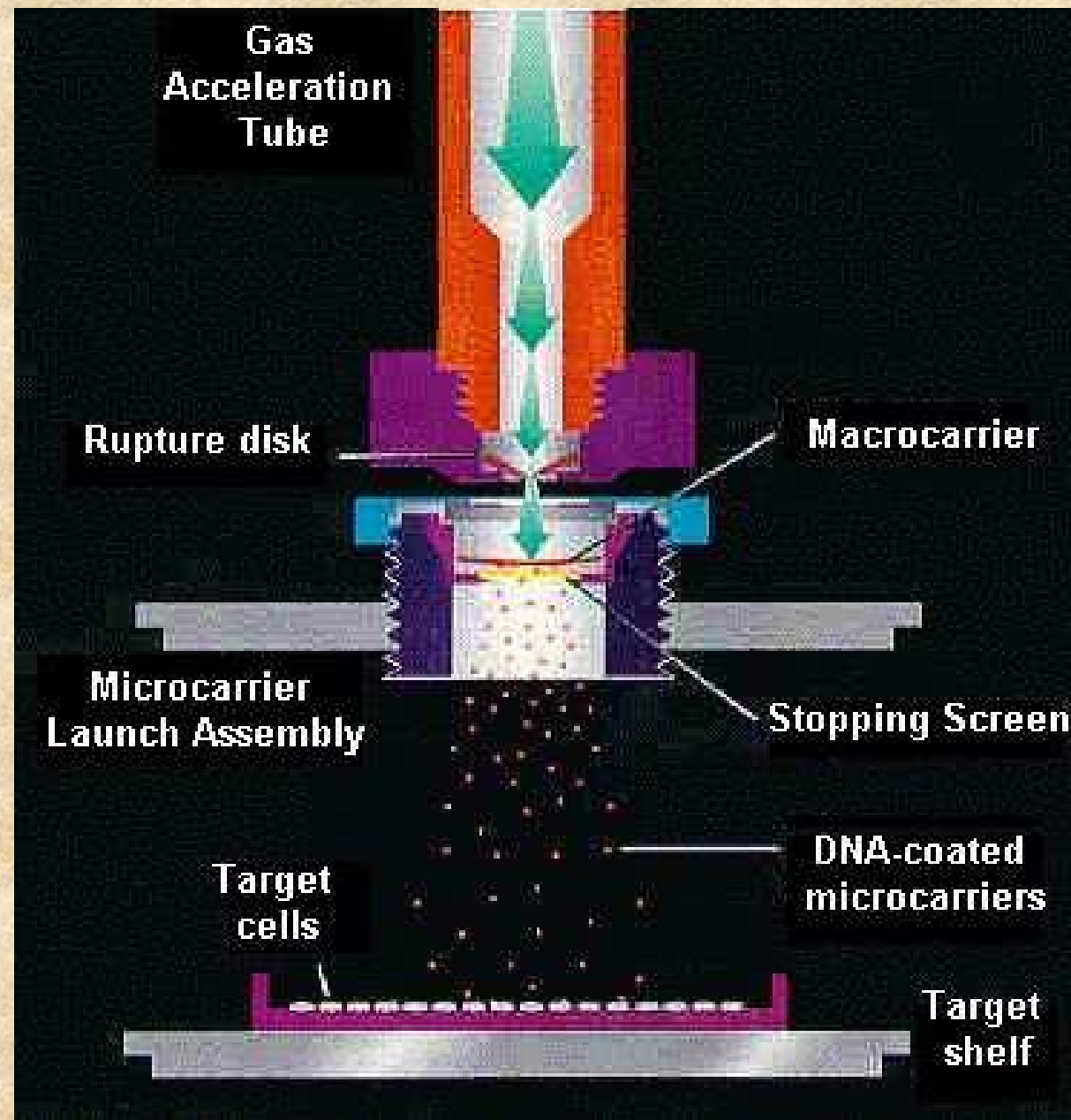
SISTEMA DE TRANSFORMACION

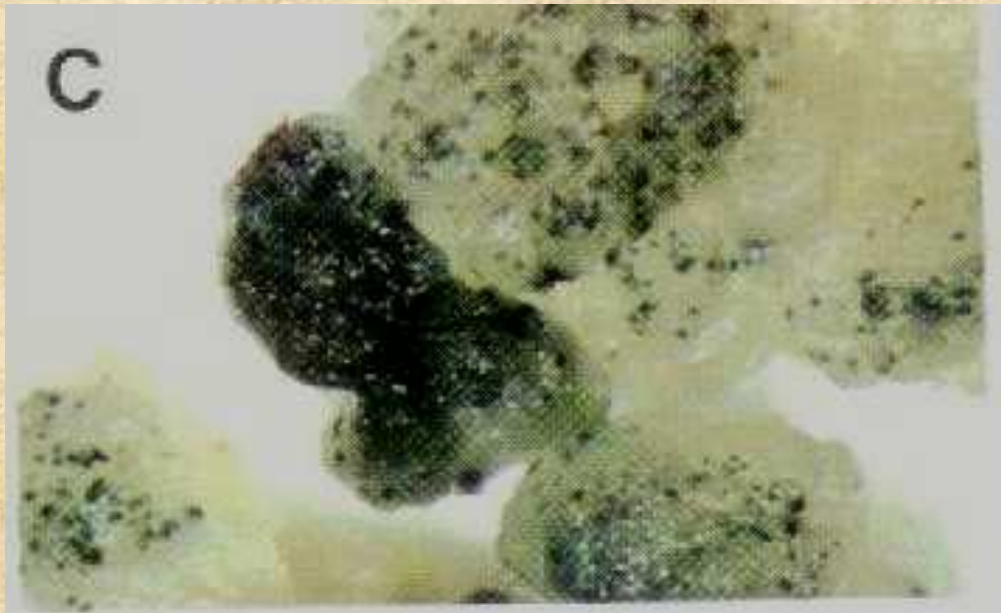


168d



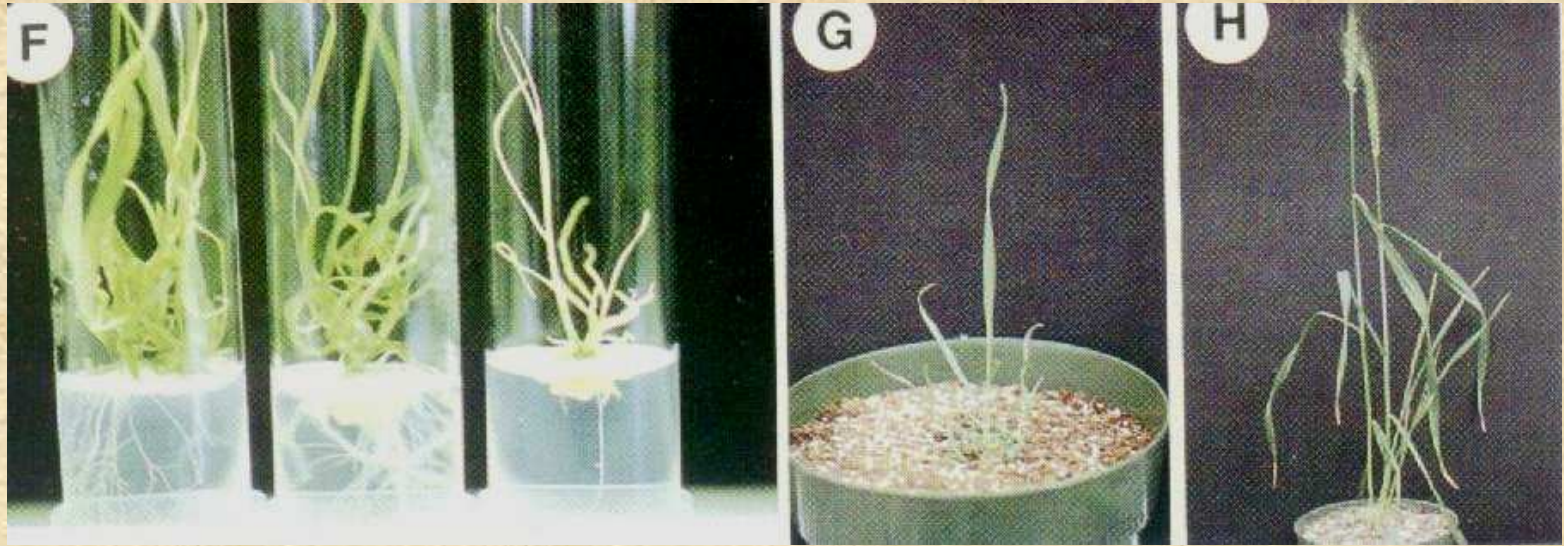






E





Eficiencia del proceso

- 168 días
- 1-2 plantas transgénicas/1000 embriones bombardeados. Cada planta proviene de un evento diferente de transformación
- falsos positivos
- 9 líneas transgénicas independientes (eventos de transformación)

EVALUACION DE LINEAS TRANSGENICAS

Plantas To, T1

clasificación según tipo de evento de transformación

estudio expresión (ARNm, proteína, fenotipo)

estudio estabilidad (To a T4)

Ideal es comenzar evaluando 50-60 plantas To para seleccionar las líneas homocigotas T4 o T5 del mejor evento: alta expresión, integración simple, alta estabilidad.

EVENTO DE TRANSFORMACION

El proceso de integración del transgen ocurre independientemente en cada célula

Mediante el proceso de diferenciación/regeneración, células transgénicas individuales dan origen a plantas transgénicas independientes

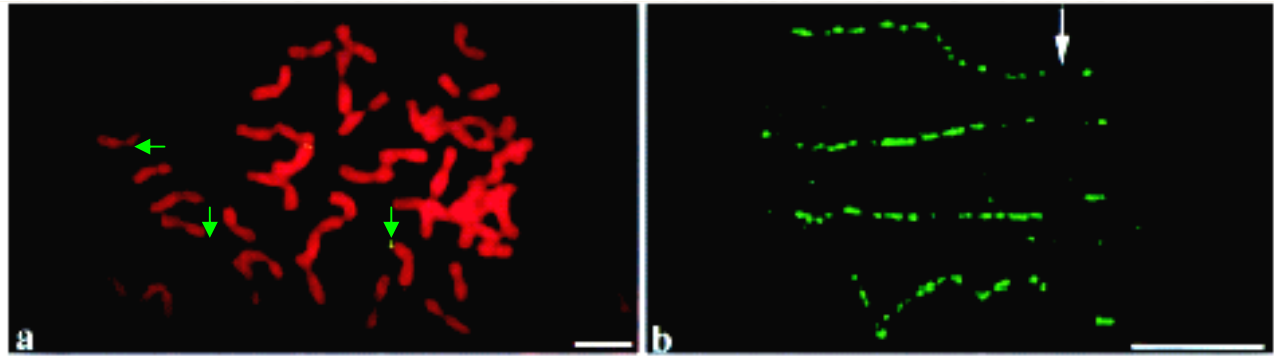
Cada una de las variantes de la integración del transgen encontradas en plantas regeneradas de un mismo experimento de transformación se denomina EVENTO DE TRANSFORMACION.

Los eventos difieren en:

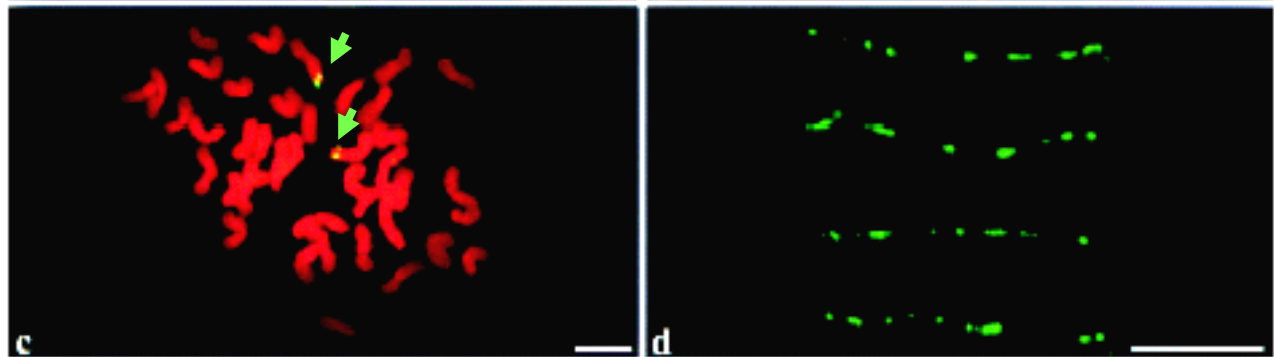
- ✓ Número de copias del transgen integradas al genoma
- ✓ Nivel de integridad del transgen
- ✓ Localización del transgen en el genoma (cromosoma, brazo, etc)

Evento 1

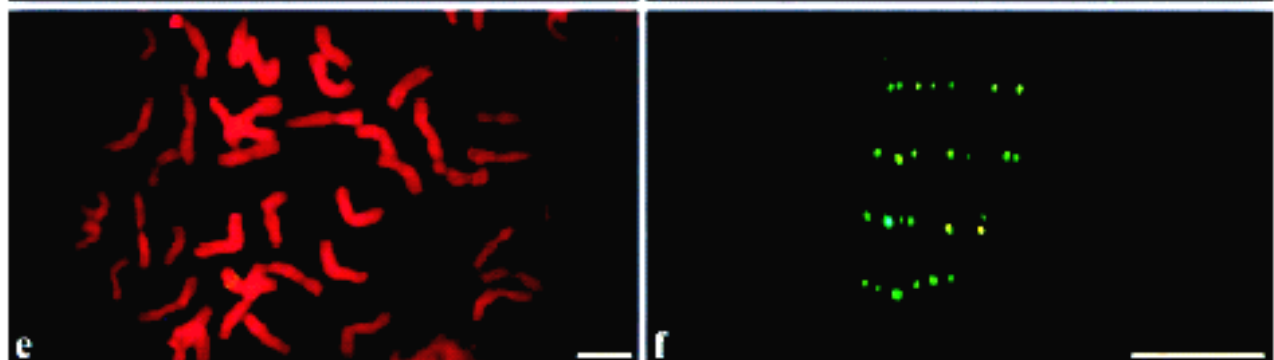
- Inserción en **tres** cromosomas
- **Múltiples copias** en cada locus
- Cada copia sufrió un **rearrreglo** del transgén



Evento 2



Evento 3



Evento 4

- Inserción en **un** cromosoma
- **Pocas copias** en cada locus
- Cada copia es el transgen **íntegro**



LA INGENIERIA GENETICA COMO HERRAMIENTA DE INVESTIGACION

- ✓ Verificación función in planta de secuencias génicas (secuencia estructural y reguladora)
- ✓ Modificación del patrón de expresión
 - Sobreexpresión
 - Silenciamiento
 - Localización temporal y espacial de la expresión génica

