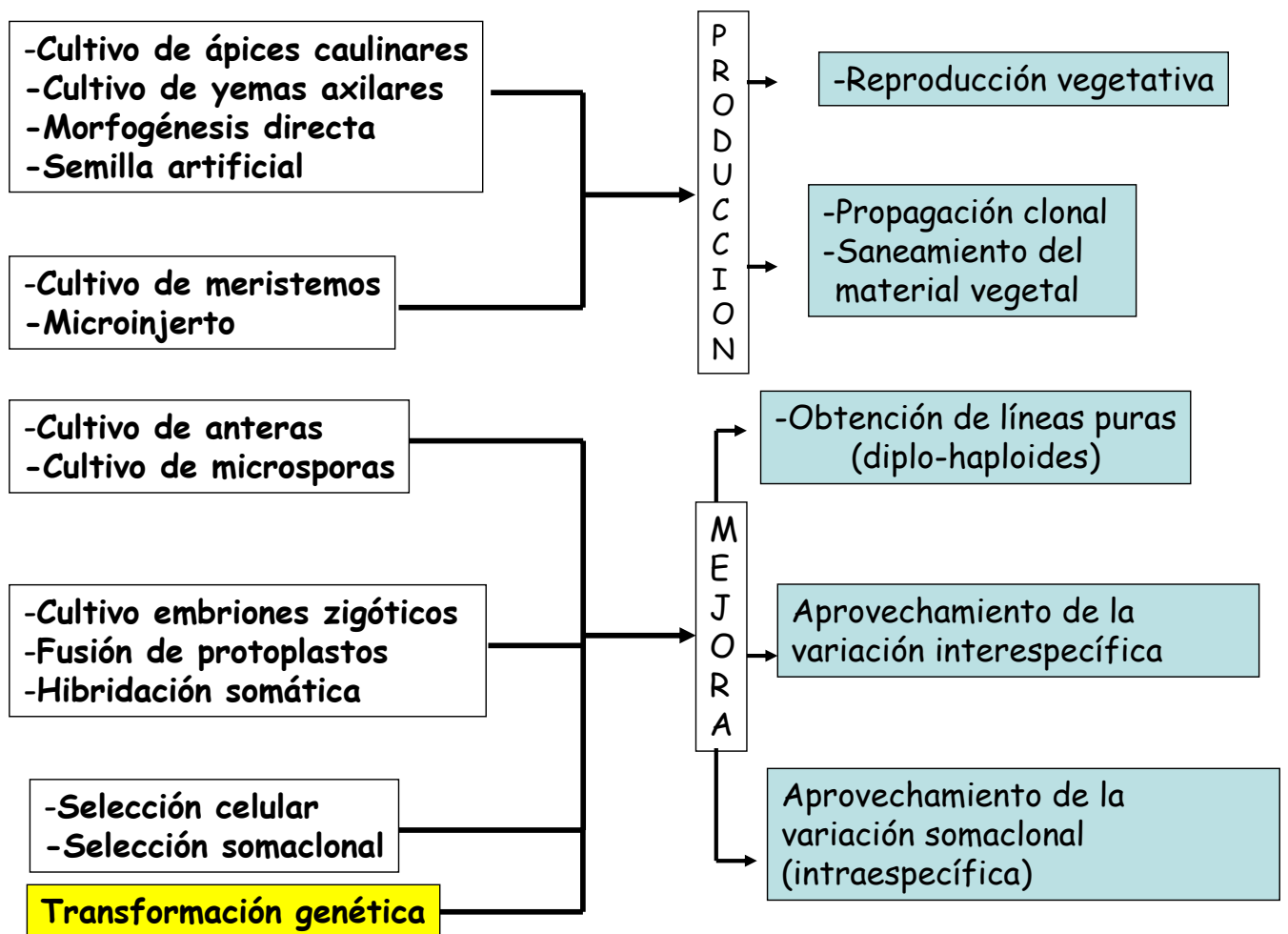


Manipulación del ADN y transformación de células vegetales. Pasos en el desarrollo de un sistema de transformación. Sistemas y estrategias. Transformación estable y transitoria. Elementos de un vector de transformación. Promotores habituales. Selección. Genes seleccionables, marcadores e informantes. Nuevas estrategias de selección



Transformación genética

- Es la introducción controlada de ácidos nucleicos en un genoma receptor (Tacchini et al. 1987).
- Organismo Modificado Genéticamente: (OMG) es un "Organismo cuyo material genético ha sido modificado de una manera distinta del apareamiento y/o recombinación natural".
- Los genes de un organismo que son insertados en otro se denominan **transgenes** y tienen la capacidad de conferirle a este último una determinada característica.
- La transformación exitosa depende de la incorporación estable del gen nuevo en el genoma de la planta receptora y su subsiguiente transmisión a sucesivas generaciones.

¿POR QUE TRANSFORMAR UNA ESPECIE?

- **INDUCCIÓN DE VARIABILIDAD GENÉTICA:**
 - AUSENCIA DEL CARACTER FENOTÍPICO INVESTIGADO EN EL ÁMBITO DE LA ESPECIE.
 - EXPRESIÓN DE NUEVAS FORMAS ALÉLICAS DE GENES QUE YA ESTÁN PRESENTES EN EL GENOMA DE LA PLANTA.
 - EXPRESIÓN DE SECUENCIAS CODIFICANTES PRESENTES EN EL GENOMA PERO BAJO EL CONTROL DE NUEVAS SECUENCIAS REGULADORAS QUE MODIFIQUEN SU NIVEL O PATRON DE EXPRESIÓN.
 - INHIBICIÓN DE LA EXPRESIÓN DE GENES RESIDENTES EN EL GENOMA.
- **COMPLEMENTO Y/O ALTERNATIVA A LOS PROGRAMAS DE MEJORA GENÉTICA POR VÍA SEXUAL:**
 - DIFICULTAD DE TRANSFERIR EL CARACTER ESTUDIADO DE UNA VARIEDAD O CLON A OTRA, SIN RIESGO DE ALTERAR EL RESTO DE CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS.
 - EXCESIVA DURACIÓN Y COMPLEJIDAD DE LOS PROCESOS DE CRUZAMIENTO Y SELECCIÓN.

MANIPULACIÓN DEL ADN Y TRANSFORMACIÓN DE CÉLULAS VEGETALES

MEDIADA: Método Indirecto (Biológico),
basado en un vector natural

- **Agrobacterium**
 - *Agrobacterium tumefaciens*
 - *Agrobacterium rhizogenes*
- **Virus**

DIRECTA:

Química

PEG

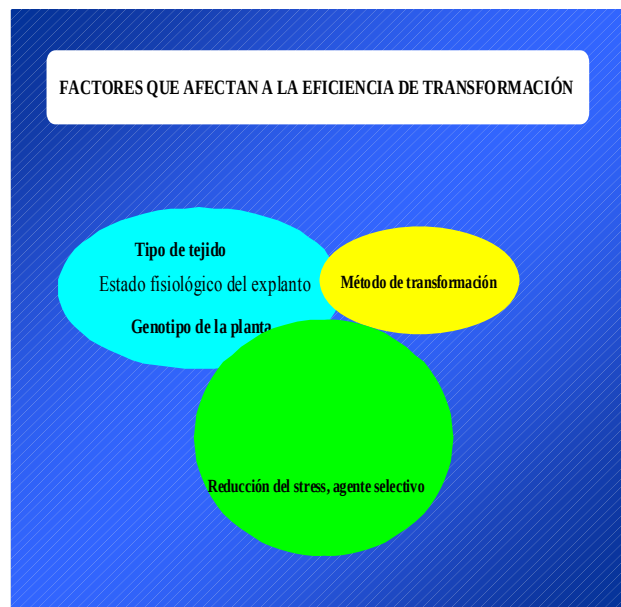
Física

Electroporación

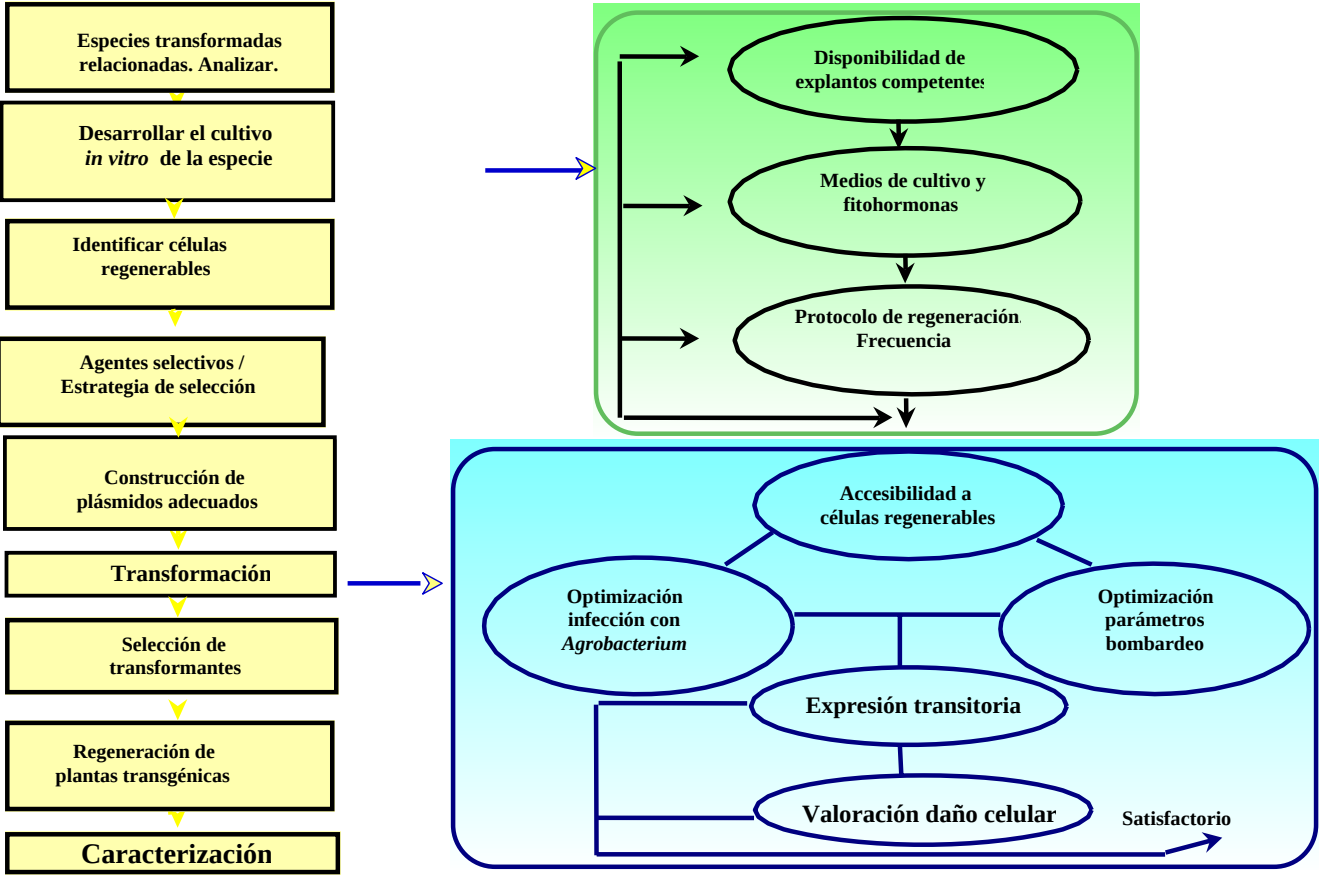
Biobalística

TIPOS DE REQUERIMIENTOS BÁSICOS EN UN PROCESO DE TRANSFORMACIÓN

- **BIOLÓGICOS**
 - Protocolos de Regeneración- Células Competentes
 - Protocolo de Transformación- Células Competentes
 - Protocolo de Selección y Regeneración de Plantas Transformadas
- **PRÁCTICOS**
 - Disponibilidad de material vegetal
 - Protocolo de transformación
 - Simple
 - Eficaz
 - Económico
 - Reproducible
 - Seguro



PASOS EN EL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN



Para valorar la idoneidad del cultivo diana, destacan:

- una elevada tasa de multiplicación, que permita disponer de material de partida en cantidad suficiente y con rapidez.
- una elevada tasa de regeneración de planta, que proporcione una frecuencia de regeneración de individuos transgénicos satisfactoria y favorezca la obtención de múltiples clones transgénicos.
- una simplicidad técnica y un mínimo tiempo en cultivo, con el fin de evitar la variación somaclonal y reducir los costes económicos

Por otra parte, para estimar la validez del sistema de transformación hay que considerar que:

- el método de selección de las células transformadas sea inequívoco.
- el protocolo de transformación sea aplicable a varios genotipos.
- los transformantes no sean quiméricos.
- se den patrones simples de integración de los transgenes, para reducir la probabilidad de interrupciones de genes endógenos por inserción y el silenciamiento génico asociado a la integración de múltiples copias.
- los patrones de expresión sean estables, correspondiéndose con lo esperado en función de las secuencias controladoras de los genes insertados.
- la variación aleatoria para un fenotipo de interés no implique una caracterización extensiva en campo de cada transformante hasta dar con el deseado. De otro modo, el valor de la transformación en la mejora se restringiría a características que no se pudieran obtener mediante mejora convencional
- la sencillez y peligrosidad sean mínimas para el operador, a fin de reducir los riesgos laborales
- Entre los factores citados, el más importante es que existan gran cantidad de células susceptibles de ser transformadas y que éstas mantengan su capacidad regenerativa, pues una elevada tasa de multiplicación no implica necesariamente un número importante de células competentes para la transferencia genética.

Haciendo una planta transgénica

Identificación del gen interés

Esta es una de las etapas limitantes

Conocemos muy poco de los genes específicos que determinan las características vegetales.



Tamaño?

Tolerancia al calor?

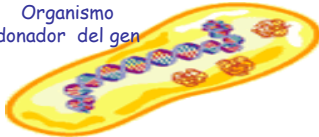
Sabor?

Color?

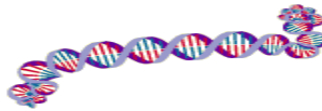


Actualmente se están realizando enormes esfuerzos de secuenciación y compresión de las funciones de los genes, particularmente aquellos de interés agronómico.

Organismo donador del gen



Extracción del DNA



Aislamiento del gen



Modificación del gen

Previas a su introducción en el genoma de la planta

Para asegurar que el gen introducido se exprese en el lugar y tiempo debidos es necesario que se acople a un promotor adecuado.



En ocasiones es conveniente modificar la secuencia del gen para optimizar su expresión.

Principios generales

El código genético es universal, pero los elementos (secuencias) reguladores no.

Cualquier gen podría expresarse, en mayor o menor grado, si tiene:

1. Un promotor adecuado y una señal de terminación.
2. Unas señales de inicio de transcripción y traducción apropiadas.
3. Un código de codones optimizado.

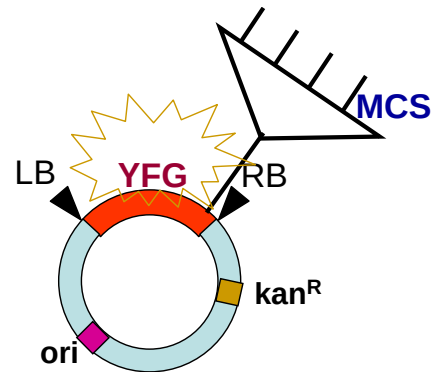


Genes múltiples también se pueden expresar simultáneamente a partir de un constructo, pero su práctica está limitada por:

1. El tamaño del inserto, cuanto mas grande menos eficiente.
2. El tamaño del vector, cuanto mayor sea mas difícil de manipular.

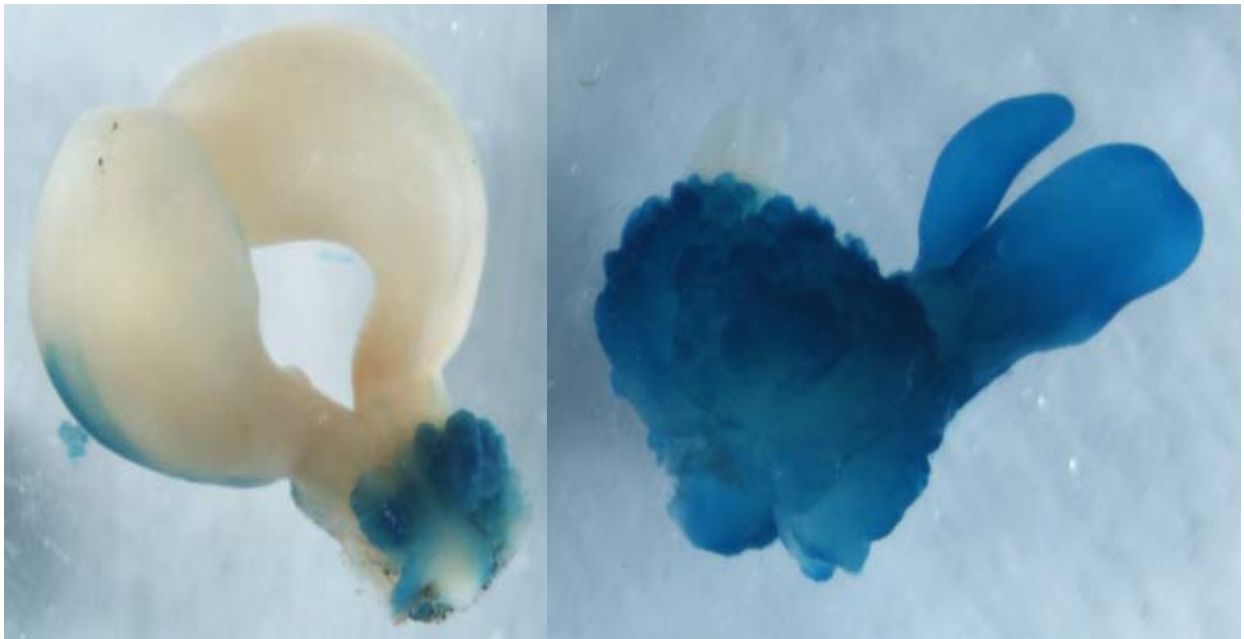
Selección

Solo una pequeña fracción de las células vegetales son transformadas.



Para obtener plantas transgénicas es necesario cultivar en unas condiciones que favorezca la regeneración a partir de las células transformadas, es decir una presión selectiva.

- SELECCIÓN:
 - POSITIVA
 - CONDICIONADA
 - NO CONDICIONADA
 - NEGATIVA



Gen: *b-glucoronidasa*
Sustrato: X-Glu

Transformación indirecta *Agrobacterium-un ingeniero natural*

- Bacterias Gram negativo que se encuentran en el suelo.
- Invaden heridas de diversas plantas e inducen a la planta a producir tumores y moléculas utilizadas por la bacteria.
- *Agrobacterium* es una bacteria patógena para dicotiledóneas y algunas coníferas.
 - • *Agrobacterium tumefaciens* - crown gall disease (tumors)
 - • *Agrobacterium rhizogenes* - hairy root disease (hairy roots)
- Las Monocotiledóneas presentan resistencia natural a *Agrobacterium*.
- *Agrobacterium* es un "ingeniero genético natural"(1983).
- Es un mecanismo de transferencia entre reinos

- **Plásmido Ti o plásmido Ri:**
- Genes de síntesis de opinas: responsables de la síntesis de nuevas opinas.
- Opinas: derivados de aminoácidos o azúcares producidos por tejidos vegetales infectados que son metabolizados por *Agrobacterium* como única fuente de carbono/nitrógeno.
- **Clasificación de los plásmidos Ti y Ri:**
- Plásmidos Ti: plásmidos nopalina
 - • Octopine plasmid
 - • Agropine plasmid
 - • Succinamopine plasmid
- Plásmidos Ri: plásmidos Manopina
 - • Agropine plasmid
 - • Cucumopine plasmid

Genes involucrados en la transferencia del T-DNA

- Secuencias de los bordes: LB y RB

Localizados en cualquier región del plásmido Ti:

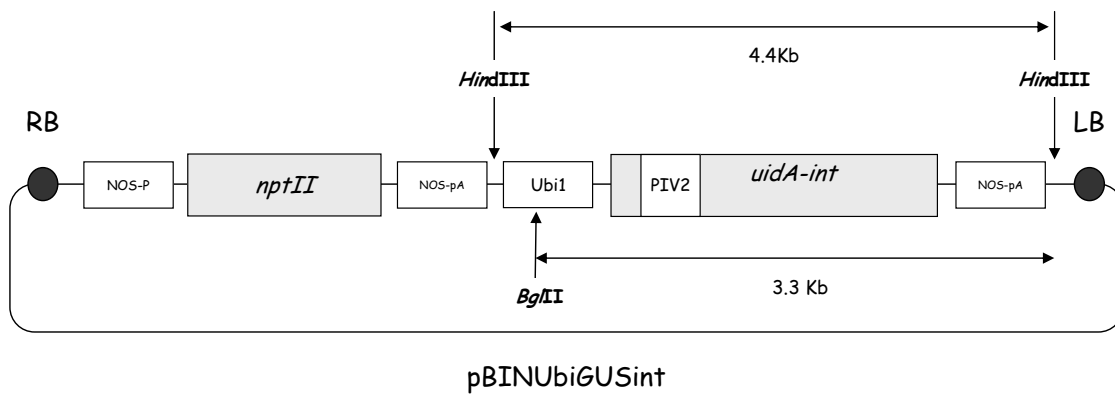
4. Genes de virulencia (A, B, D, G, H / C, E)

Localizados en el cromosoma de *Agrobacterium* (4 loci)

Síntesis de fibrillas de celulosa por *Agrobacterium* para cubrir la superficie de la célula vegetal (irreversible). Clusters de *Agro* son entrampadas en la red de fibrillas de celulosa.

- *chvA* y *chvB* (linked): síntesis y excreción de 1,2-glucan
- *ce*/locus: síntesis de fibrillas de celulosa
- *pscA* locus: afectan la síntesis de cicloglicanos y ácido succinilglicano
- *att* locus: afecta proteínas de la superficie celular

Algunos de estos loci se encuentran conservados en otras bacterias del suelo que se ínter-asocian con plantas

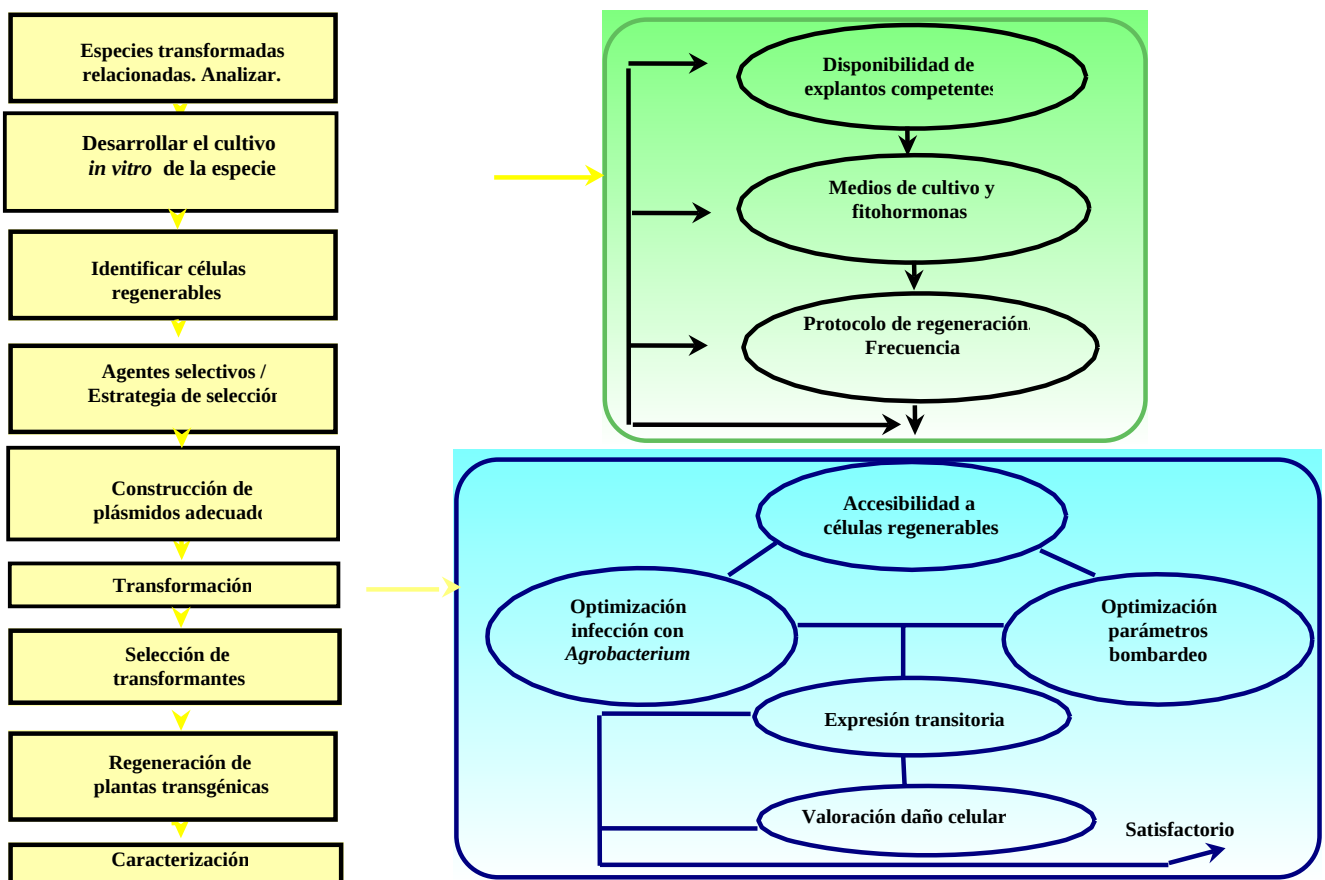


Vectores cointegrados vs. binarios

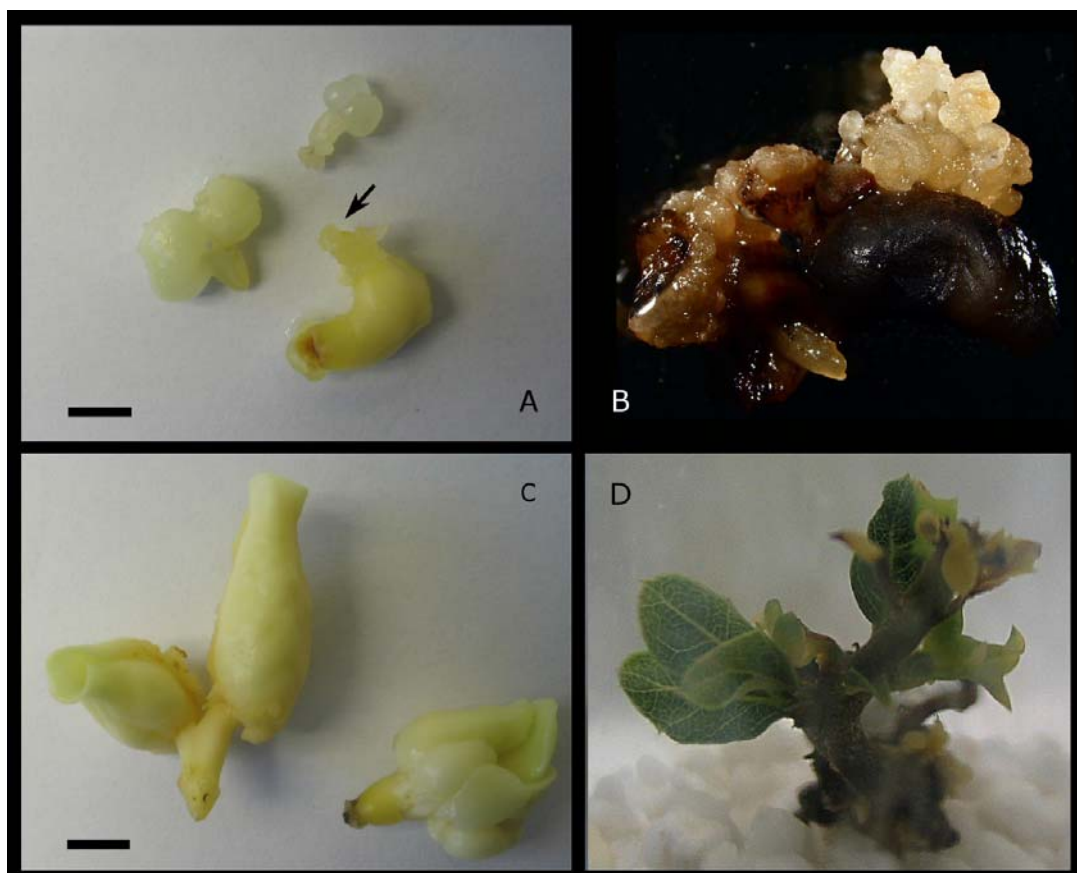
1. Desventajas: Se necesitan amplias regiones de homología entre plasmido Ti y vectores de clonación en *E. coli* plasmids (pBR322).
2. Relativa ineficiencia de transferencia.

1. Desventajas: Depende de la orientación. Plasmidos con dos orígenes de replicación suelen ser inestables en *E. coli*
2. Ventajas: vectores pequeños, mayor eficiencia de transferencia de *E. coli* a *Agrobacterium*. No se necesita recombinación intermolecular.

PASOS EN EL DESARROLLO DE UN SISTEMA DE TRANSFORMACIÓN

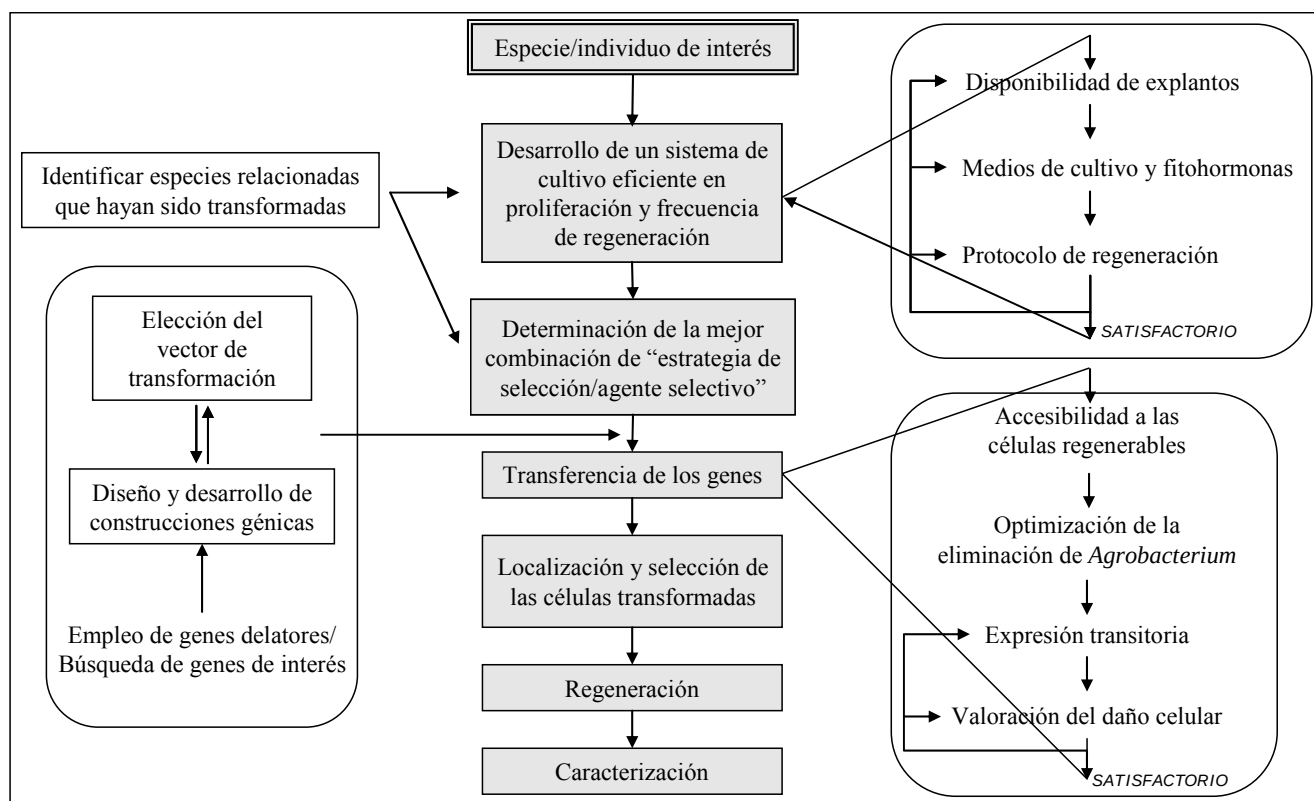


TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DEL ALCORNOQUE (*Quercus suber* L)

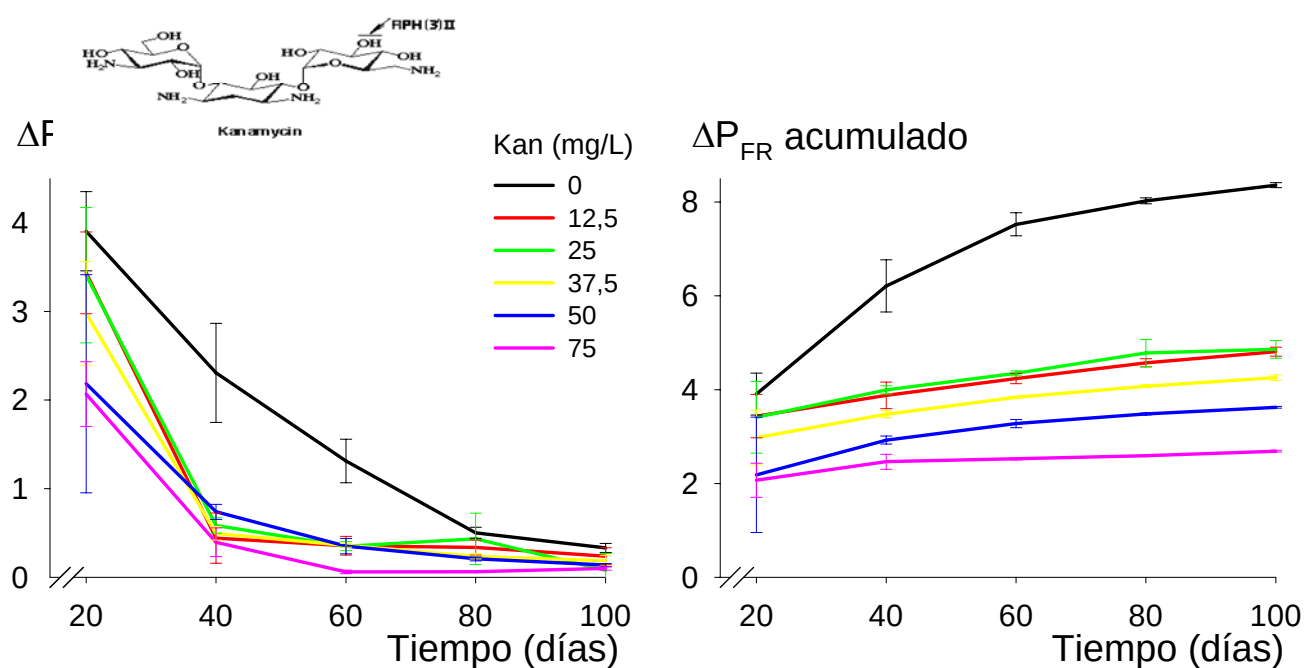


Transformación vía *Agrobacterium*: desafíos:

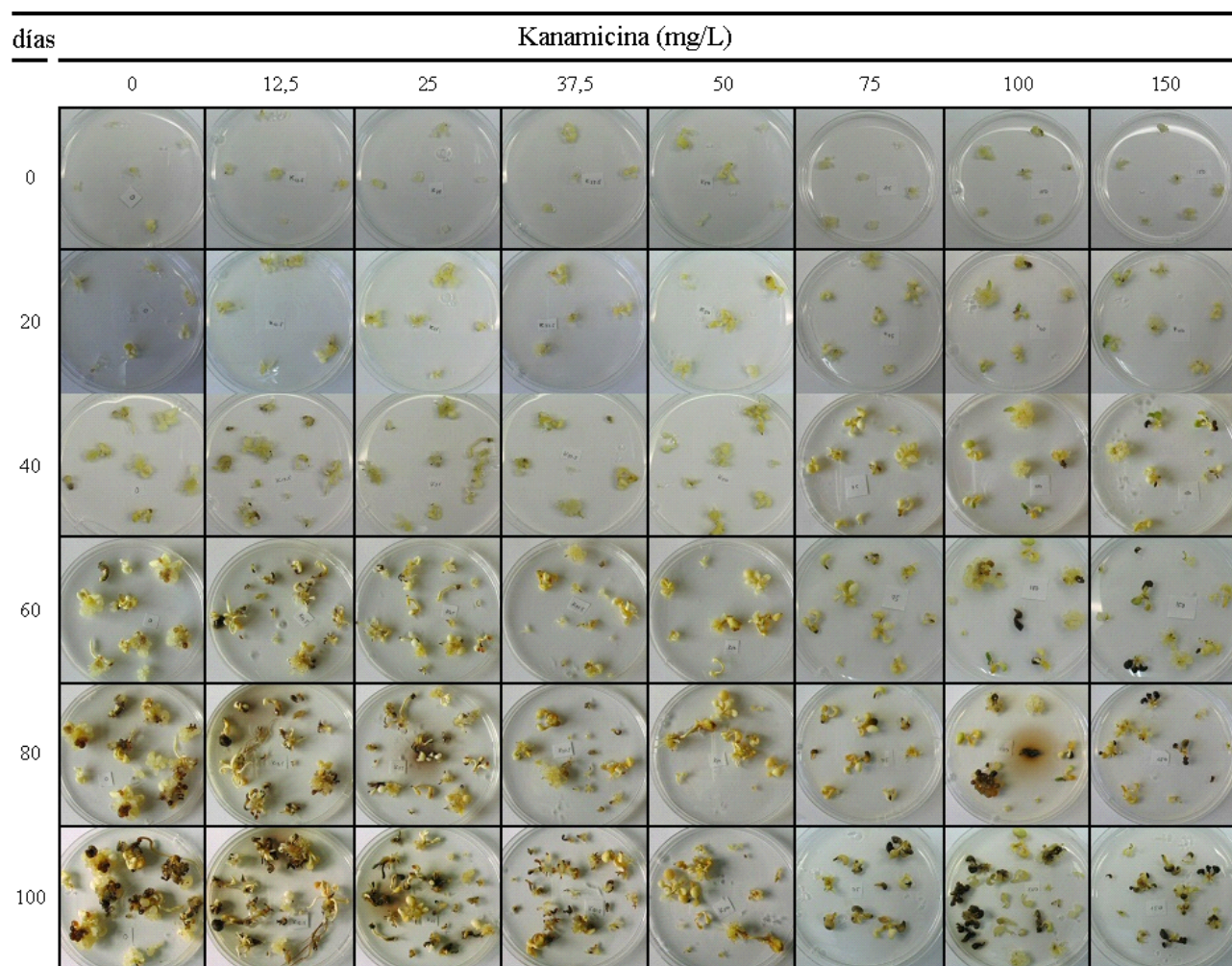
- Uso de *Agrobacterium* para realizar recombinación homóloga o sitio-específica: frecuencia de integración baja.
- Expresión predecible de los transgenes en la planta: efectos de posición, cromatínicos y de integración del ADN-T sobre el silenciamiento génico.
- Modificación del genoma de *Agrobacterium*: alteración del perfil de expresión de acuerdo con distintos hospedadores vegetales.
- Transformación de hongos vegetales y animales mediante *Agrobacterium*: transformación de más especies de hongos.
- Transformación de células animales y humanas mediante *Agrobacterium* posibles usos en terapia génica.



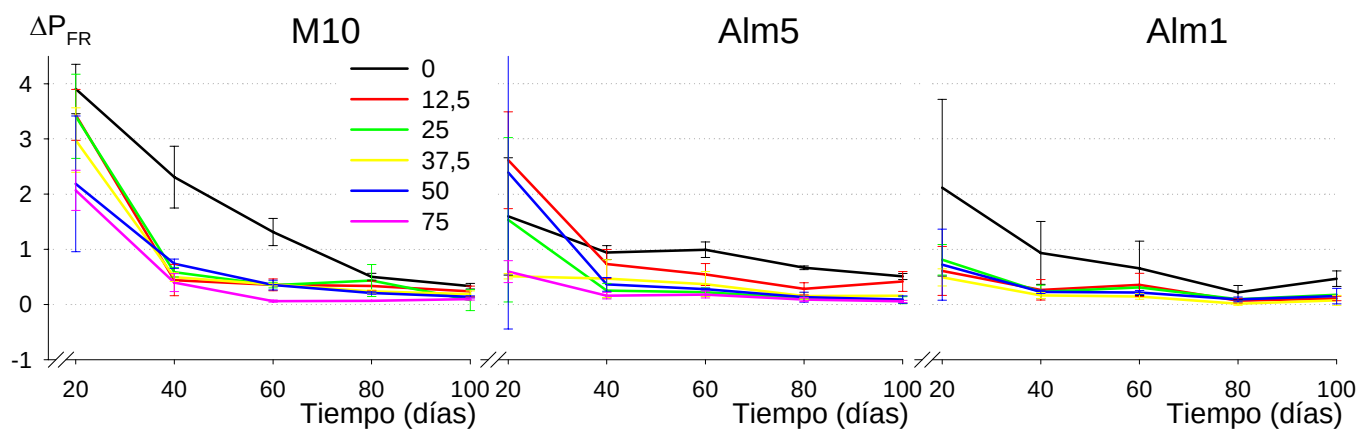
Sensibilidad de los embriones somáticos de la línea M10 a la kanamicina



Se cultivaron tres réplicas de 200-500 mg de agregados embriogénicos, en oscuridad y a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con kanamicina en el rango de 0-75 mg·L⁻¹. Los datos representan los incrementos de peso fresco relativo (ΔPFR , izquierda) y los incrementos de peso fresco relativo acumulado (ΔPFR acumulado, derecha) entre los subcultivos de 20 días.

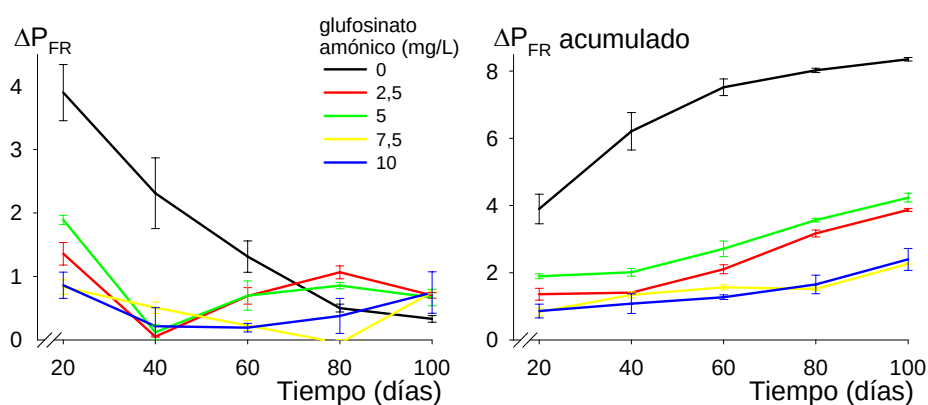


Comparación de la sensibilidad de los embriones somáticos de las líneas M10, Alm5 y Alm1 a la kanamicina

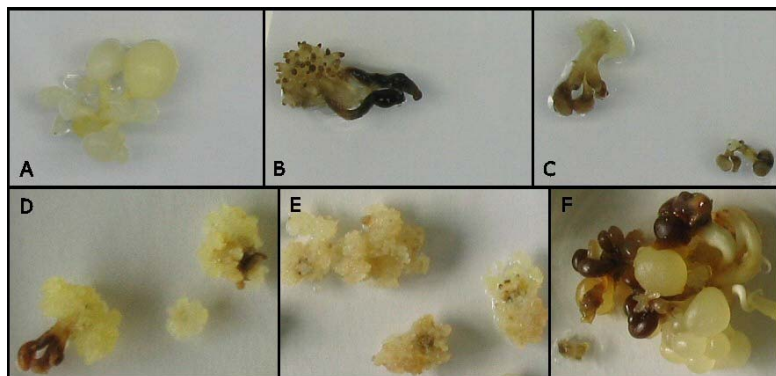


Se cultivaron tres réplicas de 200-500 mg de agregados embriogénicos, en oscuridad y a 25 ± 1 °C, en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con kanamicina en el rango de 0-75 mgL⁻¹. Los datos representan los incrementos de peso fresco relativo (ΔPFR) entre los subcultivos de 20 días en tres líneas embriogénicas de *Q. suber* (M10, Alm5 y Alm1).

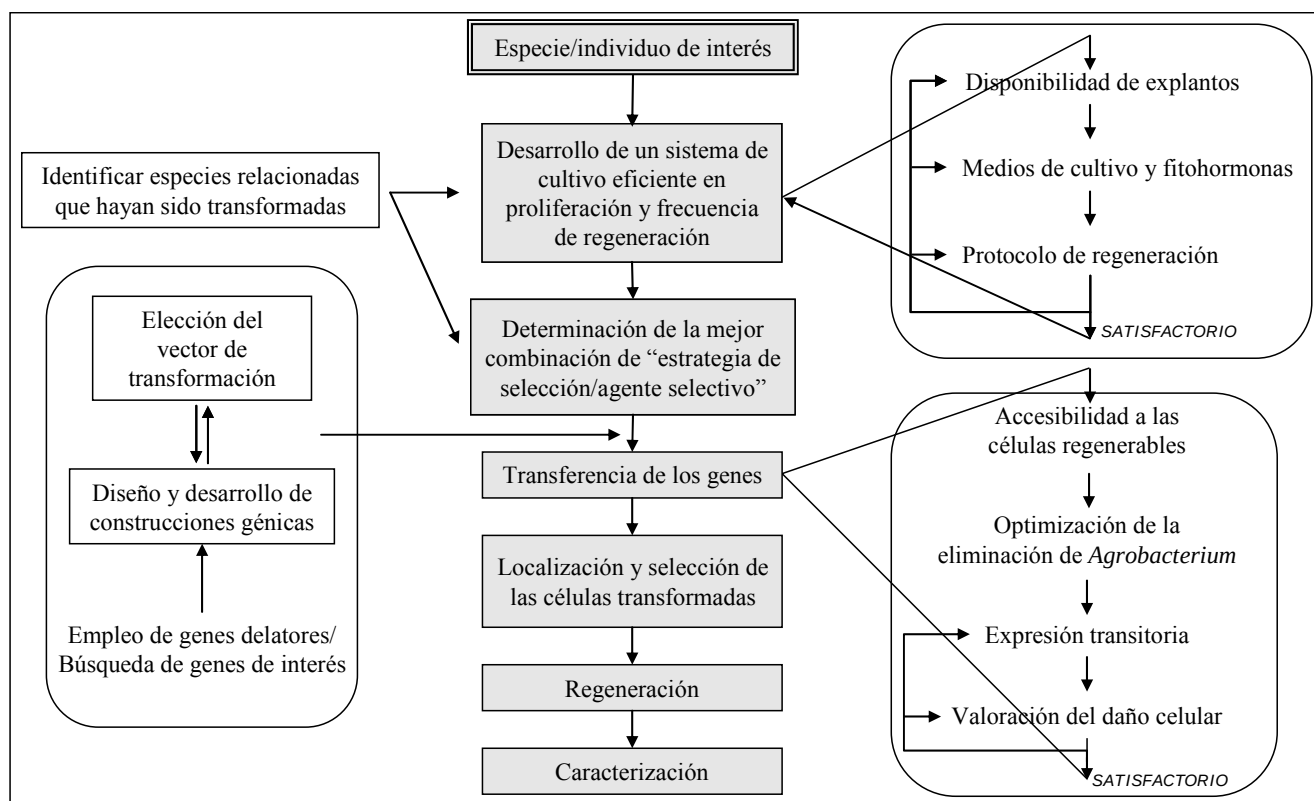
Sensibilidad de los embriones somáticos de la línea M10 al Finale®



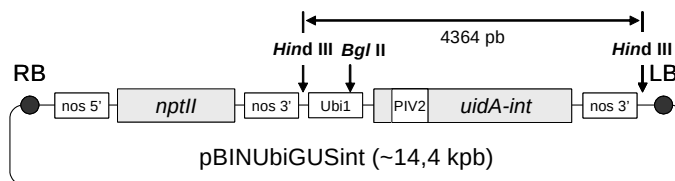
Se cultivaron tres réplicas de 200-500 mg de agregados embriogénicos, en oscuridad y a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con Finale® (forma comercial del herbicida glufosinato amónico), utilizando de 0 a $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de principio activo. Los datos representan los incrementos de peso fresco relativo (ΔP_{FR} , izquierda) y los incrementos de peso fresco relativo acumulado (ΔP_{FR} acumulado, derecha) entre los subcultivos de 20 días.



Los embriones y agregados embriogénicos se cultivaron en oscuridad y a $25 \pm 1^\circ\text{C}$, en placas Petri con 10 mL de medio sólido MSSH con Finale® (forma comercial del herbicida glufosinato amónico), utilizando de 0 a $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ de principio activo. A, B, C, D y E, fotografías tomadas los días 0, 20, 40, 60 y 80, contando desde el inicio del experimento; F, control sin Finale® a los 80 días de cultivo.

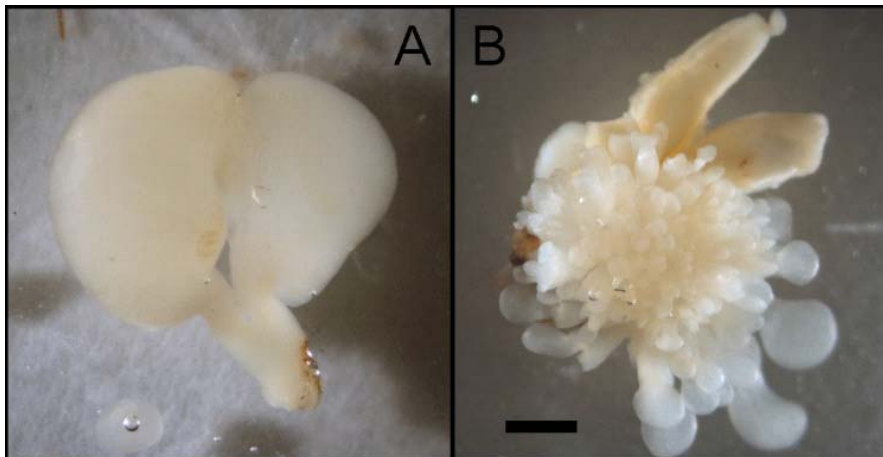


Estructura y mapa de restricción simplificado del plásmido binario pBINUbiGUSint (Humara *et al.* 1999)



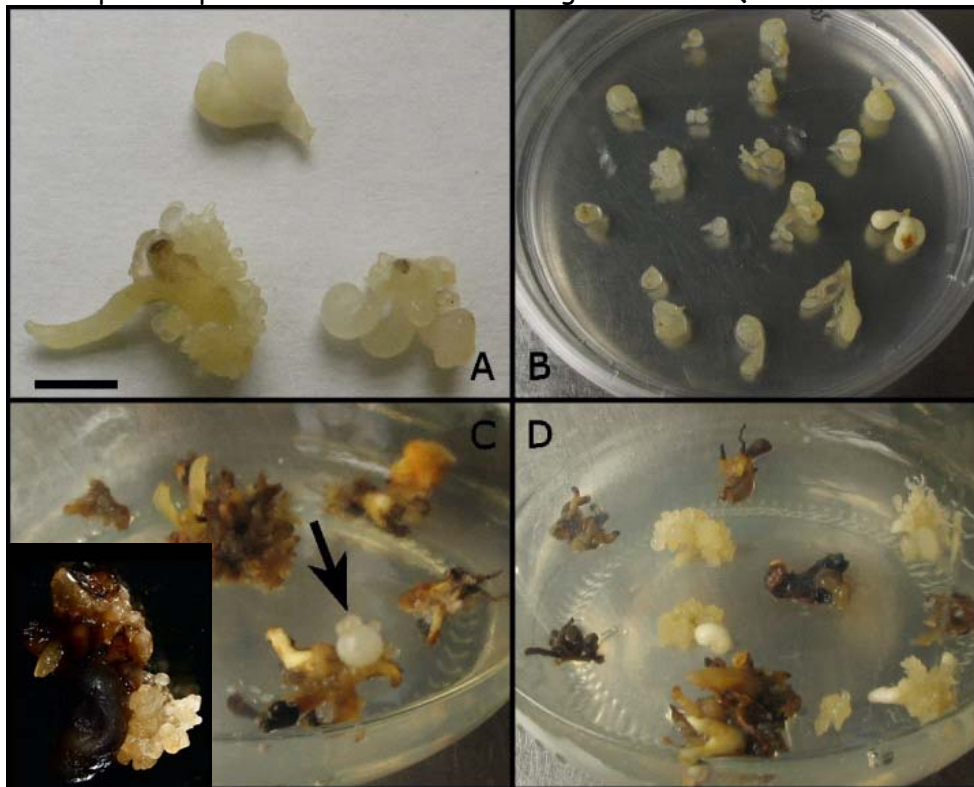
RB y LB, bordes derecho e izquierdo, respectivamente, del ADN-T; *nos 5'*, promotor de la nopalina sintasa; *nptII*, gen de la neomicina fosfotransferasa II; *nos 3'*, terminador de la nopalina sintasa; *Ubi1*, promotor de la poliubiquitina de maíz; *uidA-int*, gen de la β-glucuronidasa de *Escherichia coli* con el intrón PIV2 de patata. En el esquema se señalan los puntos de corte de las enzimas de restricción *Hind III* y *Bgl II*.

Explantos empleados en la transformación genética



A, embrión somático aislado; B, agregado embriogénico (barra, 1mm para ambas imágenes).

Etapas del proceso de transformación genética de *Q. suber*



Los explantos, embriones aislados y agregados embriogénicos (A; barra, 4 mm), se inocularon con la cepa de *A. tumefaciens* AGL1 pBINubiGUSint ($DO_{600} = 0,5$) durante 20 min a 25 °C. El cocultivo, de dos días, se realizó en placa Petri a 25 °C y en oscuridad (B). Después de unos 2-3 meses subcultivándose en medio selectivo (500 mg·L⁻¹ cefotaxima + 100 mg·L⁻¹ kanamicina) se detectaron embriones secundarios putativamente transgénicos (C, flecha), que se mantuvieron en medio selectivo durante dos subcultivos más (D), antes de aislarlos como líneas independientes. Las líneas putativamente transgénicas se subcultivaron durante un mínimo de cuatro meses más en presencia de kanamicina, pero sin cefotaxima, antes de realizar los ensayos histoquímicos y moleculares.

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

Cepa desarmada	Cepa silvestre	Cromosoma bacteriano	Tipo de opina	pTi	Resist. cromos.	Resist. pTi	Ref.
AGL1	A281	C58	L-L-succinamopina nopalina	pTiBo542ΔT	<i>rif, carb</i>	—	Lazo <i>et al.</i> (1991)
EHA 105	A281	C58	L-L-succinamopina agropina	pTiBo542ΔT'	<i>rif</i>	—	Hood <i>et al.</i> (1993)
LBA 4404	Ach5	Ach5	octopina	pAL4404	<i>rif</i>	<i>spec, strep</i>	Ooms <i>et al.</i> (1981)

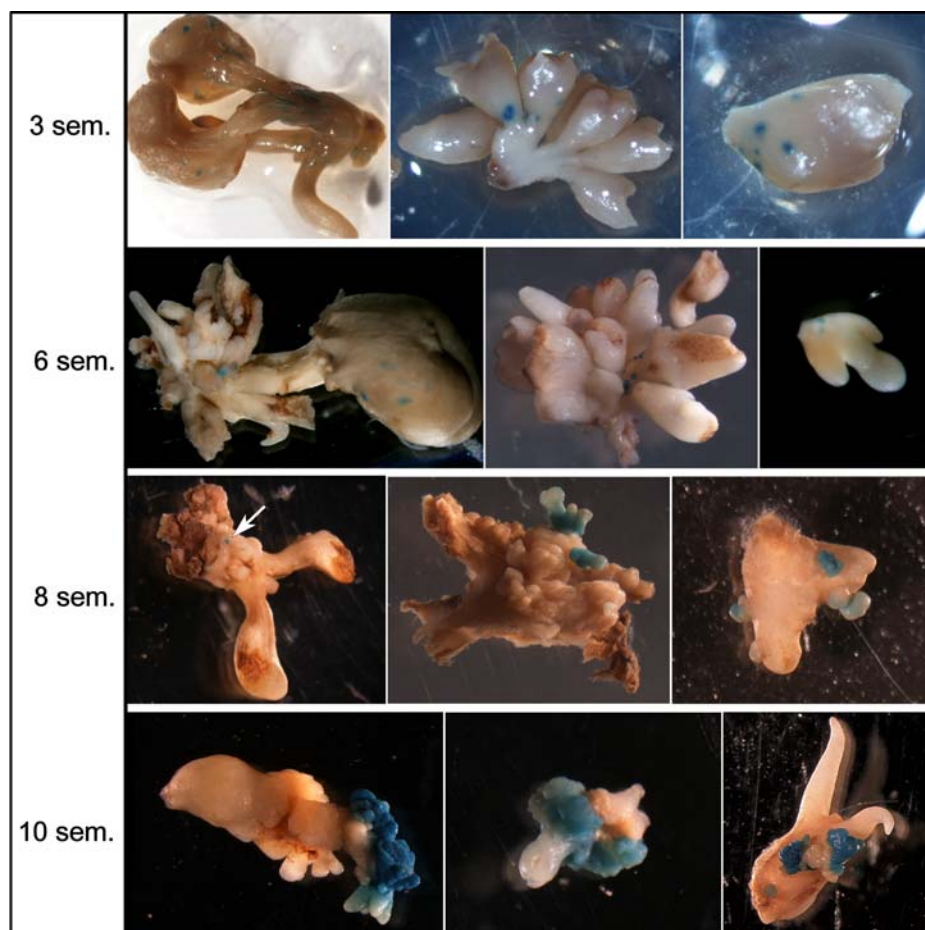
Rif, rifampicina; *carb*, carbenicilina; *spec*, espectinomycin; *strep*, estreptomicina. Los plásmidos Ti de AGL1 y EHA105 son resultado de delecciones diferentes del ADN-T

EHA105 ineficaz

LBA4404 0,6 %

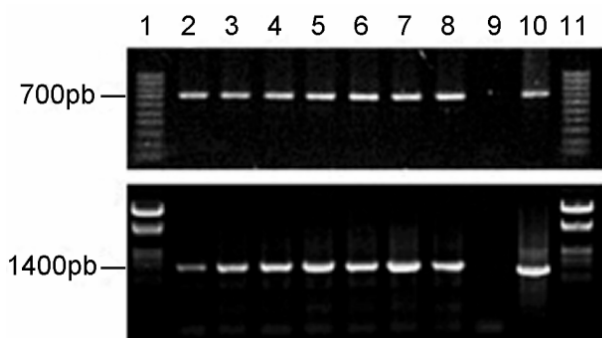
AGL1 4 %

Desarrollo de las células transgénicas a lo largo del proceso de selección

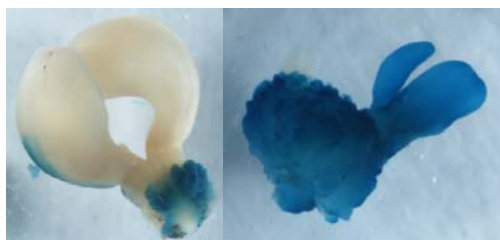


Se inocularon con *A. tumefaciens* AGL1 pBINUbiGUSint ($DO_{600} = 0,5$) agregados embriogénicos y embriones somáticos aislados de *Q. suber* durante 20 min a 25 °C, que se cocultivaron en oscuridad a 25 °C durante dos días antes de transferirlos a medio de cultivo selectivo. A las 3, 6, 8 y 10 semanas del momento de la inoculación se realizó un ensayo histoquímico que sirvió para determinar el estado de desarrollo de las células transformadas con el gen *uidA*. Puede observarse que, aunque aparecen eventos de transformación en los cotiledones, los puntos GUS se localizan preferentemente en la zona del ápice radicular de los embriones. La aparición de embriones secundarios se da a las 8 semanas, coincidiendo con las descripciones de Puigderrajols *et al.* (1996), y sugiriendo que ni la kanamicina, ni las células no transformadas, afectan sensiblemente al crecimiento de las células transformadas; cabe destacar que algunas células transformadas no parecen continuar con su desarrollo (8 semanas, flecha), lo que sugiere que *Agrobacterium* podría no tener una preferencia exclusiva por las células meristemáticas, suposición apoyada por el hecho de que en los cotiledones también aparecen eventos de transformación que no dan lugar a embriones secundarios. Finalmente, puede observarse también que las quimeras son un fenómeno frecuente en los primeros estadios de la selección (8 y 10 semanas), aunque tras un período de varios meses de subcultivos con kanamicina puedan obtenerse embriones homogéneos (no mostrado en esta imagen).

Detección de los genes *nptII* (700 pb) y *uidA* (1400 pb) mediante PCR

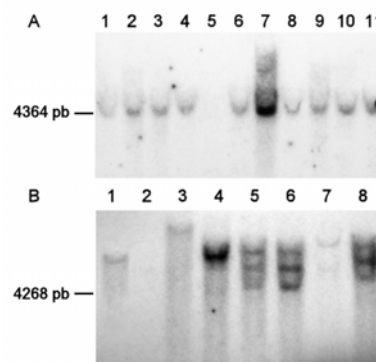
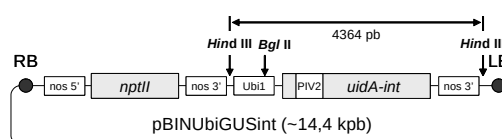


Geles de agarosa al 0,7 % con los productos de PCR de los genes *nptII* (arriba) y *uidA* (abajo). Calles: 1, 11, marcadores de peso molecular [PCR 100-bp low-molecular-weight ladder (Sigma) —arriba—, lambda DNA/*EcoRI*+*Hin* dIII (Promega) —abajo—]; 2-7, clones resistentes a kanamicina obtenidos tras la inoculación con *A. tumefaciens* AGL1 pBINubiGUSint; 8, clon resistente a kanamicina obtenido tras la inoculación con *A. tumefaciens* LBA4404 pBINubiGUSint; 9, clon no inoculado; 10, plásmido pBINubiGUSint.



Agregados embriogénicos y embriones somáticos aislados de *Q. suber* que se inocularon con *A. tumefaciens* AGL1 pBINubiGUSint (DO_{600}) durante 20 min a 25 °C, y se cocultivaron en oscuridad a 25 °C durante dos días antes de transferirlos a medio de cultivo selectivo (500 mg·L⁻¹ cefotaxima + 100 mg·L⁻¹ kanamicina). Los embriones secundarios resistentes a kanamicina se siguieron subcultivando en presencia del antibiótico, y la expresión de β -glucuronidasa (*GUS*) se ensayó en una muestra de cada línea embriogénica. Imagen A, explantos subcultivados durante cuatro meses en presencia de kanamicina, que presentan diferentes niveles de expresión *GUS*, junto con un explanto no transgénico —barra, 1mm—; B, detalle de un embrión probablemente quimérico analizado tras un mes en presencia de kanamicina

Análisis de Southern de los clones de alcornoque transformados



Los ADN de varios clones cuyo carácter transgénico (*uidA*) se había analizado mediante PCR se digirieron con *Hin* dIII (a) o *Bgl* II (b) y se hibridaron con una sonda marcada radiativamente [³²P]. La sonda se preparó a partir de un fragmento del plásmido pBINubiGUSint que contenía el gen *uidA*, obtenido con *Hin* dIII (a) o *Hin* dIII-*Bgl* II (b). En A, se indica el peso molecular en referencia al tamaño de la banda del control positivo; en B, se indica en referencia a un marcador de peso molecular lambda DNA/*EcoRI*+*Hin* dIII no marcado radiativamente.

a. Calles: 1-4, 6, 8-11, ADN de clones transformados de alcornoque; 5, clon no transformado; 7, patata *uidA* (control positivo). El mismo tamaño de todas las bandas confirma que los clones contienen íntegra la construcción *Ubi1-uidA-nos3'*.

b. Calles: 3-8, clones transformados de alcornoque; 2, clon no transformado; 1, patata *uidA* (control positivo). Puede observarse un número de inserciones variable entre clones. Los clones de las calles 3, 4, 7 y 8 se obtuvieron de explantos independientes; en cambio, los clones de las calles 5 y 6 surgieron del mismo explanto y se establecieron por separado como líneas independientes, pero su idéntico patrón de hibridación sugiere que se originaron probablemente en el mismo evento de transformación.

Efecto del tiempo de cocultivo y la densidad de inóculo bacteriano

Cocultivo (días)	Densidad de inóculo (DO ₆₀₀)		
	0,25	0,5	1
2	20,8 ± 16,92 b	16,7 ± 8,4 bc	27,0 ± 31,4 a
3	14,3 ± 13,7 bc	11,4 ± 13,6 c	15,4 ± 8,1 bc

Los datos representan la media y el error estándar del porcentaje de tres ensayos (n = 666) de explantos inoculados que produjeron líneas resistentes a kanamicina (100 mg·L⁻¹) tras 4 meses de cultivo en su presencia. Los agregados embriogénicos y embriones aislados se inocularon con *A. tumefaciens* AGL1 pBINUbiGUSint (OD₆₀₀ = 0,5) durante 20 min a 25 °C, y se cocultivaron con la bacteria en oscuridad durante 2 días a 25 °C. Distinta letra acompañando a cada valor indica que se hallaron diferencias estadísticas (p < 0,05) tras analizar los datos dos a dos con un test X².

Efecto de la temperatura durante el cocultivo

Temperatura (°C)	IG	GE
22	41,4 ± 10,8	6,4 ± 5,2
24	33,3 ± 13,5	2,4 ± 1,6
26	30,0 ± 5,7	1,3 ± 0,8

Los datos representan la media y el error estándar de tres ensayos (n = 186). Los agregados embriogénicos y embriones aislados se inocularon con *A. tumefaciens* AGL1 pBINUbiGUSint (DO₆₀₀ = 0,5) durante 20 min a 25 °C y se cocultivaron en oscuridad durante dos días a tres temperaturas diferentes: 22, 24 y 26 °C. Tres semanas después de la inoculación se realizó una prueba GUS, anotándose el porcentaje de explantos inoculados que presentaban puntos GUS (IG) y el número de puntos GUS por cada explanto GUS+ (GE). No se obtuvieron diferencias significativas tras aplicar un test ANOVA (p > 0,05). A los datos porcentuales se les realizó una transformación angular para ajustarlos a una distribución normal.

Efecto del tipo de explanto inoculado

Explanto	kanR (%)	GUS+ (%)
agregado	27,5 ± 29,7 a	87,1 ± 10,0 c
embrión	3,3 ± 2,6 b	87,5 ± 17,7 c

Los datos representan la media y el error estándar de dos ensayos (n = 300). Cada tipo de explanto (i.e. agregados embriogénicos y embriones aislados) se inoculó con *A. tumefaciens* AGL1 pBINUbiGUSint (DO₆₀₀ = 0,5) durante 20 min a 25 °C y se realizó un cocultivo en oscuridad durante 2 días a 25 °C. Al final del experimento (4 meses de cultivo en presencia de 100 mg·L⁻¹ de kanamicina) se anotó el porcentaje de embriones inoculados que produjeron líneas resistentes a kanamicina (kanR), en las que seguidamente se analizó la actividad β-glucuronidasa (GUS+). Distinta letra acompañando a cada valor indica que se hallaron diferencias estadísticas en un test de X² (p < 0,001).

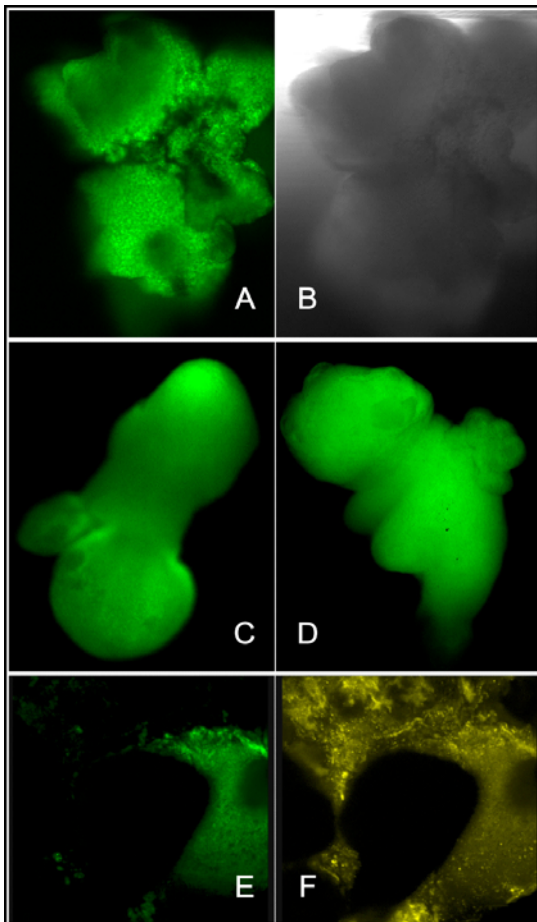
Efecto de la luz durante el cocultivo

Tratamientos	kanR (%)	GUS+ (%)
luz	7,4±2,8ab	88,9±3,6c
fotoperíodo	11,6± 3,8 a	100,0±0,0c
oscuridad	5,4± 3,5 b	100,0±0,0c

Efecto del momento de recolección de los explantos

Réplica	«Edad» de los explantos					
	20 d		27 d		34 d	
	IG	GE	IG	GE	IG	GE
1	29,6	7,5	31,6	4,5	47,8	5,0
2	64,7	9,5	28,6	4,0	6,9	1,0
3	47,1	8,8	27,8	6,6	4,8	2,0
total	47,1 ± 2,4a	8,6 ± 0,7	29,3 ± ,4ab	5,0 ± 1,0	19,8 ± 7,2b	2,7 ± 1,5

Los datos representan la media y el error estándar de tres ensayos (n = 192). Se recolectaron embriones aislados y agregados embriogénicos 20, 27 y 34 días después del subcultivo a medio fresco, que se inocularon con *A. tumefaciens* AGL1 pBINubiGUSint (DO₆₀₀ = 0,5) durante 20 min a 25 °C y se cocultivaron en oscuridad durante dos días a 25 °C. A las tres semanas se realizó una prueba GUS de los explantos, anotándose el porcentaje de explantos inoculados que presentaban puntos GUS (IG) y el número de puntos GUS por cada explanto GUS+ (GE). Distinta letra indica que los valores fueron significativamente diferentes en un test χ^2 (p < 0,05, aplicado a IG). No se encontraron diferencias entre los GE en un test de Kruskal-Wallis.



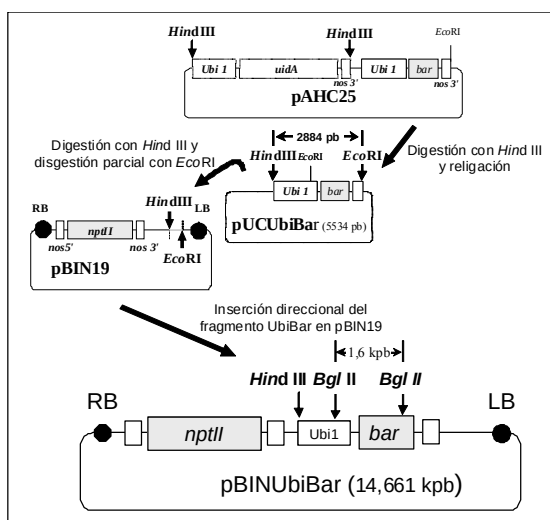
Detección de la fluorescencia de sGFP

Se inocularon agregados embriogénicos y embriones somáticos aislados con *A. tumefaciens* AGL1 pBIN19-sGFP (DO600 = 0,5) durante 20 min a 25 °C, que se cocultivaron en oscuridad a 25 °C durante dos días antes de transferirlos a medio de cultivo selectivo (500 mg·L⁻¹ cefotaxima + 100 mg·L⁻¹ kanamicina). Unos 2-3 meses después comenzaron a aparecer embriones secundarios resistentes a kanamicina, que se siguieron subcultivando en presencia del antibiótico durante dos meses más. Al cabo de este tiempo se analizó la expresión de GFP en una muestra de cada línea embriogénica, mediante detección de fluorescencia.

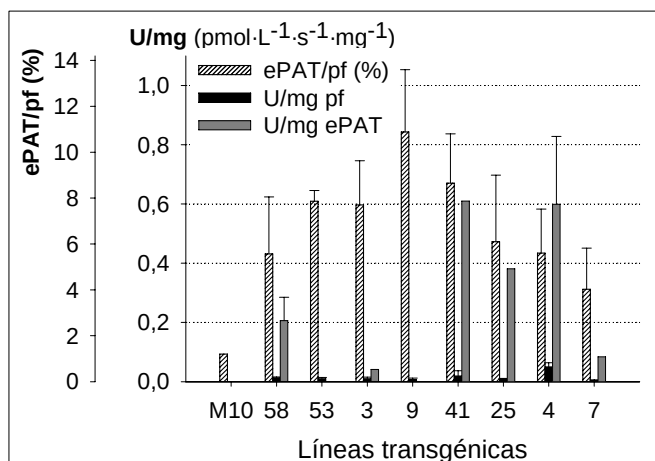
Las fotografías fueron tomadas unos 5 meses después de la inoculación de los explantos. Arriba, imagen confocal de fluorescencia (A) e imagen de transmisión (B) de un mismo agregado embriogénico. Centro, imágenes tomadas con un microscopio de fluorescencia de un embrión en estado cotiledonar (C) y de un agregado embriogénico (D). Abajo, imágenes confocales de fluorescencia GFP (E) y de autofluorescencia (F) que revelan la presencia de tejidos no transgénicos (zonas que no presentan fluorescencia en E pero sí en F) y, por lo tanto, que la muestra analizada es quimérica



Expresión de PAT en las líneas transgénicas

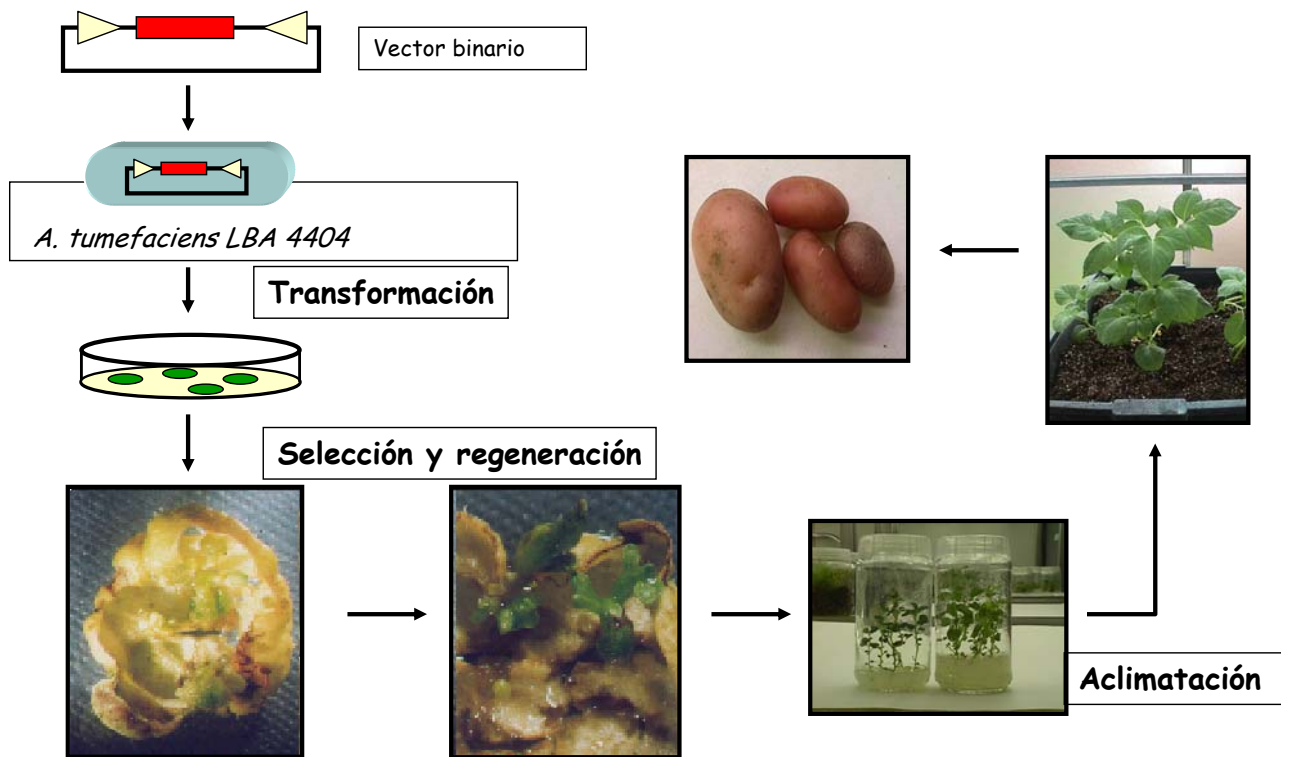


Esquema de la construcción del plásmido binario pBINUbiBar. Las secuencias de interés (marcadas en línea continua) se extrajeron del plásmido pAHC25 y se insertaron direccionalmente en el pBIN19. *Ubi1*, promotor de la poliubiquitina de maíz; *uidA*, gen de la β -glucuronidasa de *Escherichia coli*; *bar*, gen de la fosfinotricina acetiltransferasa de *Streptomyces hygroscopicus*; *nos5'*, promotor de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; *nos3'*, terminador de la nopalina sintasa de *A. tumefaciens*; *nptII*, gen de la neomicina fosfotransferasa de *E. coli*; RB, LB, bordes derecho e izquierdo, respectivamente, del ADN-T.

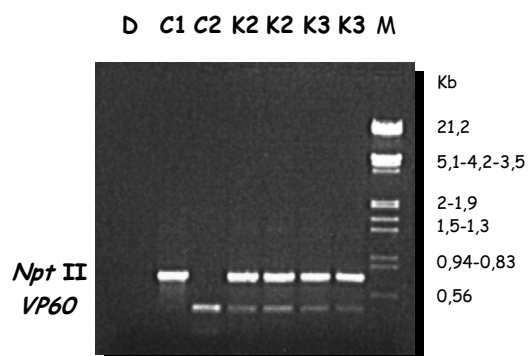
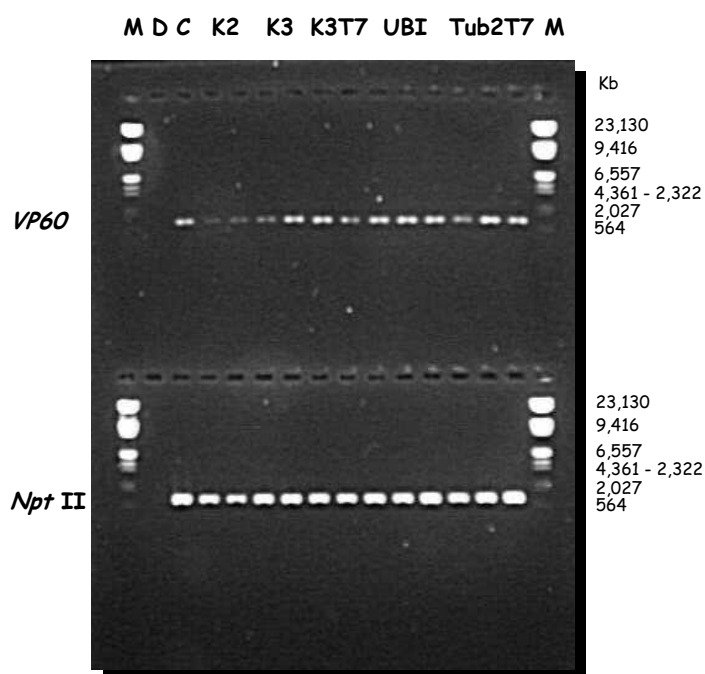


Mediante una precipitación diferencial (30-60 %) en sulfato amónico se realizó un enriquecimiento en fosfinotricina acetiltransferasa (PAT) del extracto proteico extraído de ocho clones transgénicos *bar* (58, 53, 3, 9, 41, 25, 4 y 7) y una muestra de embriones no inoculados de la línea M10. La actividad PAT se determinó mediante un ensayo enzimático y se calcularon las unidades enzimáticas: U/mg pf (unidades por mg de peso fresco) y U/mg ePAT (unidades por mg de proteína determinada en el extracto enriquecido), normalizadas ambas con respecto a la actividad detectada en el control. Asimismo, se calculó el porcentaje relativo de extracto enriquecido obtenido a partir del peso fresco inicial (ePAT/pf), con el fin de tener una idea aproximada del nivel de expresión de PAT en las muestras.

Obtención de plantas transgénicas de patata



Detección de los genes *VP60* y *Npt II* mediante PCR



D. - Planta control sin transformar

C. - Control

K2. - Plantas transgénicas pK2-VP60

K3. - Plantas transgénicas pK3-VP60

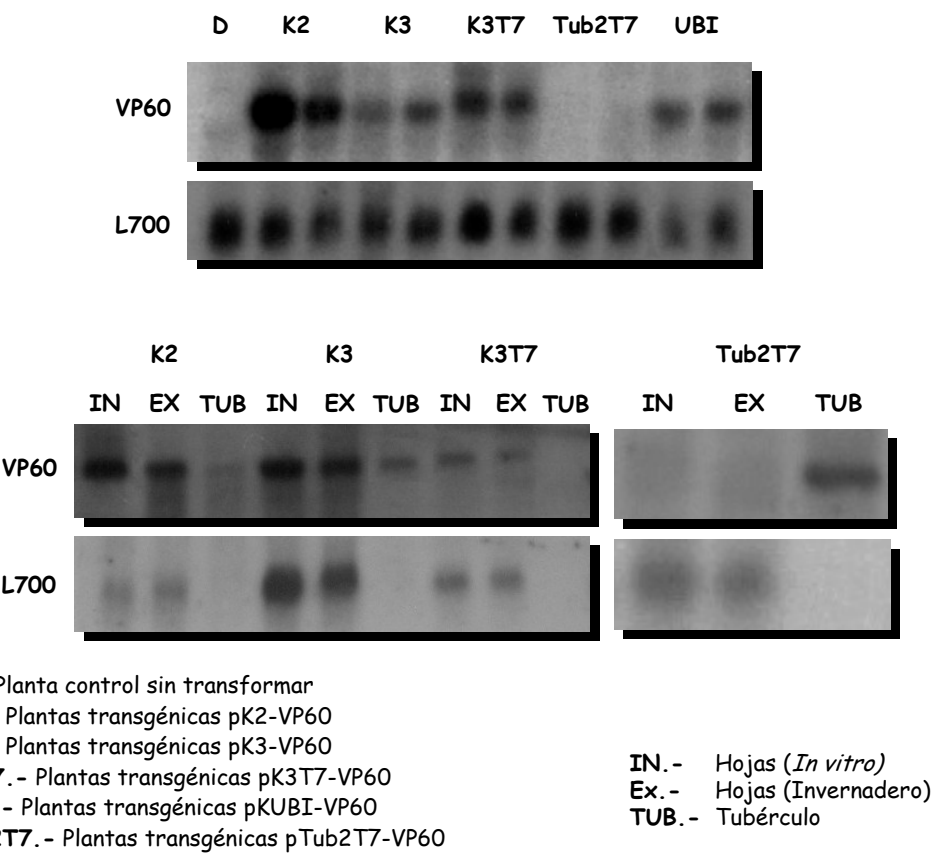
K3T7. - Plantas transgénicas pK3T7-VP60

UBI. - Plantas transgénicas pKUBI-VP60

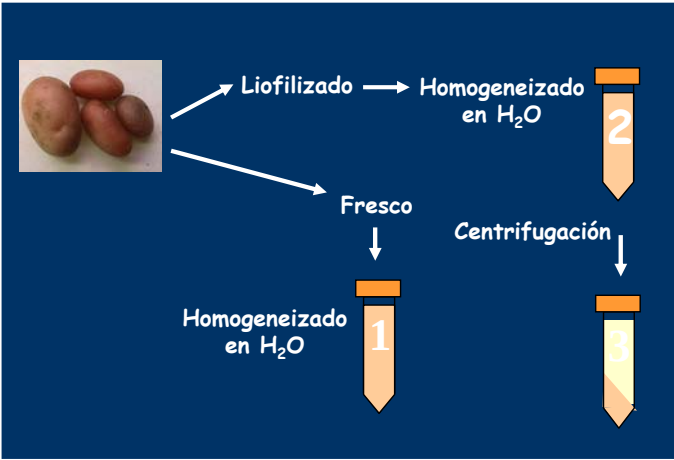
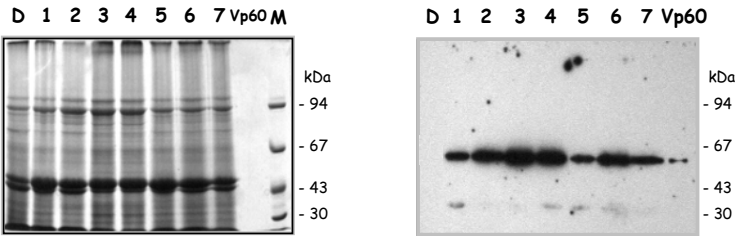
Tub2T7. - Plantas transgénicas pTub2T7-VP60

M. - Marcadores de ADN de tamaño conocido.

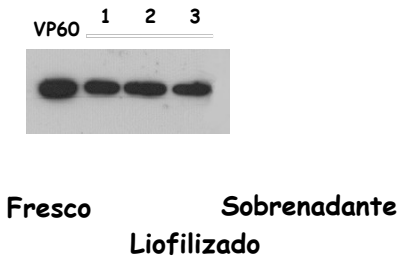
Transcripción del gen *VP60*



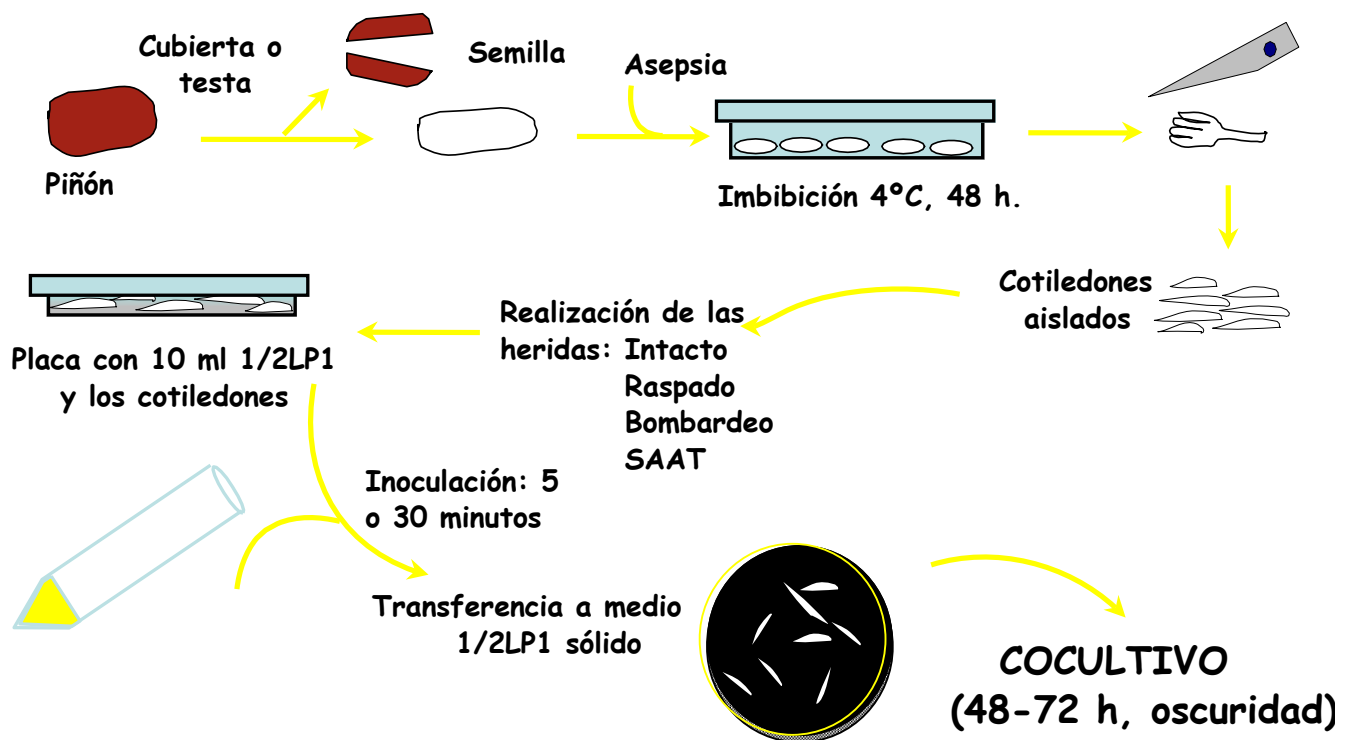
Niveles del antígeno VP60 en los tubérculos



Cuantificación de la proteína VP60 en extractos de tubérculos frescos y liofilizados



Protocolo general de infección de cotiledones de *Pinus pinea* con cepas desarmadas de *Agrobacterium tumefaciens*



EFFECT OF DIFFERENT DISARMED STRAINS OF *A. TUMEFACIENS*
HARBOURING THE PLASMID p35SGUSint ON UIDA EXPRESSION IN *P. PINEA*
COTYLEDONS



<i>Agrobacterium tumefaciens</i> strain	GUS positive cotyledons (%)	Mean $\pm$ SE number of GUS foci/cotyledon	% Cotyledons forming buds
EHA105	5.1 a	2.05 $\pm$ 0.73a	42.5 ab
LBA4404	0.4 b	1 $\pm$ 0.33 b	48 a
C58	0.4 b	1 $\pm$ 0.33 b	31 b
Control	0 c	0 c	86.5 c

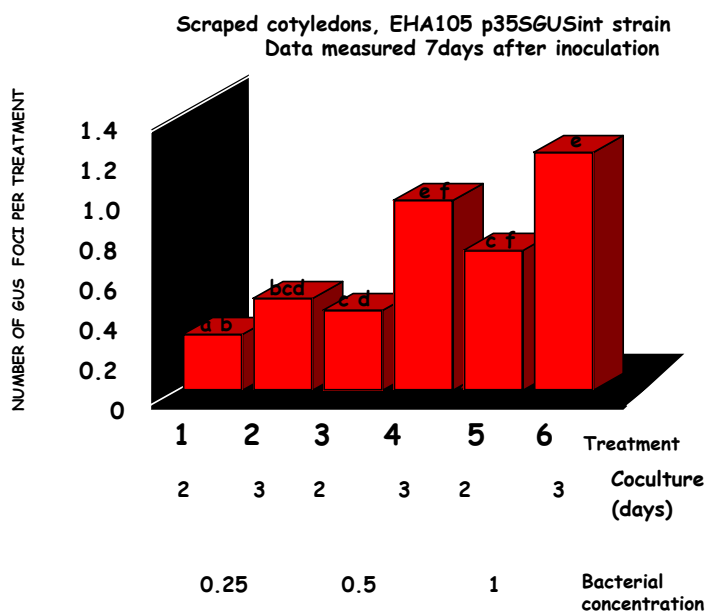
GUS activity and percentage of cotyledons forming buds were quantified 7 and 30 days after inoculation respectively. Data presented as mean number of at least 4 different experiments $\pm$ SE. In each column, values with different letters are significantly different (P $\neq$ 0.05).

EFFECTO DEL TIEMPO DE COCULTIVO

Tiempo de cocultivo (h)	Explantos que expresan GUS tras 7 días de cultivo (%)	Explantos que expresan GUS tras 19 días de cultivo (%)	Supervivencia tras 21 días de cultivo (%)
72	15,5 a	34 a	23,6 a
96	8,7 a,b	14,3 b	17,9 a
132	4,6 b	13,9 b	17,9 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

EFFECT OF BACTERIAL DENSITY AND COCULTURE TIME ON *A. TUMEFACIENS*-MEDIATED *UIDA* GENE TRANSFER EFFICIENCY IN *P. PINEA* COTYLEDONS



Data presented as mean number of at least 4 different experiments. Values with different letters are significantly different ($P \neq 0.05$).

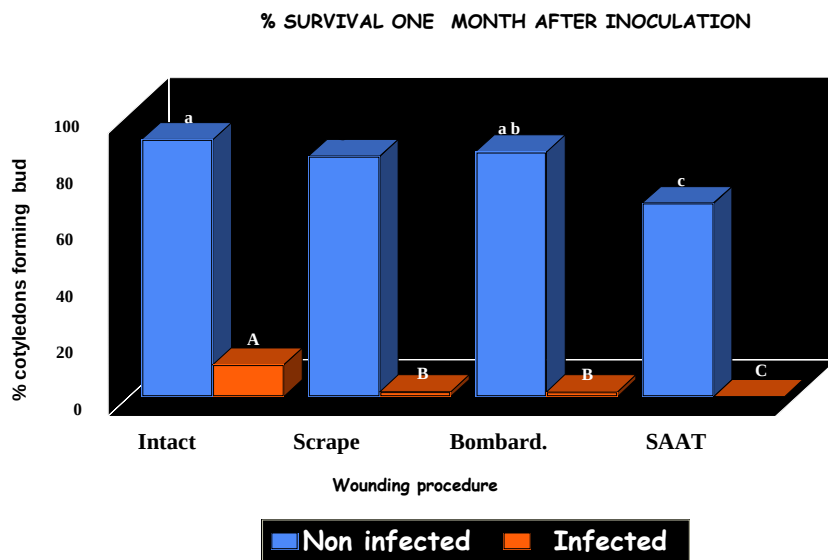
EFFECT OF DIFFERENT WOUNDING PROCEDURES ON *A. TUMEFACIENS*-MEDIATED UDA GENE TRANSFER INTO *P. PINEA*

WOUNDING PROCEDURE	NUMBER OF ASSAYED COTYLEDONS	PERCENTAGE OF GUS-POSITIVE COTYLEDONS	MEAN NUMBER OF GUS FOCI COTYLEDON $\pm$ SE
NONE	338	16.6 a	4.1 $\pm$ 0.73 a
SCRAPE	311	8.4	2.57 $\pm$ 0.3 a
BOMBARDMENT	281	^b 5.3	4.26 $\pm$ 1.11 a
SAAT	318	^b 27.7	Diffuse staining
CONTROL	153	^c 0 ^d	0b



Stone pine cotyledons with different types of wounds were inoculated with *A. tumefaciens* EHA105 p35SGUSint according to treatment 6 (inoculation for 5 min, bacterial concentration 1, coculture 3 d). Data were measured 7 days after infection and are presented as mean number of at least 4 different experiments $\pm$ SE. In each column, values with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

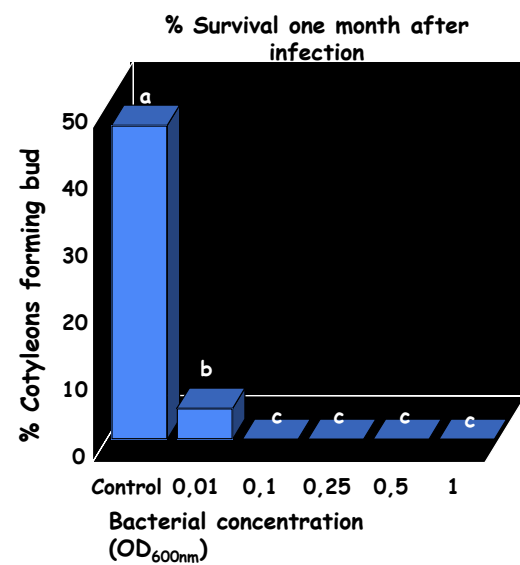
EFFECT OF DIFFERENT WOUNDING PROCEDURES ON PERCENTAGE OF COTYLEDONS FORMING BUDS



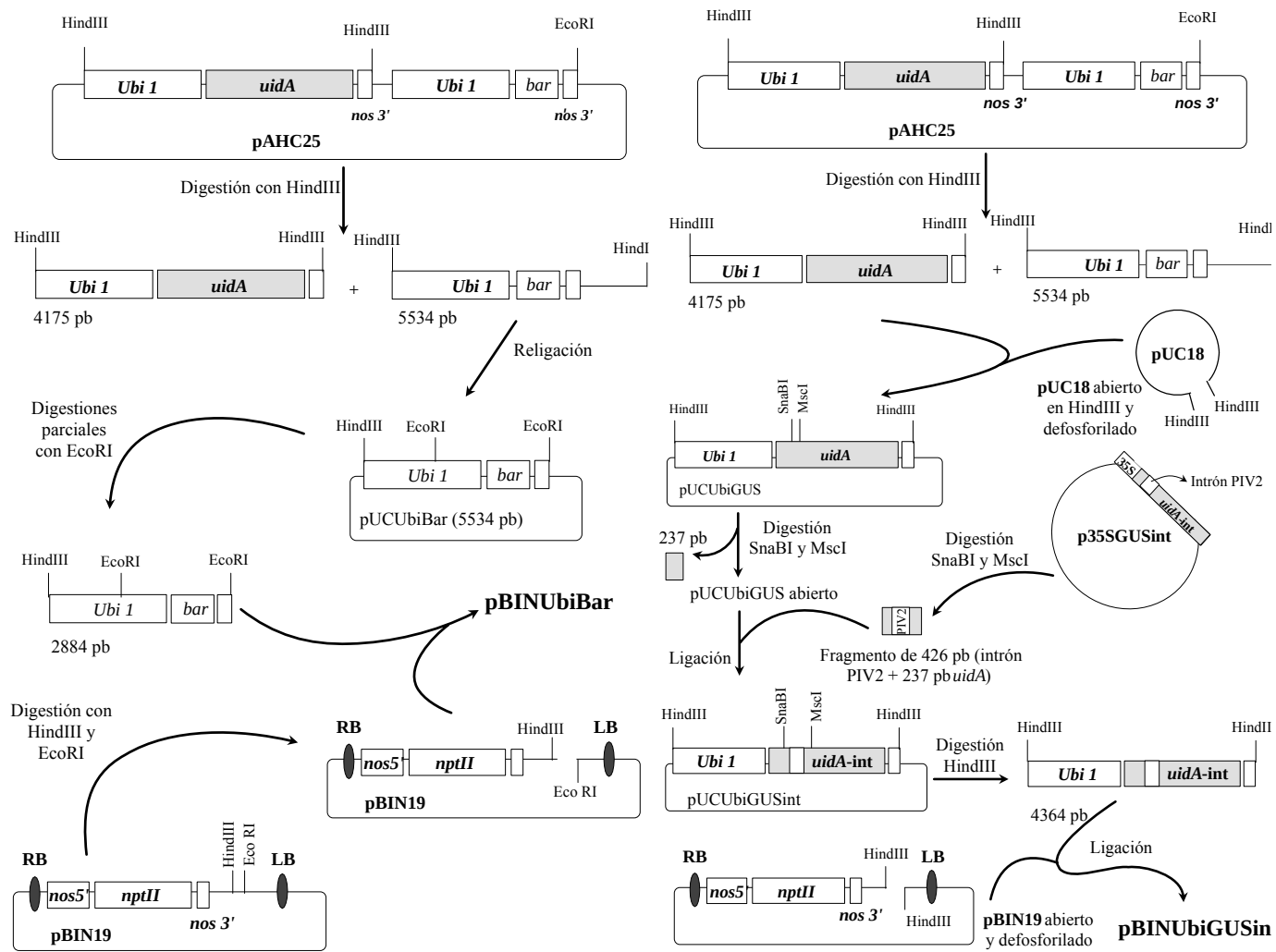
Stone pine cotyledons with different types of wounds were inoculated with *A. tumefaciens* EHA105 p35SGUSint according to treatment 6 (inoculation for 5 min, bacterial concentration 1, coculture 3 d). Cotyledons that were not infected were used as controls. Data are presented as mean number of at least 4 different experiments. Values with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

EFFECT OF BACTERIAL DENSITY ON *A. TUMEFACIENS*-MEDIATED UIDA GENE TRANSFER INTO *P. PINEA* COTYLEDONS

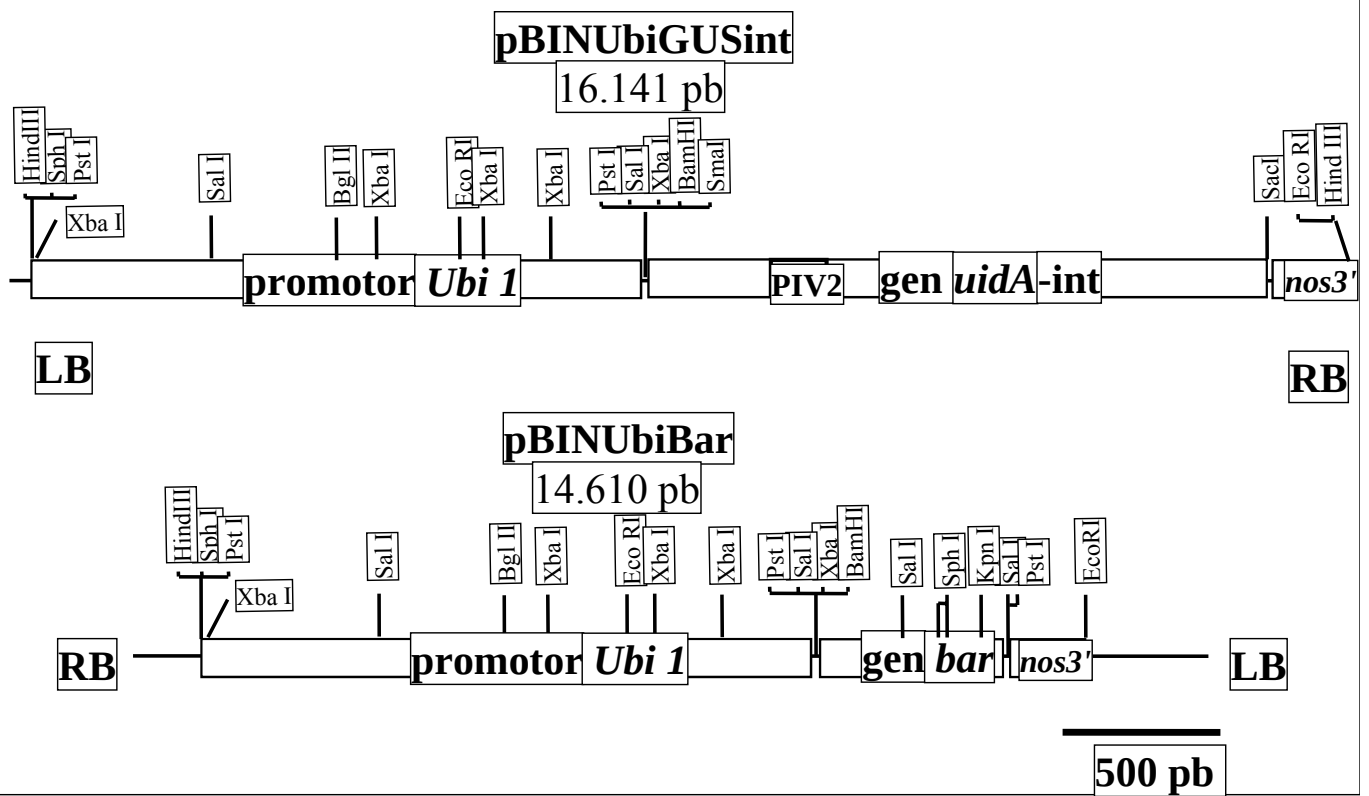
Bacterial concentration (OD _{600nm})	Number of assayed cotyledons	Percentage of GUS positive cotyledons	Mean ±SE number of GUS foci/cotyledon
1	320	49.7 a	Manchas
0,5	376	27.7 b	Manchas
0,25	337	28.5 b	Manchas
0,1	350	23.1 b	10.2 ± 1,5
0,01	328	13.4 c	6.25 ± 1,03



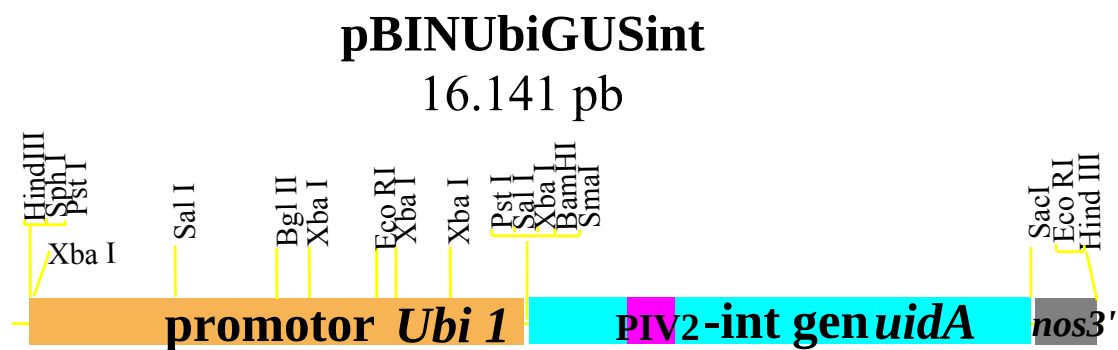
Data presented as mean number of at least 4 different experiments. Values with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).



Nuevos vectores binarios para la transformación de *Pinus pinea*



Structure and restriction map of a portion of the T-DNA of pBINUbiGUSint



Gene elements are drawn to scale. The pBIN19 portion of the plasmid is not shown. Abbreviations: *Ubi1*, ubiquitin gene promoter; *uidA*-int, *uidA* gene with the intron PIV2 from potato; *nos3'*, polyadenylation signal from the nopaline synthase gene; RB and LB, right and left borders of the T-DNA.

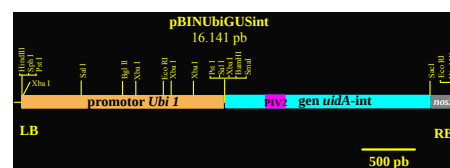
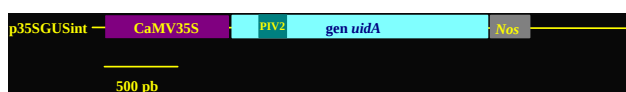
Expresión del gen *uidA* (pBINUbiGUSint) mediada por *A. tumefaciens* en cotiledones de *Pinus pinea* heridos por raspado

Cepa EHA105 p35SGUSint o pBINUbiGUSint. Protocolo B, infección 5 minutos y cocultivo 3 días.

Densidad de infección (A 600 nm)	Plásmido binario	% Cotiledones con respuesta GUS +	Unidades expresión / cotiledón	% CFY al mes de inoculación
0,01	p35SGUSint	0 a	0 a	25,9 ± 2,3 a
	pBINUbiGUSint	15,2 b	7,5 ± 1,2 b	21,3 ± 2,2 a
1	p35SGUSint	8,2 c	3,3 ± 0,6 c	1,9 ± 0,7 b
	pBINUbiGUSint	41,4 d	7,1 ± 0,6 b	2,4 ± 0,8 b
Control	-----	0 a	-----	70,4 ± 2,1 a

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

EFFECT OF PLASMID P35SGUSint AND THE NEW DESIGNED VECTOR, PBINUBIGUSINT, ON *UIDA* EXPRESSION IN *PINUS PINEA* COTYLEDONS SEVEN DAYS AFTER THE INOCULATION WITH *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS* EHA105



Wounding procedure	Binary plasmid	% of GUS positive cotyledons	Mean number of GUS foci/cotyledon $\pm$ SE	% of BFC ⁽¹⁾ 30 days after inoculation $\pm$ SE
Scrape	p35SGUSint	0 a	0 a	25.9 $\pm$ 2.3 a
	pBINUBiGUSint	15.2 b	7.5 $\pm$ 1.2 b	21.3 $\pm$ 2.2 a
	----- Control	0 a	0 a	70.4 $\pm$ 2.1 b
SAAT	p35SGUSint	2.1 a	1.2 $\pm$ 0.4 a	1.5 $\pm$ 0.6 a
	pBINUBiGUSint	33.8 b	9.5 $\pm$ 1.1 b	0.3 $\pm$ 0.2 a
	----- Control	0 c	0 a	58.1 $\pm$ 2.3 b
--- Control	Non-inoculated	0	----	89.8 $\pm$ 2.2

⁽¹⁾ BFC: Bud forming cotyledons.



Bacterial density used for inoculation (OD_{600nm}) was 0.01. Data are presented as mean number of at least three different experiments $\pm$ standard error (SE). In the column and for each wounding procedure, values with different letters are significantly different ($P \leq 0.05$).

Transformación genética mediada por virus

Obtención de partículas virales quimeras

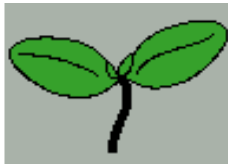
Péptido



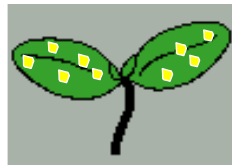
+



Infección

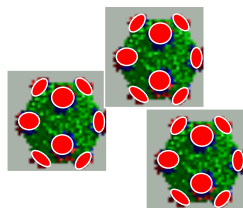


Virus vegetal



Extracción

Partículas virales
quimeras



Usos de los virus de plantas en biotecnología e investigación

1. **Expresión de proteínas en plantas**
 - Vector de expresión
 - Proteínas virales supresoras del silenciamiento post-transcripcional
2. **Análisis funcional de genes en plantas**
 - Vector de silenciamiento post-transcripcional

Transformación genética . Métodos directos. Biobalística.
Electroporación. Microinyección. Ejemplos. Estado actual y
perspectivas.

- **Sistemas de transferencia de ADN basados en vectores biológicos**
 - Sistemas basados en *Agrobacterium tumefaciens* y *Agrobacterium rhizogenes*
 - Sistemas basados en virus vegetales
- **Sistemas de transferencia directa de ADN**
 - Transferencia por bombardeo de micropartículas o biobalística
 - Transferencia mediada por electroporación y/o métodos químicos
 - Transferencia con *whiskers* de carburo de silicio
 - Transferencia por microinyección

- **Ventajas**

- Son considerados sistemas universales porque, al no depender de organismos vectores, pueden aplicarse a cualquier especie vegetal
- No requieren eliminar las células del organismo vector de los tejidos o plantas transgénicas
- Requieren construcciones más simples y pequeñas
- Son apropiados para estudios de expresión transitoria

- **Desventajas**

- Pueden resultar en un alto número de copias y/o copias truncadas del transgén y del vector en varios sitios del genoma de las células transformadas
- Se caracterizan por la alta frecuencia de aparición de re-arreglos en los transgenes

*Se recomienda tomar ciertas precauciones: a) reducir el número de transgenes a transferir, b) evitar el uso de múltiples copias del mismo promotor o terminador y c) evitar el uso de promotores y transgenes con un alto grado de similitud a promotores o genes endógenos.

Transferencia de genes mediante disparo de partículas o Biobalística

"Biolistics": Partículas esféricas ($0,4-1,2 \mu\text{m } \Phi$) de oro o wolframio recubiertas con ADN que se aceleran e impulsan a alta velocidad (3-600 metros/seg) con gas comprimido (helio), impactando, atravesando las paredes de las células vegetales y depositándose en el citoplasma y orgánulos (núcleo, mitocondrias y cloroplastos).

Se puede transformar un amplio rango de cultivos celulares y tejidos: suspensiones, callos, meristemos, embriones, coleótilos y polen, especialmente de especies no susceptibles a *Agrobacterium*, como son las monocotiledóneas.

Bombardeo de micropartículas

1984. Sandford *et al.*, describen la técnica de bombardeo de micropartículas para la transferencia directa de ADN (Universidad de Cornell, EEUU).

Diseño del primer acelerador de micropartículas impulsadas por explosión de pólvora

Bombardeo de micropartículas

- 1987. Klein *et al.* demuestran la utilidad del método al observar expresión transitoria en células epidérmicas de *Allium cepa* usando un dispositivo de impulsión a pólvora y micropartículas de tungsteno recubiertas de ADN.
- 1988. Christou *et al.* demuestran la utilidad del método para transferir ADN biológicamente activo en células vivas y obtener transformantes estables.
- 1988. Johnston *et al.* logran transformar por primera vez microorganismos y organelas.
- 1988. Wang *et al.*, Mc Cabe *et al.*, Christou *et al.* obtienen plantas superiores transgénicas.
- 1991. Williams *et al.* demuestran la transformación de animales *in vitro* e *in vivo*.

La transformación por biobalística depende de factores físicos, químicos y biológicos

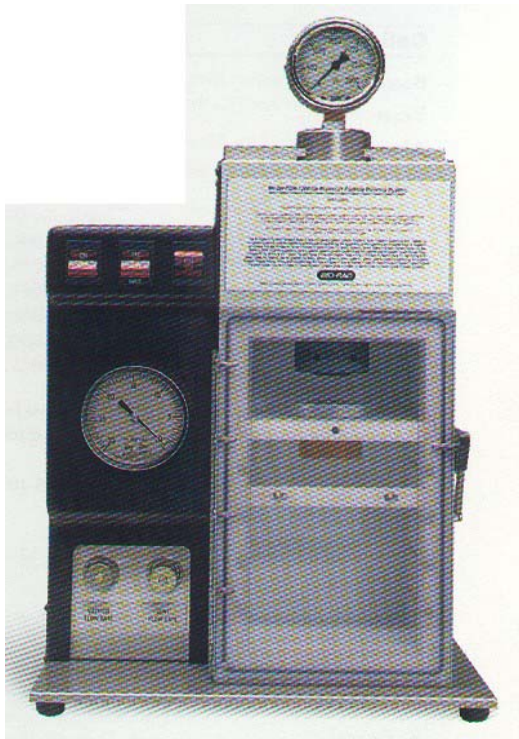
- **Parámetros físicos y químicos que influyen en la transferencia del ADN**

- Método de aceleración de las micropartículas
- Naturaleza química y física, densidad y volumen de las micropartículas
- Naturaleza, preparación, adherencia y concentración del ADN
- Vacío y distancias de bombardeo
- Diámetro de apertura de la placa de retención
- Número de bombardeos

- **Parámetros relacionados con la construcción genética utilizada**

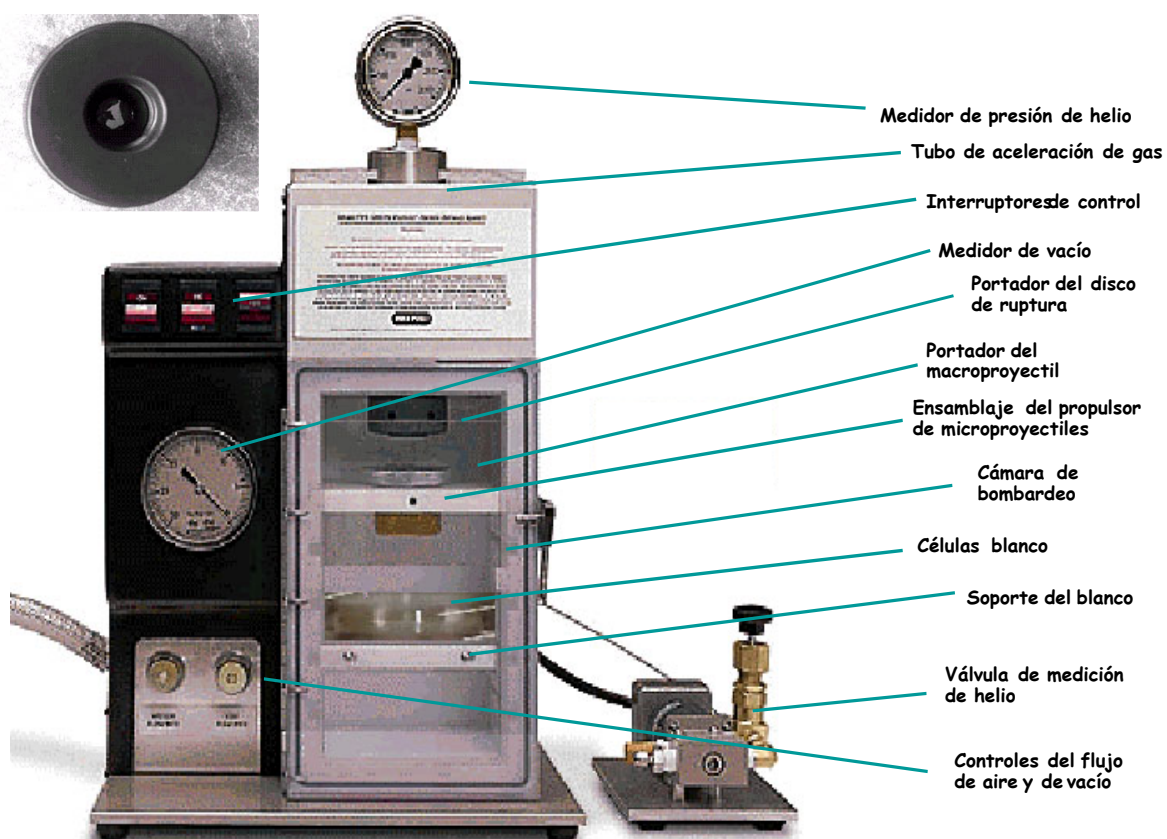
- Vector, promotores, intrones, genes reporteros y genes marcadores de selección

Sistemas alternativos de aceleración de micropartículas



• **La aceleración de las micropartículas puede generarse por:**

- Explosión química de pólvora seca
- Descarga de helio a alta presión
- Descarga de aire, CO₂ o N₂ comprimido
- Descarga eléctrica de alto voltaje y baja capacitancia o bajo voltaje y alta capacitancia
- Flujo de partículas o flujo de helio a baja presión por aspersión
- Flujo de helio con cañón de precisión



Acelerador de micropartículas PDS 1000/He por descarga de helio a alta presión

La transformación por biobalística depende de factores físicos, químicos y biológicos

- **Parámetros físicos y químicos que influyen en la transferencia del ADN**

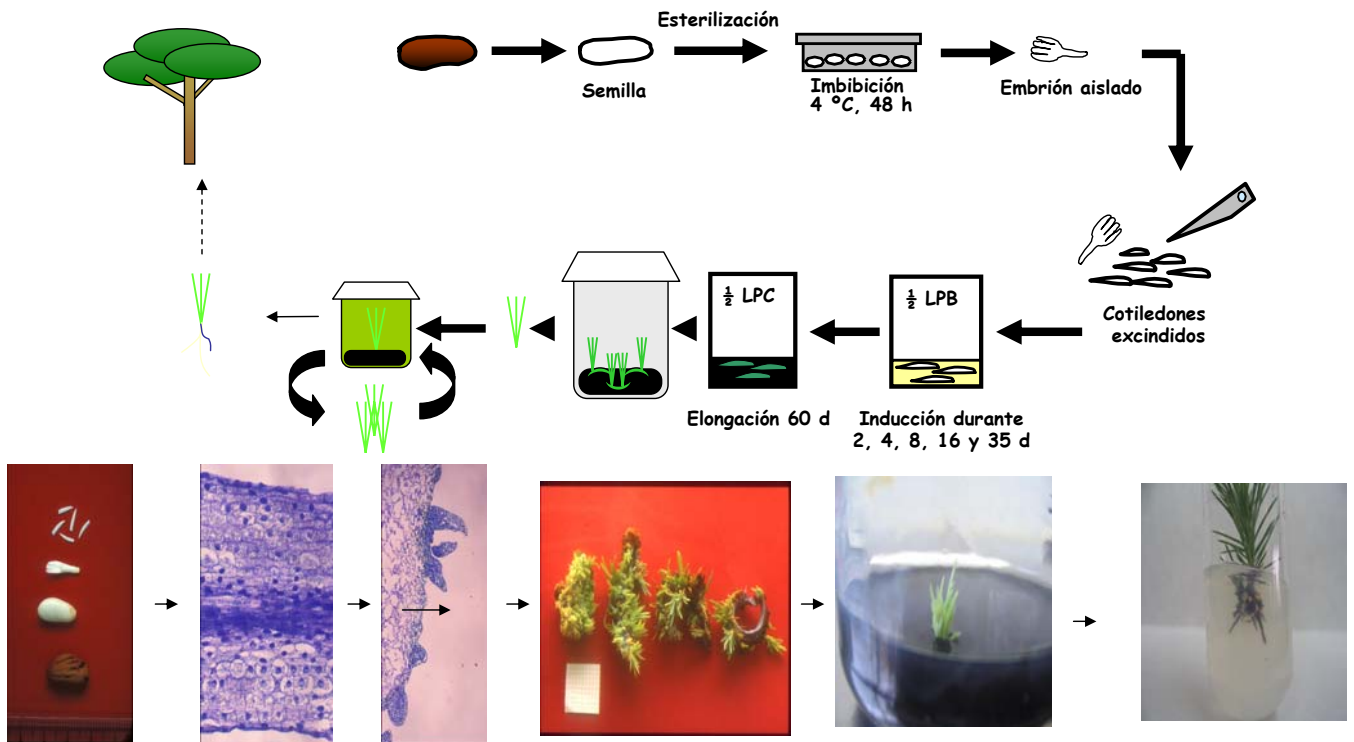
- Método de aceleración de las micropartículas
- Naturaleza química y física, densidad y volumen de las micropartículas
- Naturaleza, preparación, adherencia y concentración del ADN
- Presión, vacío y distancias de bombardeo
- Diámetro de apertura de la placa de retención
- Número de bombardeos

- **Parámetros relacionados con la construcción genética utilizada**

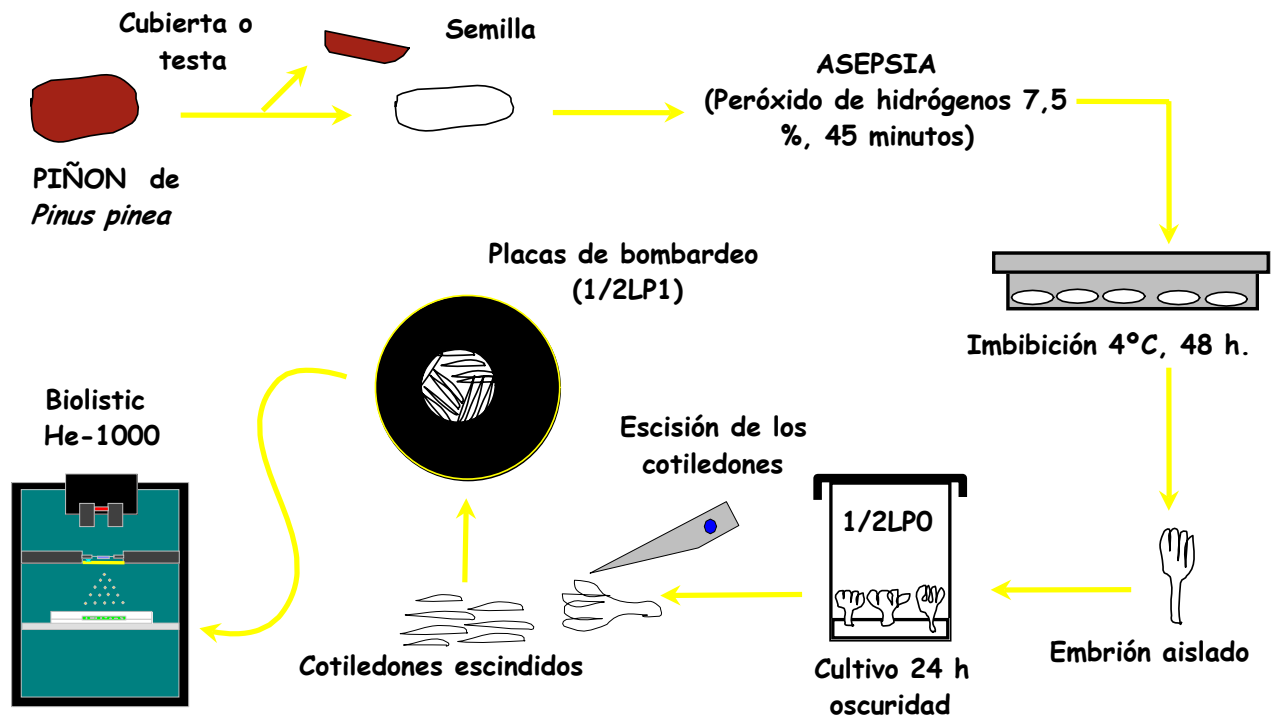
- Vector, promotores, intrones, genes reporteros y genes marcadores de selección

Caso práctico: Amplificación de progenie en *Pinus pinea*.

- Hay programa de mejora genética.
- De cada cruce controlado se pueden obtener cientos de semillas. De cada semilla un árbol.
- Con técnicas de cultivo *in vitro* se pueden producir cientos de plántulas a partir de una semilla.



Transformación de cotiledones de *Pinus pinea* mediante bombardeo de micropartículas



PBI 121

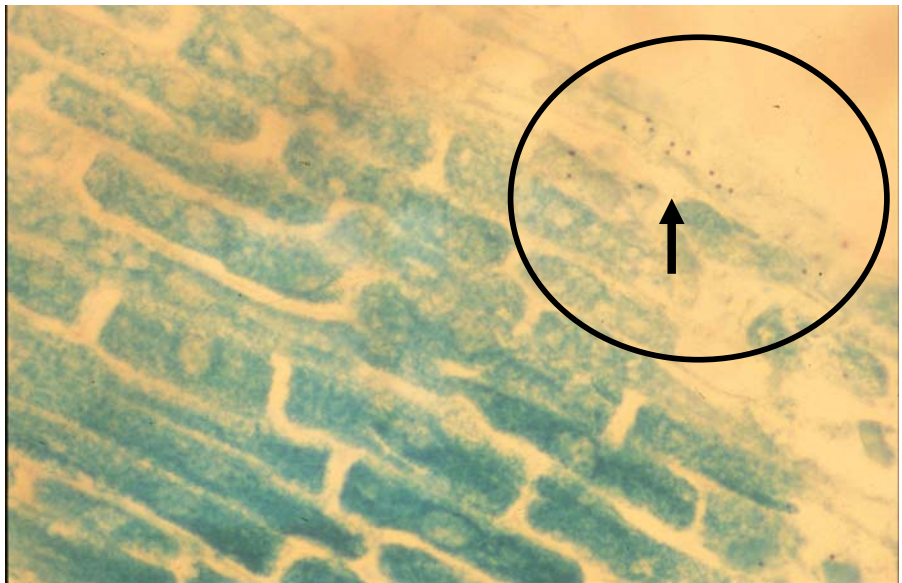
CaMV35S

gen *uidA*

Nos

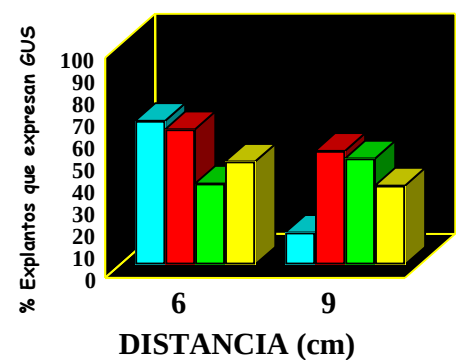
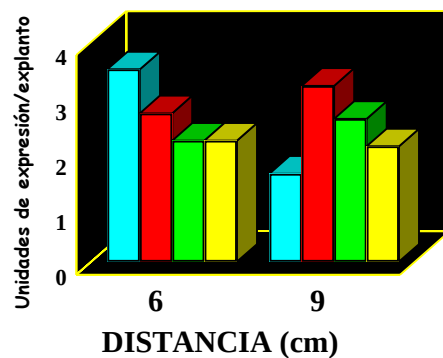
500 pb

Este gen *GusA* codifica para la enzima β glucuronidasa cuya actividad se determina por los métodos 1) **histoquímico** en el cual la β -glucuronidasa hidroliza al sustrato X-Glu produciendo una coloración azul y 2) **fluorométrico** donde la β glucuronidasa hidroliza el sustrato Metil Umbeliferil Glucuronido liberando el grupo fluorógeno Metil Umbeliferona (MU).



EFFECTO DE LA DISTANCIA Y LA PRESIÓN DE BOMBARDEO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *gusA*

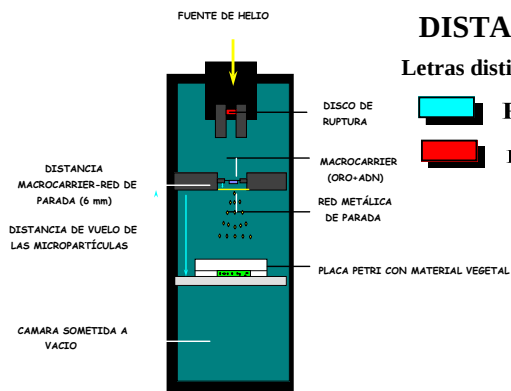
CONDICIONES DE BOMBARDEO: DIÁMETRO ORO 1 μm , CONCENTRACIÓN DE ADN 0.8 μg /
DISPARO, PLÁSMIDO PBI121



Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0.05$).

Presión de disparo 4,5 MPa
Presión de disparo 6,2 MPa

Presión de disparo 7,6 MPa
Presión de disparo 9 MPa



EFFECTO DEL DIÁMETRO DE LAS PARTÍCULAS SOBRE LA EXPRESION DEL GEN *gusA*

CONDICIONES DE BOMBARDEO: DISTANCIA 6 cm, PRESION 4,5 MPa, CANTIDAD DE ADN 0.8 μ g / DISPARO.

Diámetro de partícula (μ M)	Nº cotiledones ensayados	% Cotiledones con respuesta	Unidades de expresión / cotiledón
1	344	85,7 a	7,1 $\pm$ 0,4 a
1,6	377	65,3 b	3,5 $\pm$ 0,3 b

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

EFFECTO DE LA CANTIDAD DE ADN POR DISPARO SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *gusA*

CONDICIONES DE BOMBARDEO: DISTANCIA 6 cm, PRESION 4,5 MPa, DIAMETRO DE LAS PARTICULAS 1 μ M

Cantidad de ADN (μ g/disparo)	% Cotiledones con respuesta	Unidades de expresión / cotiledón
0,4	42,5 a	2,7 $\pm$ 0,24 a
0,8	85,3 b	7,3 $\pm$ 0,4 b
1,6	65,3 c	5,7 $\pm$ 0,5 c

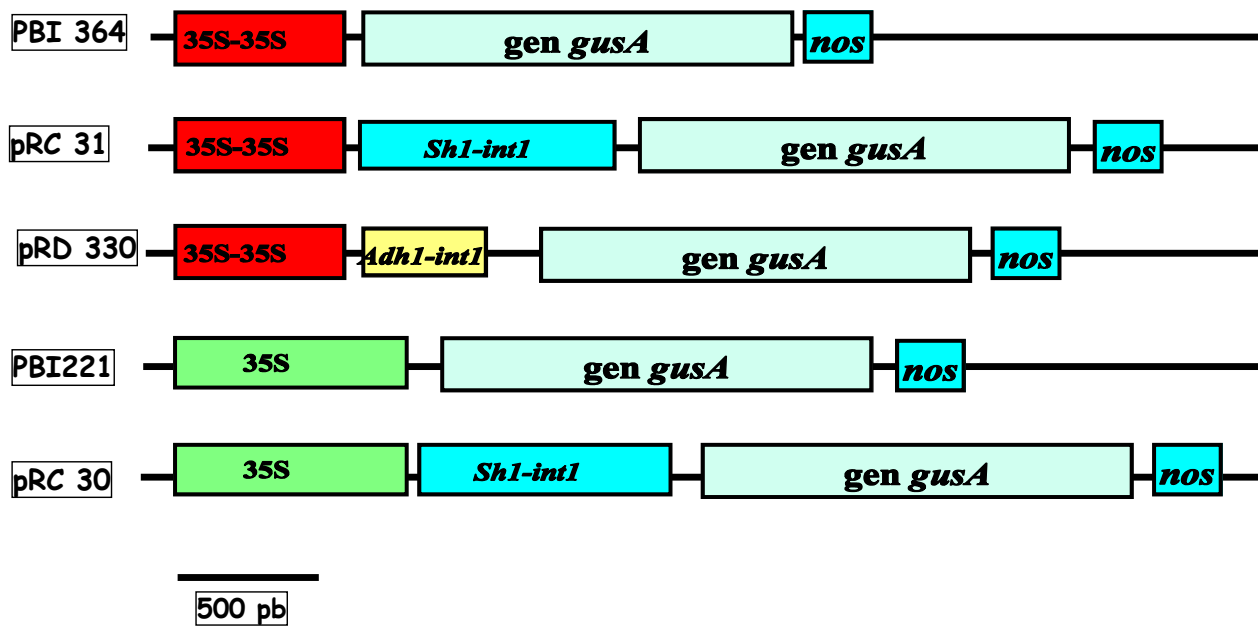
Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).

EFFECTO DEL PERÍODO DE CULTIVO DE LOS COTILEDONES SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *gusA*

CONDICIONES DE BOMBARDEO: DISTANCIA 6 cm, PRESION 4,5 MPa, CANTIDAD DE ADN 0.8 μ g /
DISPARO, DIAMETRO DE LAS PARTICULAS 1 μ M.

Período de cultivo	% Cotiledones con respuesta	Unidades de expresión / cotiledón
0	85,4 a	7,1 $\pm$ 0,4 a
1	71,8 b	4,6 $\pm$ 0,3 b
2	55,4 c	3,5 $\pm$ 0,4 c
3	14,7 d	1,5 $\pm$ 0,2 d

Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).



EFFECTO DE LOS INTRONES *Sh1-int1* Y *Adh1-int1* SOBRE LA EXPRESION DEL GEN *gusA*

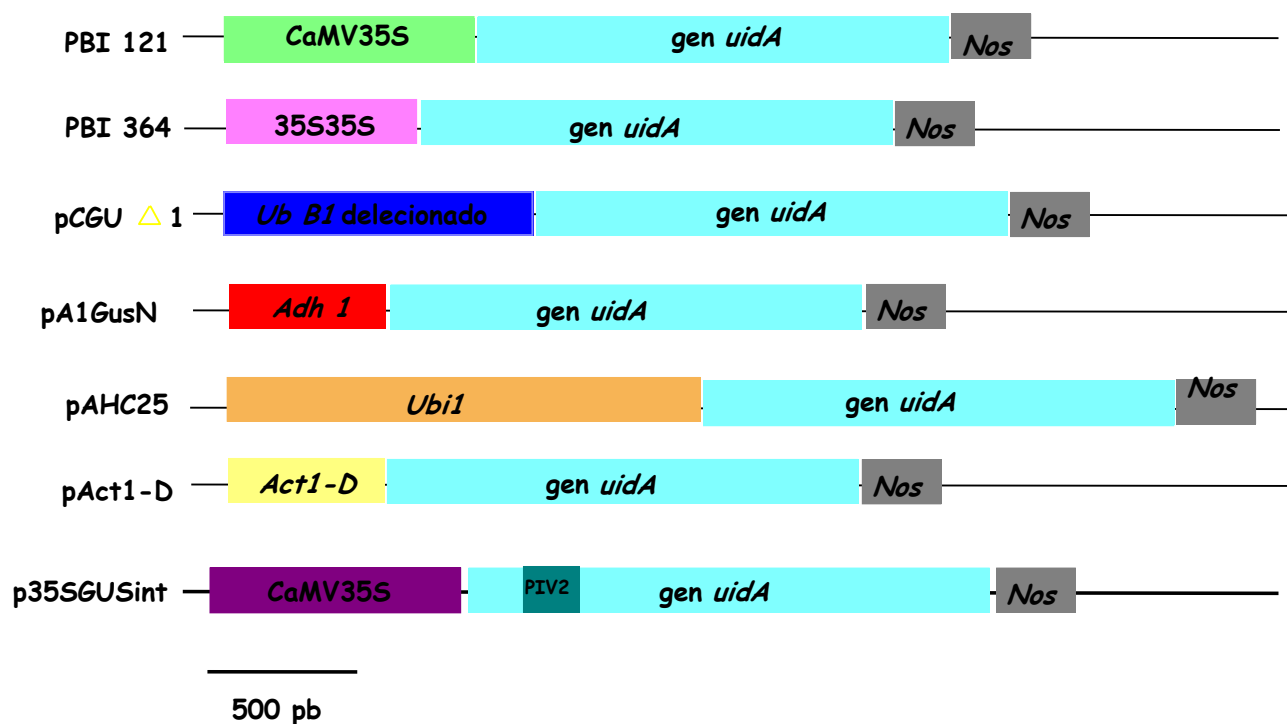
CONDICIONES DE BOMBARDEO: DISTANCIA 6 cm, PRESION 4,5 MPa, DIAMETRO DE LAS PARTICULAS 1 μ M, CANTIDAD DE ADN 0,8 μ g/disparo .

Plásmido	Promotor	%Cotiledones con respuesta	Unidades de expresión/ cotiledón	pmolMU/mg * proteína · min
—	control	0	0	0,1±0,006 c
PBI221	35SCaMV	79,5 c	6,4±0,6 c	14,04±2,3 a
pRC 30	35SCaMV-Sh1-int1	95,4 a	9,9±0,7 a	48,2±9,7 b
PBI364	35SCaMV-35SCaMV	81,8 c	7,2±0,5 c	87,8±14,8 b
pRC 31	35SCaMV-35S-CaMV-Sh1-int1	99,4 a	10,8±0,6 a	270±26,1 d
pRD 330	35SCaMV-35S-CaMV-Adh1-int1	5,3 b	1,1±0,1 b	0,8±0,5 c

Letras distintas indican diferencias significativas (P<0,05).

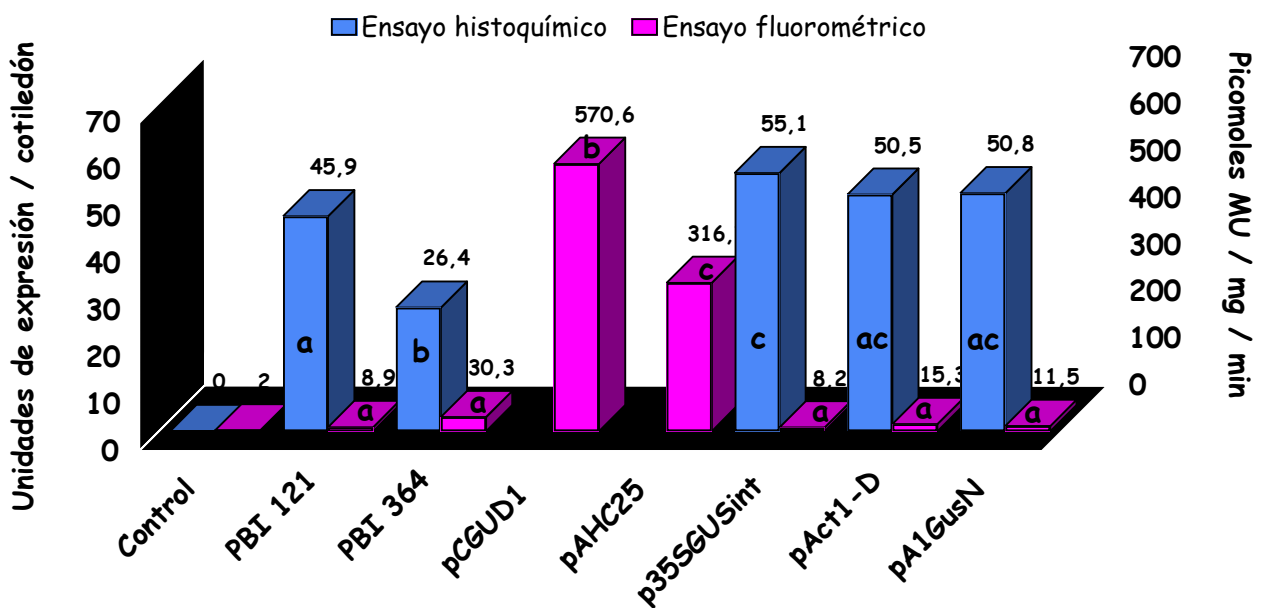
*Esta enzima degrada el sustrato 4-metilumbeliferil-B-D-glucoronido (MUG) ; formando 4-metilumbeliferona la cual es detectada por su fluorescencia en presencia de luz UV de onda larga.

Vectores utilizados en el estudio del efecto de las secuencias promotoras sobre la expresión transitoria del gen *uidA* en cotiledones de *Pinus pinea*

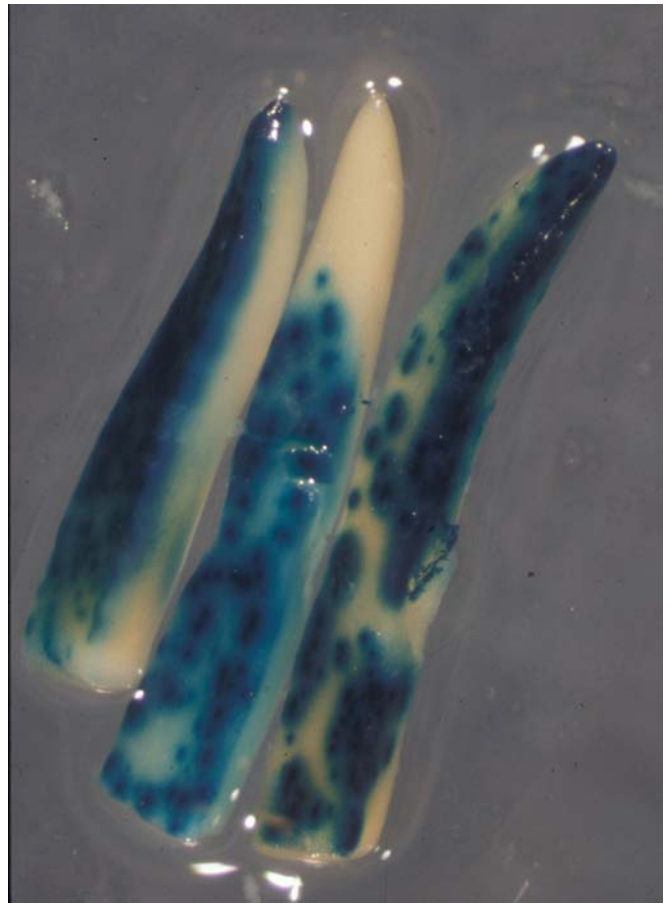
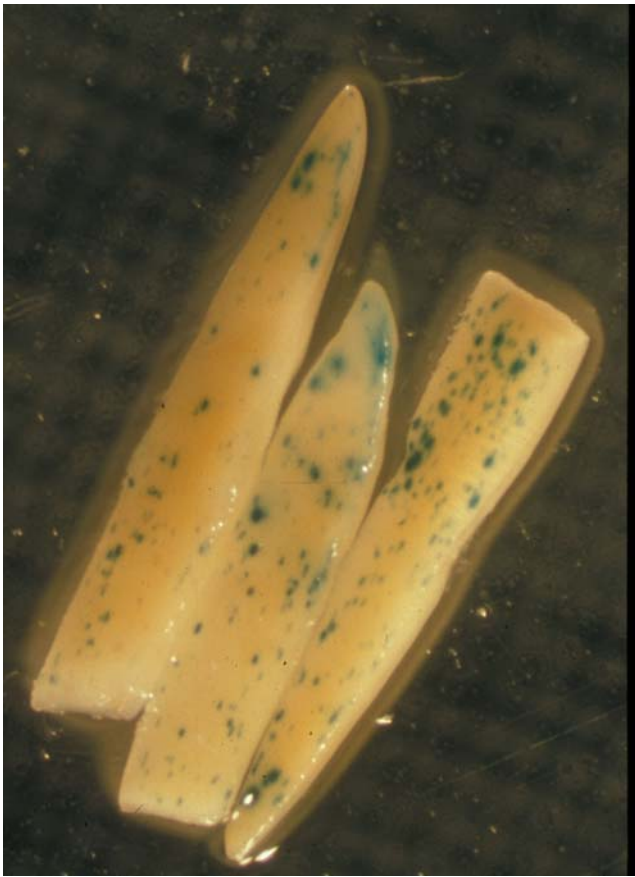


Efecto de las secuencias promotoras sobre la expresión transitoria del gen *uidA* en cotiledones de *Pinus pinea*

Parámetros: distancia 6 cm, oro 1 μm , presión 900 psi, cantidad de ADN 0,8 μg / disparo.



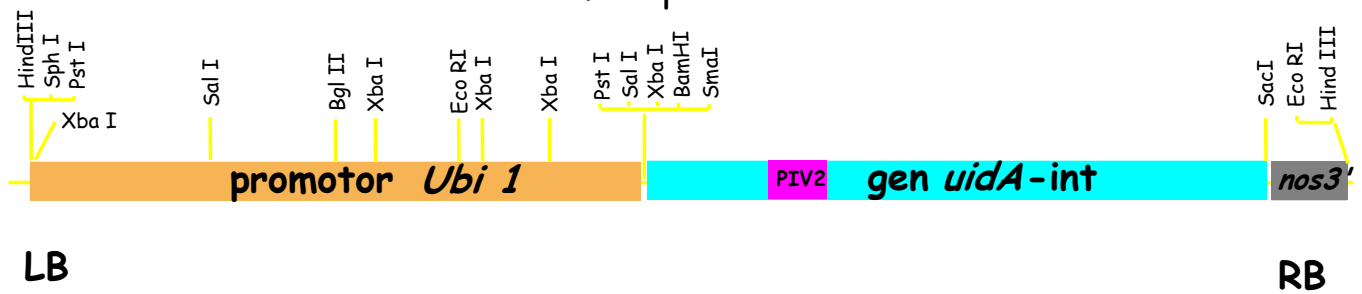
Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).



Nuevos vectores binarios para la transformación de *Pinus pinea*

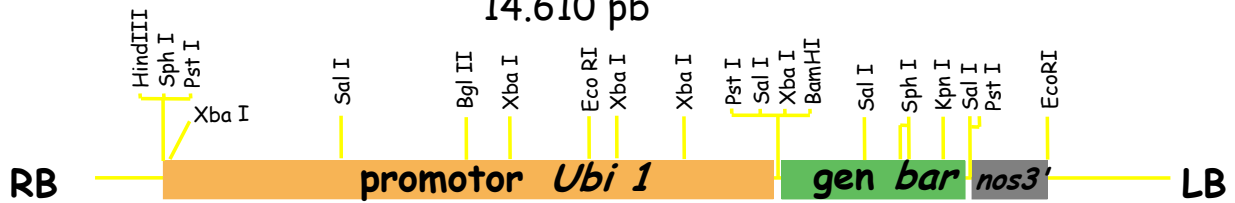
pBINUbiGUSint

16.141 pb



pBINUbiBar

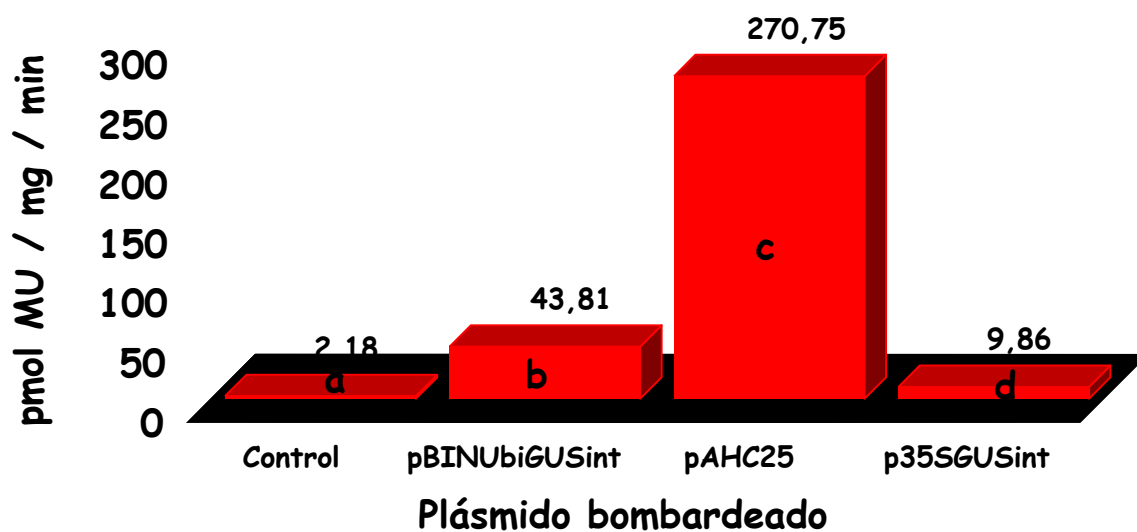
14.610 pb



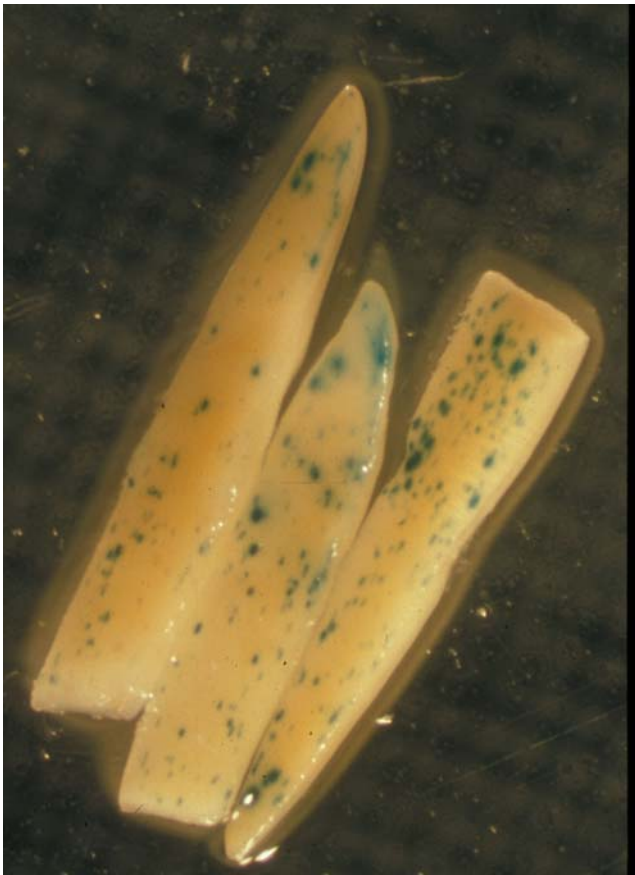
500 pb

Expresión del gen *uidA* del plásmido pBINUbiGUSint en cotiledones de *Pinus pinea*: Comparación con pAHC25 y p35SGUSint

Parámetros: distancia 6 cm, oro 1 μm , presión 900 psi, cantidad de ADN 0,8 μg / disparo.



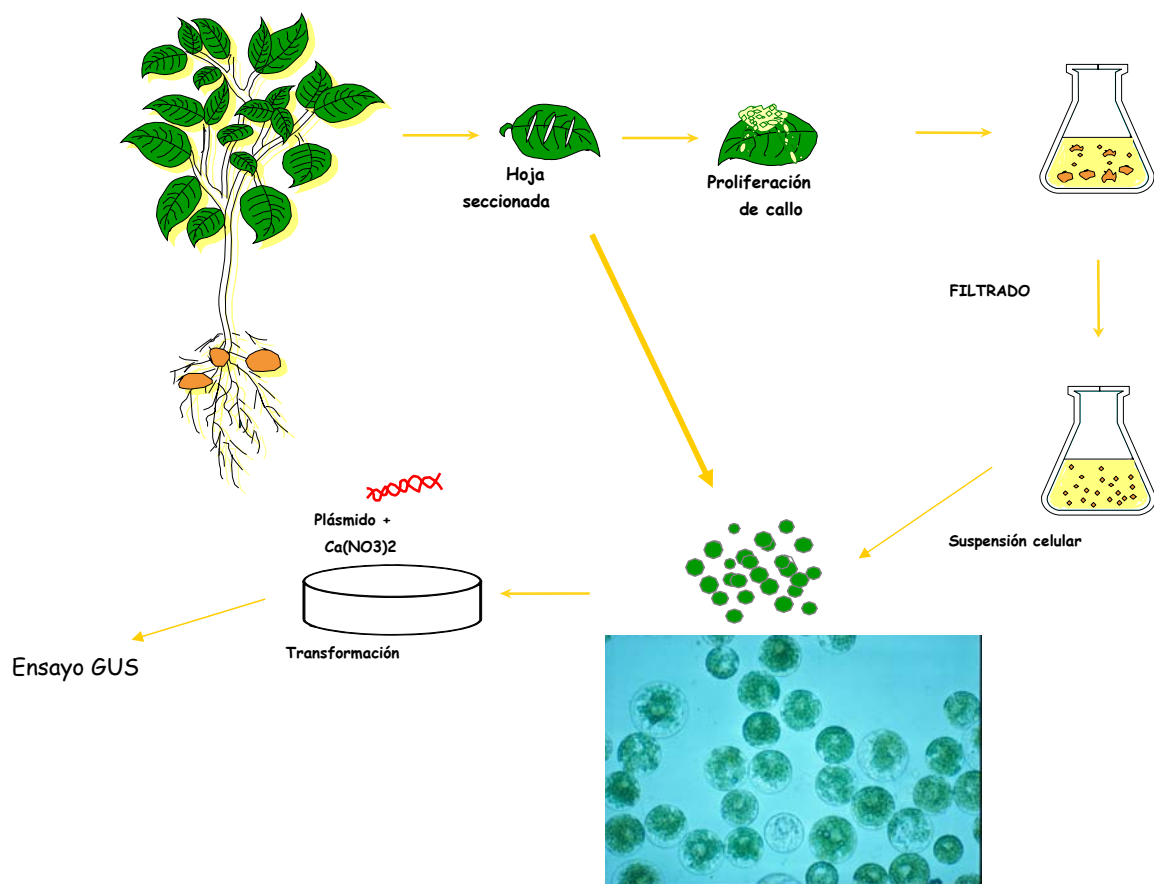
Letras distintas indican diferencias significativas ($P < 0,05$).



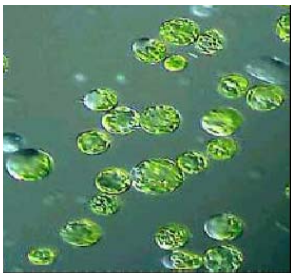
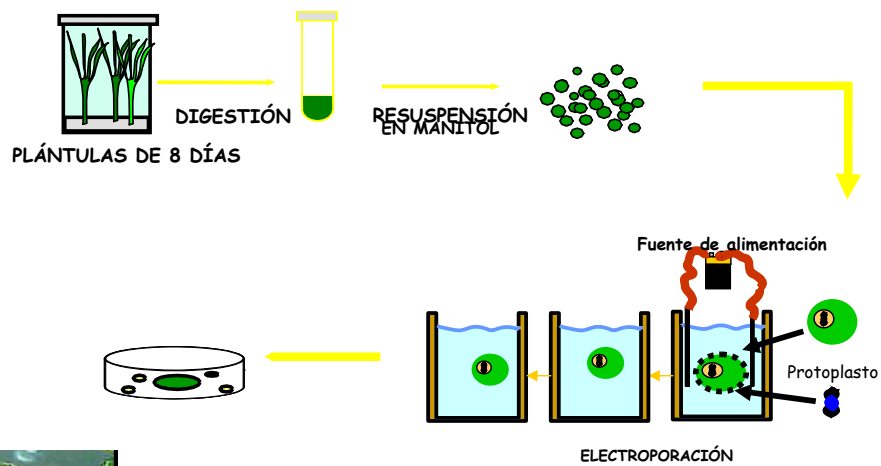
La biobalística puede utilizarse con diversos fines experimentales

- Transferencia de genes a células, tejidos y órganos vegetales
- Transferencia de genes a microorganismos, células eucarióticas y orgánulos
- Estudio de expresión transitoria
- Análisis de promotores y de delección de genes
- Estudio de mecanismos de expresión y regulación de genes
- Estudio de infecciones virales
- Transferencia de ARN viral
- Estudio de vías metabólicas
- Estudio del desarrollo de plantas

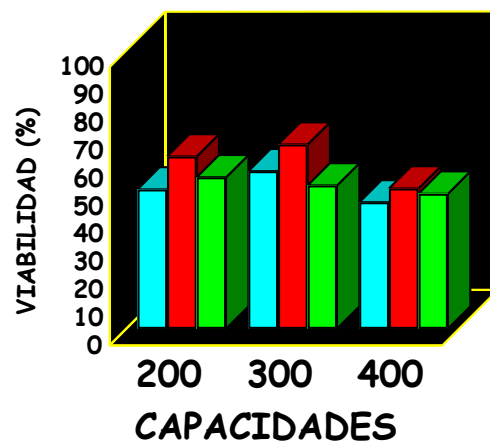
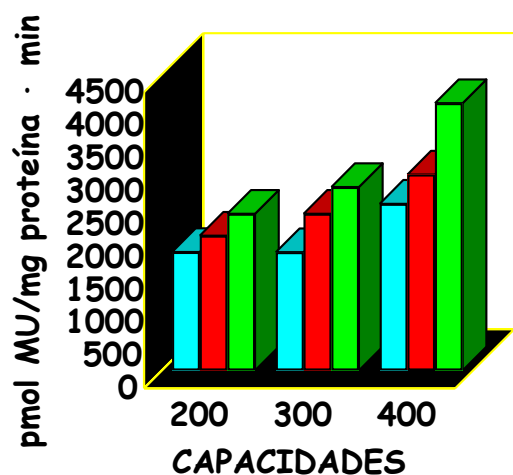
Transferencia de ADN mediada por electroporación y/o métodos químicos



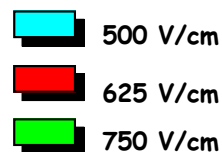
AISLAMIENTO Y ELECTROPORACIÓN DE PROTOPLASTOS DE *Pinus nigra* Arn



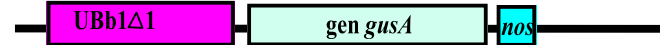
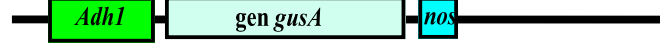
EFFECTO DE LA CAPACIDAD Y EL VOLTAJE SOBRE LA EXPRESION TRANSITORIA DEL GEN *gusA* EN PROTOPLASTOS DE *Pinus nigra* Arn.



FUERZAS DE CAMPO APLICADAS



**EFFECTO DEL PROMOTOR SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *gusA* EN
PROTOPLASTOS ELECTROPORADOS DE *Pinus nigra* Arn.**

Plásmido		pmol MU / mg de proteína · min
control		7,8 ± 1,9 e
PBI 364		225,2 ± 29 d
p35SGUSint	 Intron PIV2	27,3 ± 2,7 b
pCGU ▲1		4425,8 ± 585 a
pA1GusN		35,3 ± 6,9 b
pAHC25		1434 ± 340 c
pAct1-D		22 ± 3,5 b

Letras distintas indican diferencias significativas (P<0.05).

Transformación de plastidios

Plantas transplastómicas

- La célula vegetal tiene varios cloroplastos. (cientos o decenas) y sólo un núcleo.
- Los cloroplastos expresan los genes bacterianos con mayor facilidad debido a su origen procariótico.
- La expresión del material genético es más estable.
- Integración por recombinación homóloga.
- Evitamos el silenciamiento génico.
- Poseen ARNm policistrónico.
- Se transmite, con excepciones (en ciertas coníferas y otras), por vía materna.

Marcadores

- Genes dominantes de la resistencia a antibióticos:
 - *aadA* (Spectinomycin)
 - *nptII* (kanamicina)
- Genes recesivos que restauran el crecimiento de fotoautótrofos.
- Alternativas para evitar la resistencia antibiótica:
Gen productor de betaina aldehído deshidrogenasa (*BADH*) y el gen *GFP*.

TRANSFORMACIÓN DE CLOROPLASTOS

- 1- Evitar contaminación genética por parte de las plantas transgénicas a las silvestres.
- 2- Proteger a los consumidores de dichas especies transgénicas de intoxicaciones.
- 3- Producir grandes cantidades de una proteína extraña interesante para el hombre.
- 4- Alcanzar el máximo rendimiento en la producción de plantas transgénicas.

La expresión de toxina Cry de *Bacillus thuringiensis* en cloroplastos confiere amplia resistencia contra insectos

Proteínas Cry de *Bacillus thuringiensis*

-Poseen potente actividad insecticida contra
Insectos lepidópteros, dípteros y coleópteros.

Resultados:

Se obtuvieron altos niveles de expresión de la toxina (aproximadamente 2-3 % de peso total soluble) asociados a una alta tasa de mortalidad (~100 %) para *Heliothis virescens*, *Helicoverpa zea* y *Spodoptera exigua* en los ensayos de infestación.

•La transformación de cloroplastos podría ser un sistema apropiado para acumular altos niveles de la δ -entomotoxina Cry debido al origen procariota del gen.