

Modulo Didáctico BIOTECNOLOGIAS, TRANSGENICOS Y BIOSEGURIDAD

Piura, 29 - 30 de Noviembre de 2010

“TRANSGÉNICOS”

Eliana Yglesias Gálvez
Dirección General de Diversidad Biológica



PERÚ Ministerio del Ambiente



www.mlnam.gob.pe

TRANSGÉNICOS

1. Definiciones y conceptos básicos
2. Obtención de transgénicos
3. Importancia de los transgénicos
4. Detección de OVMs



PERÚ Ministerio del Ambiente



www.mlnam.gob.pe

1. DEFINICIONES Y CONCEPTOS BÁSICOS

1. Ingeniería Genética
2. OVMs
3. Gen (estructura)
4. Transgén



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Ingeniería Genética

Conjunto de metodologías y técnicas dirigidas a lograr la modificación del material hereditario de una especie, con el fin de conferirle atributos (por ejemplo características del individuo o capacidad de producir sustancias) que no los tenía hasta ese momento.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



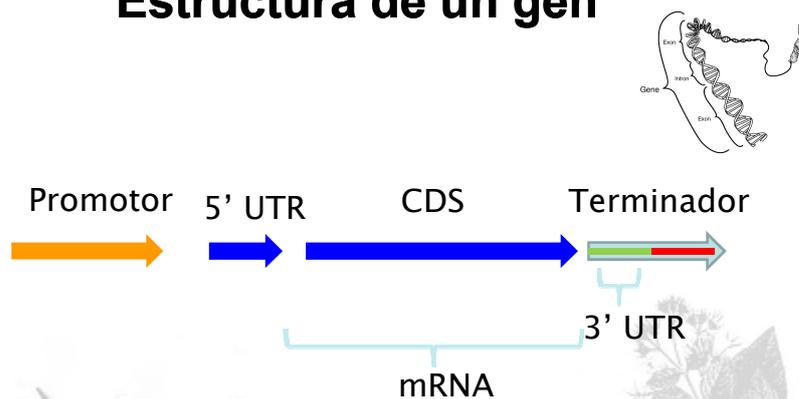
www.minam.gob.pe

Organismo Vivo Modificado (OVM)

- Es aquél que ha sufrido la alteración de su material hereditario (genoma) por la introducción artificial (manipulación genética) de un gene exógeno (transgén), esto es, proveniente de otro organismo completamente diferente.



Estructura de un gen



¿Qué es un Transgén?

Es el gen construido mediante ingeniería genética que se transfiere a una especie.

Ejemplo:

- El gen *cp4 epsp* tomado de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (cepa CP4).



Origen de un Transgén

Su origen puede ser :

- Vegetal
- Animal
- Microbiano
- Sintético



2. OBTENCIÓN DE TRANSGÉNICOS

Etapas en la obtención de un transgén:

- Identificación del problema
- Identificación del gen de interés para el hospedero adecuado.
- Construcción del transgén ("constructo")
- Transformación genética
- Selección y ensayos en espacio confinado
- Ensayos en campo y liberación



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

• Identificación del problema que se desea resolver:

- Identificación y valoración de los problemas que no pueden ser fácilmente resueltos con métodos convencionales.
- Identificación del tipo de problema que se quiere solucionar: resistencia plagas, sequía, patógenos, valor nutricional, otros.



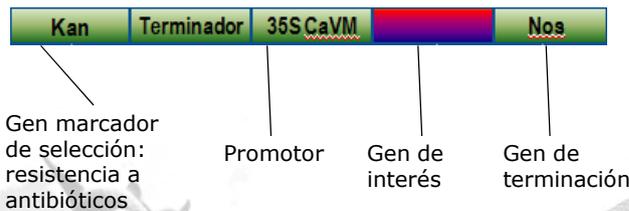
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén ("constructo")



PERÚ
Ministerio del Ambiente



www.minam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén ("constructo")

Kan

En plantas existen tres clases de genes marcadores seleccionable:

- Genes que dan resistencia a los antibióticos.
- Genes que dan resistencia a herbicidas
- Genes involucrados con varias vías metabólicas.



PERÚ
Ministerio del Ambiente



www.minam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén (“constructo”)



Promotor:

- Inicia la transcripción.
- Controla la expresión del gen.
- Los mas comúnmente usados son los derivados del virus del mosaico de la coliflor (CaMV), 19S CaMV y 35S CaMV.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

Construcción del transgén (“constructo”)



Genes de interés:

- Tolerancia al herbicida Glyphosato *Zea mays* L. (Maize) Roundup Ready®
- Tolerancia al herbicida Fosfotricina PPT – Glifocinato de amonio
- Resistencia a *Ostrinia nubilalis* (European corn borer)



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética:

- Mediada por *Agrobacterium*
- Por biolística (Gene Gun)
- Por electroporación



Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



- *Agrobacterium* es una bacteria que causa una enfermedad conocida como "agalla de la corona" en plantas.
- Es un parásito y puede causar grave daño a la planta afectada.
- Se encuentra en el suelo.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



- La relación *Agrobacterium* – planta es un caso único de transferencia de ADN entre bacterias y plantas (reinos diferentes).
- Esta situación es aprovechada para emplear a la bacteria como un vector natural para la transformación en plantas.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente

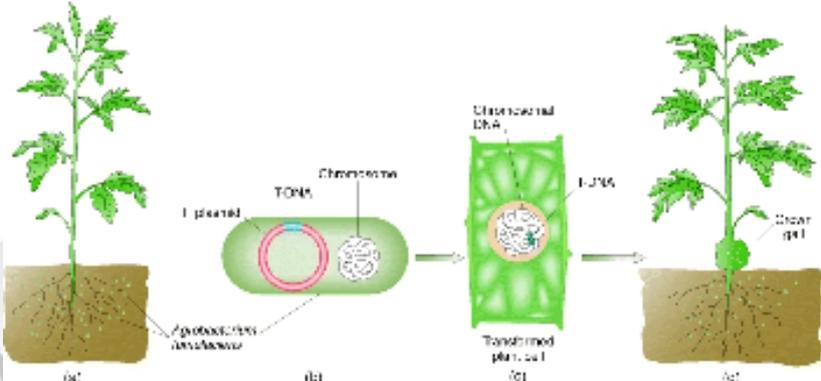


www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



- Proceso de infección *Agrobacterium*





PERÚ
Ministerio del Ambiente



www.mlnam.gob.pe

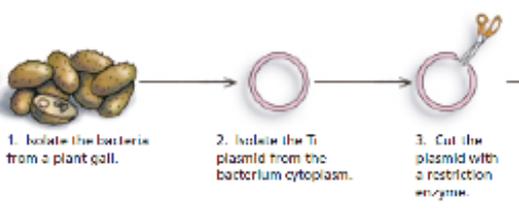
Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



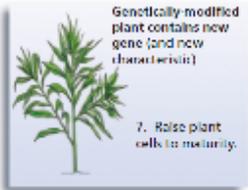
(a) Cell caused by *A. tumefaciens*



(b) Using the Ti plasmid



1. Isolate the bacteria from a plant gall.
2. Isolate the Ti plasmid from the bacterium cytoplasm.
3. Cut the plasmid with a restriction enzyme.
4. Use the same enzyme to cut the gene of interest.
5. Allow the gene to attach to the plasmid.
6. Expose plasmids to young plant cells in culture.
7. Raise plant cells to maturity.



Genetically modified plant contains new gene (and new characteristic)

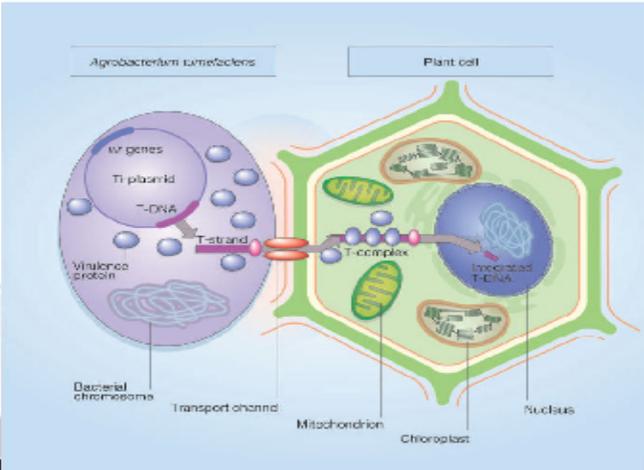


del Ambiente



www.mlnam.gob.pe

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



The diagram illustrates the process of genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. On the left, the bacterium is shown with its circular DNA containing *vir* genes, a Ti plasmid, and T-DNA. A T-strand is being transferred through a transport channel into a plant cell. On the right, the plant cell is shown with its nucleus containing integrated T-DNA. Other organelles like mitochondria and chloroplasts are also labeled. A small image of a bean is in the top right corner.

PERÚ Ministerio del Ambiente **EL PERU AVANZA**
www.mlnam.gob.pe

Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)



The image shows a Biolistic Particle Delivery System (BPDS) gun, which is used for the direct delivery of DNA-coated particles into plant cells. The background features a faint image of a llama and a plant.

PERÚ Ministerio del Ambiente **EL PERU AVANZA**
www.mlnam.gob.pe



Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)

- Método físico de transformación de células mediante el cual se bombardea a éstas con partículas de alta densidad, de tamaño sub-celular que son aceleradas a gran velocidad para introducir ADN dentro de células vivas.
- Fue inicialmente propuesto para su uso con plantas m ahora tiene mayores aplicaciones.

PERÚ Ministerio del Ambiente

EL PERU AVANZA

www.minam.gob.pe



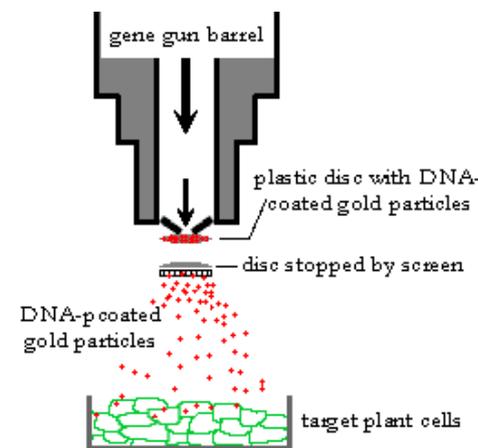
Helios™ Gene Gun (Bio Rad)

PERÚ Ministerio del Ambiente

EL PERU AVANZA

www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)

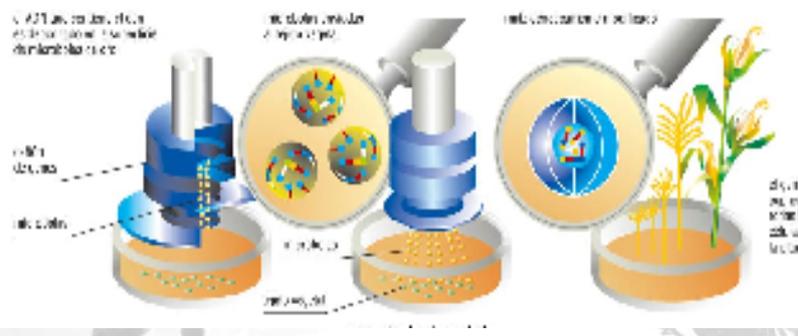


- Emplea partículas de oro recubiertas de ADN, precipitadas en la superficie interna de un disco de plástico, y aceleradas mediante un flujo de helio presurizado.


PERÚ Ministerio del Ambiente

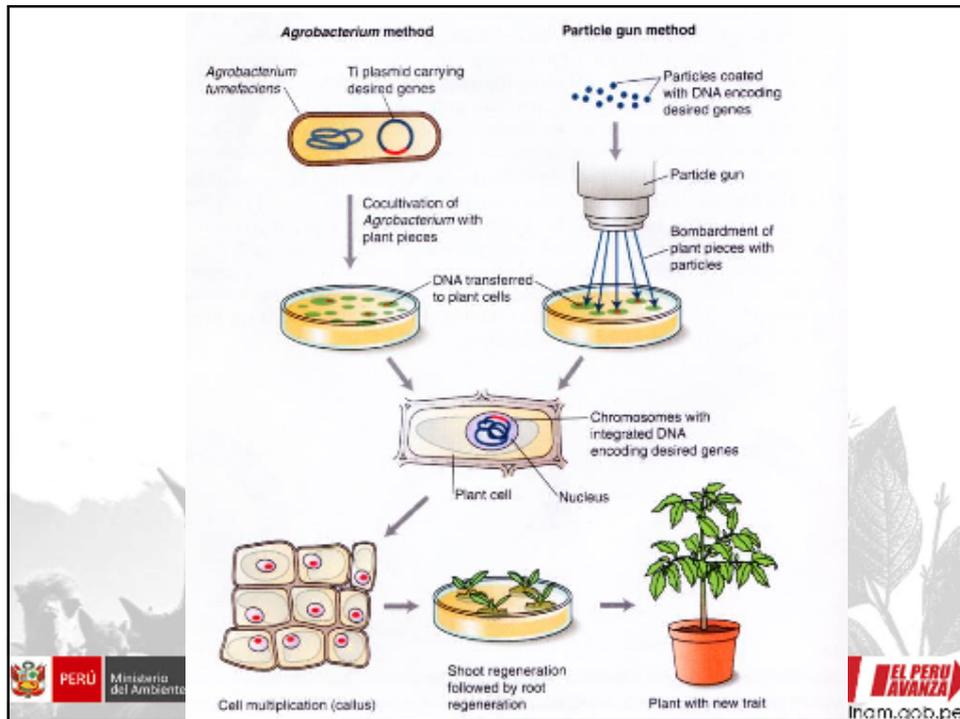

www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por biolística (*Biolistic Particle Delivery System*)




PERÚ Ministerio del Ambiente


www.minam.gob.pe



Etapas en la obtención de un transgén

Transformación genética por electroporación



Transformación genética por electroporación



- La electroporación es un proceso mediante el cual se aplica un campo eléctrico (pulsos) a una célula viva por un pequeño período de tiempo, ocasionando una ruptura transitoria reversible de la membrana celular.
- Esta ruptura transitoria resulta en la formación de poros que permiten que moléculas exógenas (ADN, proteínas o drogas) ingresen a la célula.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Transformación genética por electroporación



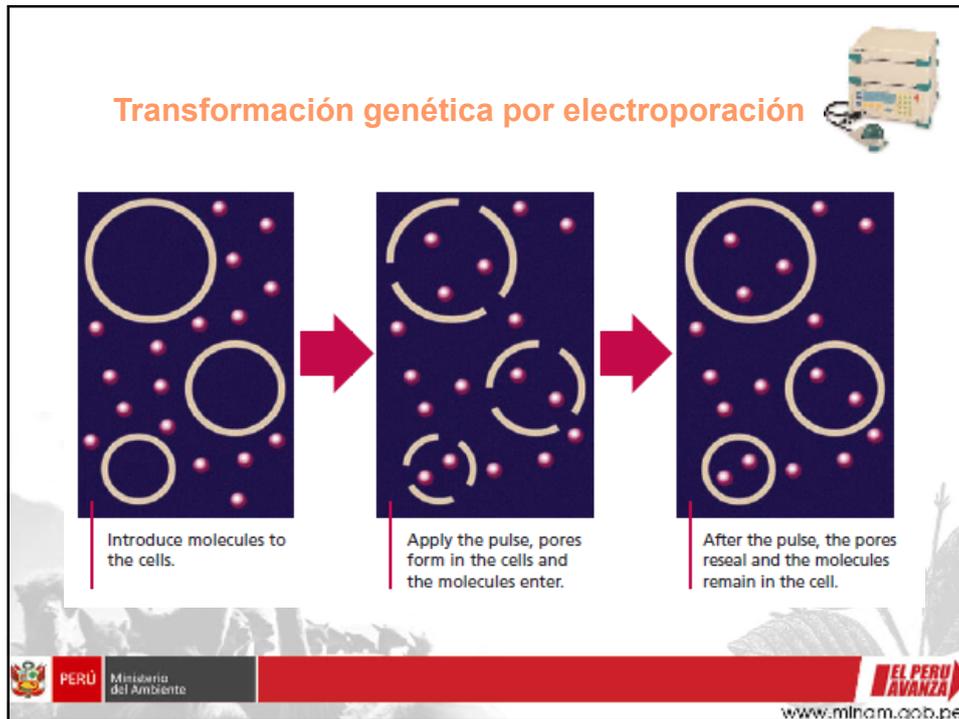
Electroporador: equipo que crea un campo magnético que altera la permeabilidad de las membranas celulares.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe



3. IMPORTANCIA DE LOS TRANSGÉNICOS

- Las generaciones de transgénicos.
- Algunos transgénicos disponibles hoy.



 PERÚ Ministerio del Ambiente  www.minam.gob.pe

Las Generaciones de Transgénicos

1ra Generación: Características introducidas como insumos agrícolas y combate de plagas - plantas *Bt* y plantas RR.



2da Generación: Tecnologías que incluyen productos de calidad mejorada para la nutrición y procesos industriales "ALIMENTOS FUNCIONALES"



3ra Generación: Cultivos o animales utilizados como "biofábricas" para la producción de fármacos (vacunas, enzimas industriales).



PERÚ Ministerio del Ambiente



www.minam.gob.pe

Transgénicos de 1ra Generación

Resistencia a las plagas:

... la resistencia a los insectos (Maíz *Bt*.)
Es una combinación de resistencia al taladro y al herbicida glifosato. Incorpora el gen de la endotoxina - *Bt* ("*Bacillus thuringiensis*").

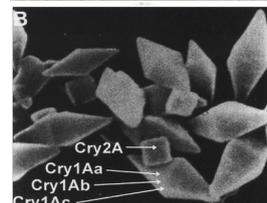
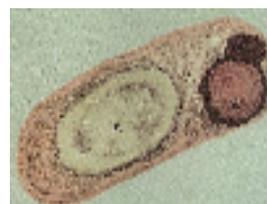
Aplicaciones:

Alimento para animales.

Grasas comestibles: Margarina, aceites.

Edulcorantes: Bebidas de frutas, cereales y helados.

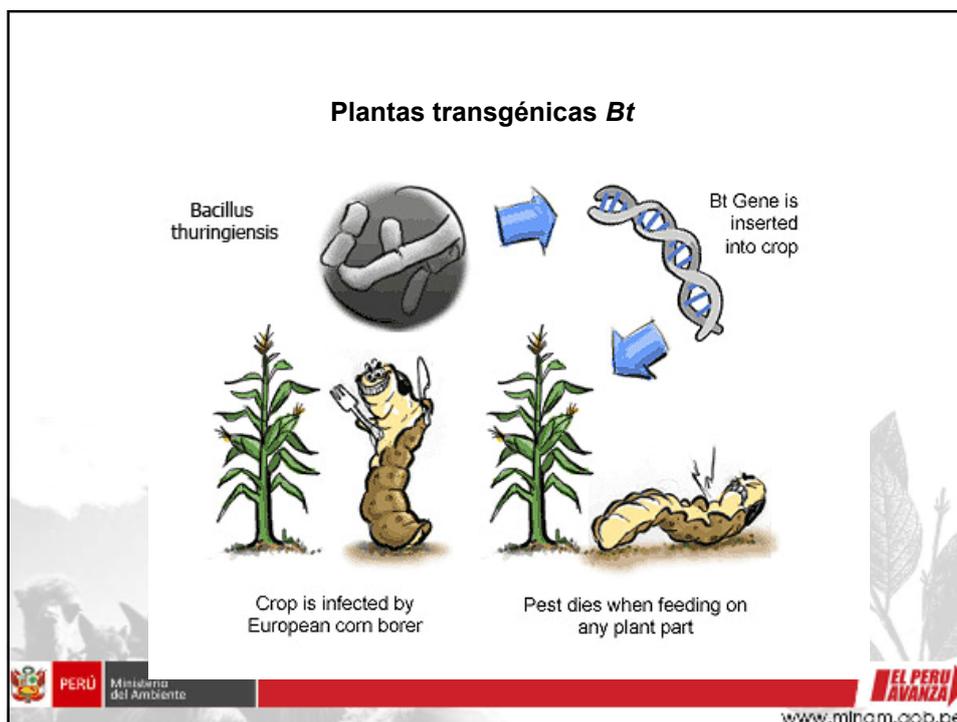
Maíz molido: Harina, copos de maíz.



PERÚ Ministerio del Ambiente



www.minam.gob.pe



Plantas / Líneas transgénicas Bt

Planta / Línea transgénica	Compañía	Descripción
Algodón MON831/57/10/6	Monsanto	- Algodón resistente a insectos plaga, expresa el gen <i>cryIAb</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (ID 73).
Maíz Fuent 176	Syngenta Seeds	- Maíz resistente a insectos plaga, expresa el gen <i>cryIAb</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> . Esta modificación le brinda protección frente al ataque del barrenador europeo del maíz (<i>Ostrinia nubilalis</i>).
Maíz D111 (X4334CUR, X4734CUR)	Syngenta Seeds	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, expresa el gen <i>cryIAb</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosforotransferasa N acetiltransferasa de <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> .
Maíz D11410	Dekalb Genetics	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, expresa el gen <i>cryIAb</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosforotransferasa N acetiltransferasa de <i>S. sclerotiorum</i> .
Maíz MON810	Monsanto	- Maíz resistente a insectos plaga, expresa un gen <i>cryIAb</i> truncado de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> (ID 1). Esta modificación le brinda protección frente al ataque del barrenador europeo del maíz (<i>O. nubilalis</i>).
Maíz MON-D2605-5 x MON 810/10 G	Monsanto	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, derivado del cruzamiento de las líneas parentales NK603 y MON810.
Maíz TC1507	Mycogen	- Maíz resistente a insectos plaga y tolerante a herbicida, expresa el gen <i>cryIAb</i> de <i>B. thuringiensis</i> var. <i>kurstaki</i> y el gen de la fosforotransferasa N acetiltransferasa de <i>S. sclerotiorum</i> .

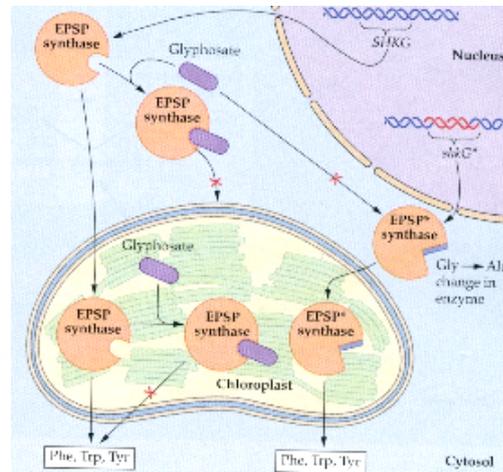
www.mlnam.gob.pe

Transgénicos de 1ra Generación

Tolerancia a Herbicidas:

La soja "Roundup Ready" contiene un gen bacteriano que codifica la enzima 5-enolpiruvil-shikimato-3-fosfato sintetasa, que participa en la síntesis de los a.a. aromáticos. El vegetal que no contiene dicho gen, es inhibido por el glifosato, de ahí su acción herbicida.

Aplicaciones:
harina, concentrados proteicos,
lecitinas, aceite,...



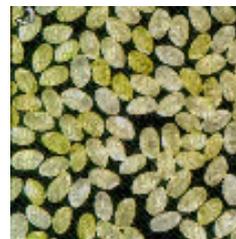
www.mlnam.gob.pe

Transgénicos de 2da Generación

Golden Rice



Arroz convencional



Arroz transgénico enriquecido con pro-vitamina A



www.mlnam.gob.pe

Estado de los Cultivos Transgénicos en el Mundo

Para el año 2009:

- Soya, 69 millones de ha TH (77% área total)
- Algodón, 16 millones de ha Bt/HT (49% área total)
- Maíz, 41 millones de ha HT/bt (26% área total)
- Canola, 6 millones de ha HT (21% área total)

HT = Tolerante a herbicidas

Bt = *Bacillus thuringiensis*

Fuente: Rodríguez- Cerezo. 2010. GM crops in the global pipeline.



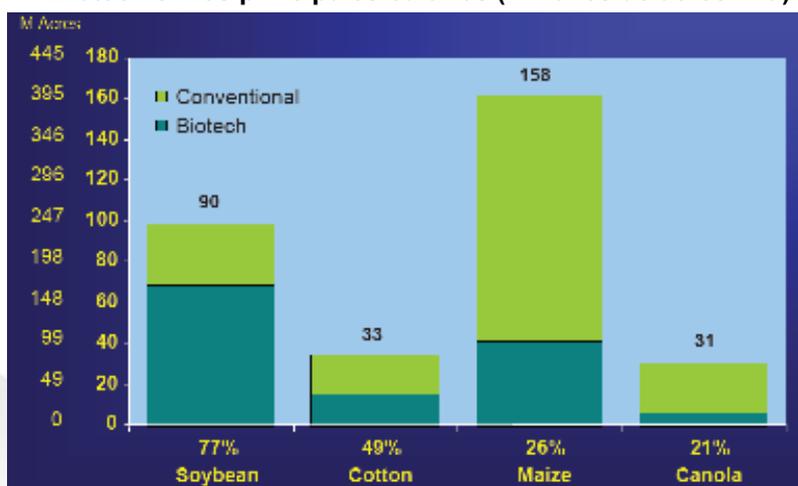
PERÚ
Ministerio del Ambiente



39

www.mlnam.gob.pe

Áreas cultivadas convencionales comparadas con áreas Biotech en los principales cultivos (Millones de acres / ha)



Stein & Rodríguez- Cerezo. 2009. The global pipeline of new GM crops.

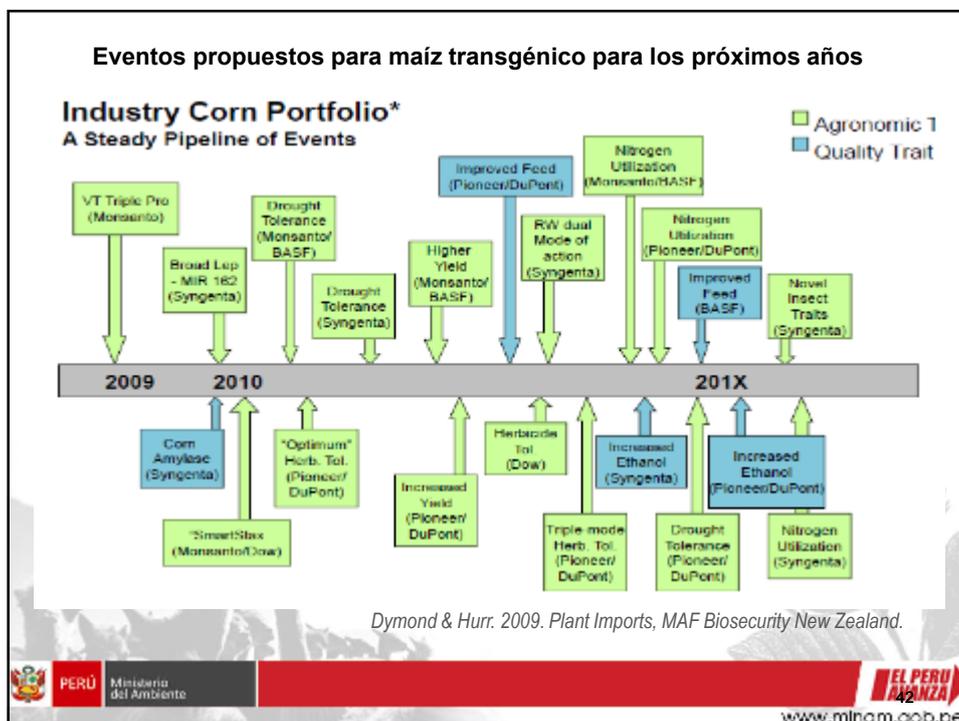
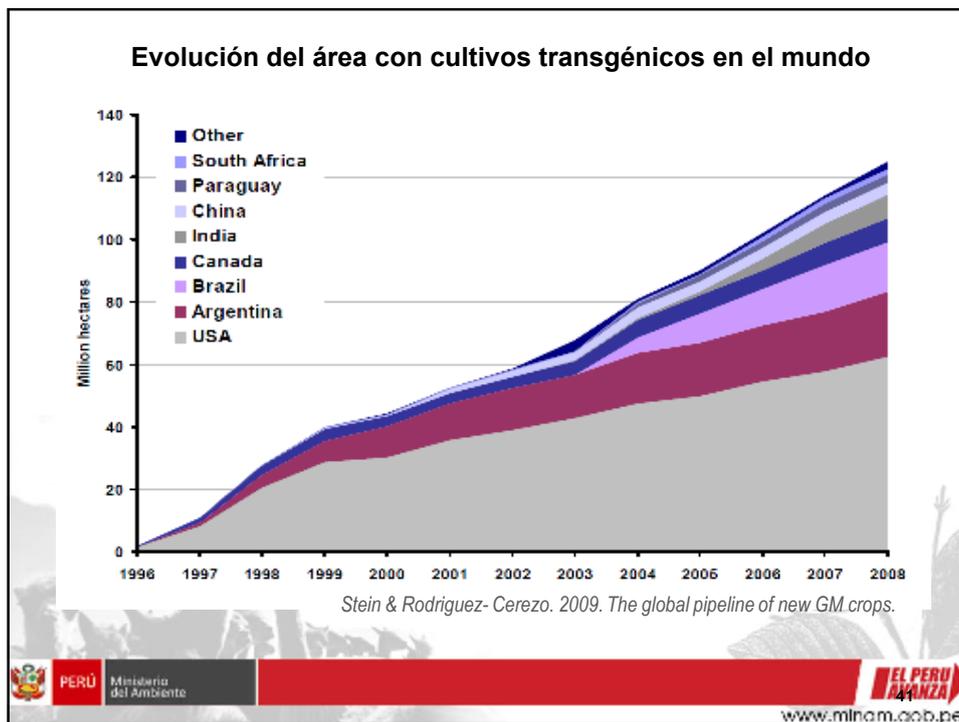


PERÚ
Ministerio del Ambiente



40

www.mlnam.gob.pe



Transgénicos de 3ra Generación

En animales domésticos:

Producción de grandes cantidades de vacunas para animales domésticos que pueden ser más seguras que las vacunas tradicionales.

Pruebas para diagnóstico de enfermedades y defectos genéticos.

Producción de somatotropina recombinante produce animales con menor cantidad de grasa y aumento de la producción de leche.



PERÚ
Ministerio del Ambiente



www.minam.gob.pe

Algunos transgénicos disponibles hoy

OVGM	Modificación	Fuente del gen	Propósito de la Modificación
Maiz	Resistencia a Insectos	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Reducir el daño por insectos
Soya	Tolerancia a Herbicidas	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Control de malezas (hierbas)
Algodón	Resistencia a Insectos	<i>Bacillus thuringiensis</i>	Reducir el daño por insectos
Escherichia coli K12	Producción de Renina	Vacas	Producción de Queso



PERÚ
Ministerio del Ambiente



www.minam.gob.pe

Algunos transgénicos disponibles hoy

OVGM	Modificación	Fuente del gen	Proposito de la Modificación
Salmon	Hormona del crecimiento	salmon	Aumentar el crecimiento
Eucaliptus	Modificación de la lignina	Pinus sp.	Procesamiento de pulpa
Arroz	caroteno	Daffodil Erwina	Suplir deficit de Vitamina A
Oveja	Expresión de Anticuerpos en la leche	H. Sapiens	Leche Fortificada.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

4. DETECCIÓN DE OVMS

Se requiere contar con metodologías que permitan realizar la detección e identificación de eventos transgénicos de manera sensible, reproducible, rápida y de bajo costo.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

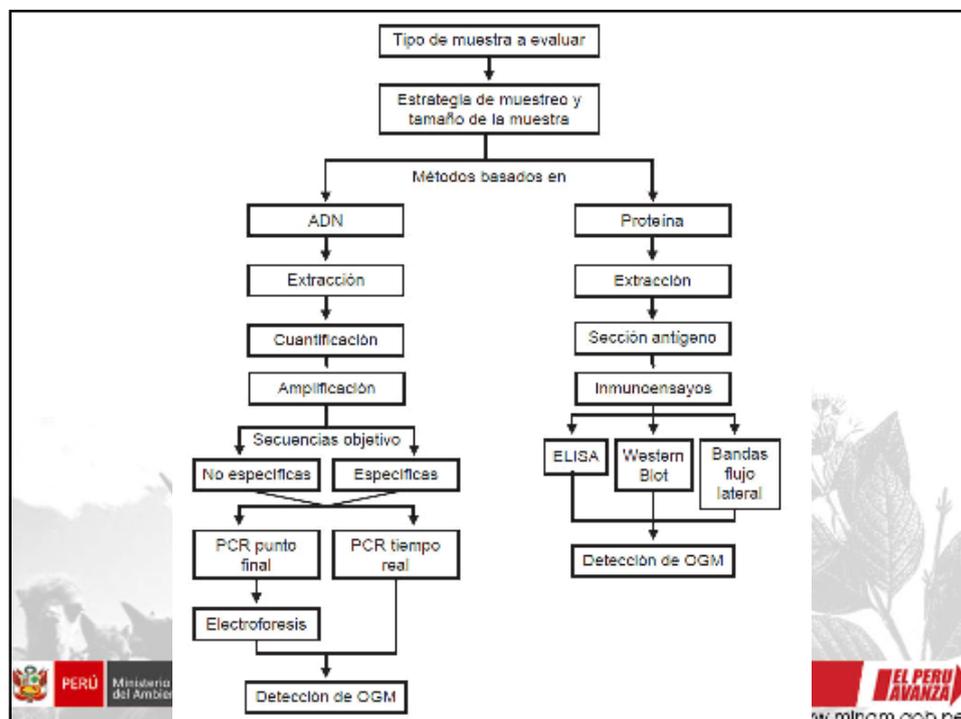
4. DETECCIÓN DE OVMS

1. Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

- ELISA (Ensayo de inmunodetección)
- Strips o tiras reactivas
- Western Blot

2. Detección del ADN de los OVMS

- PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

- Esta metodología se basa en el reconocimiento específico de una porción de proteína expresada por el OVM mediante un anticuerpo, recreando una respuesta inmune.
- Puede permitir la detección específica de determinado anticuerpo por un epítoto único.
- Alta especificidad.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

ELISA "Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay"

- Básicamente, esta prueba es una reacción antígeno-anticuerpo que se lleva a cabo en una fase sólida (placa de 96 pozos).
- El antígeno-anticuerpo reacciona y produce un complejo estable que puede ser visualizado por la adición de un segundo anticuerpo unido a una enzima.
- La adición de un sustrato que reacciona con la enzima resulta en una formación de color, que puede ser medida fotométricamente.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Kit de ELISA



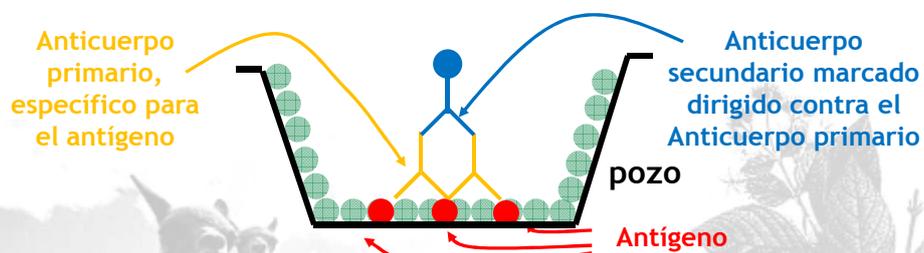
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

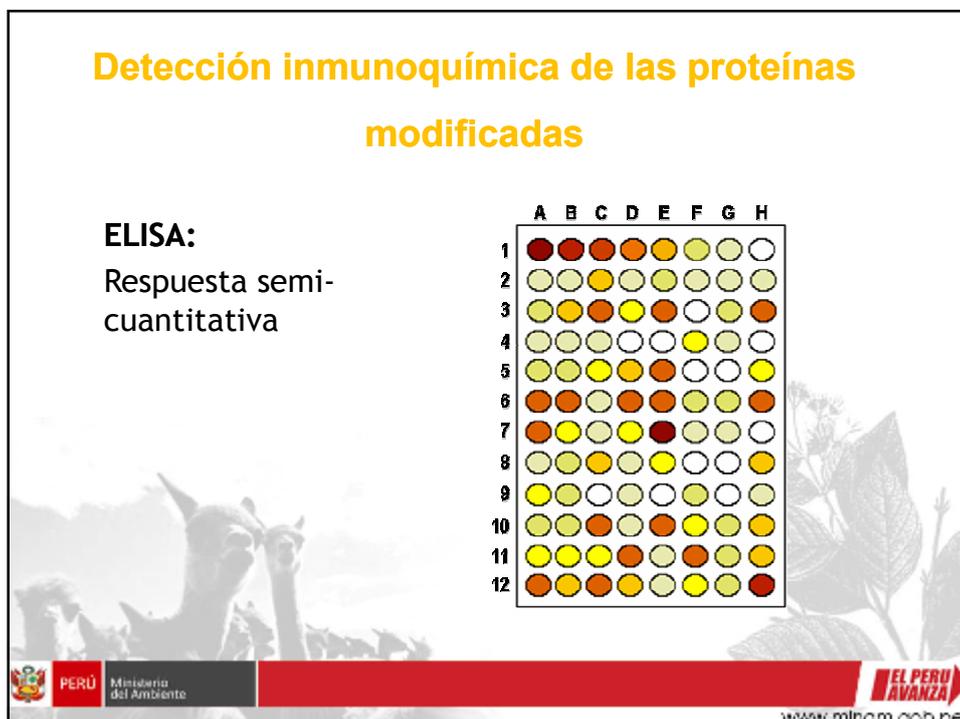
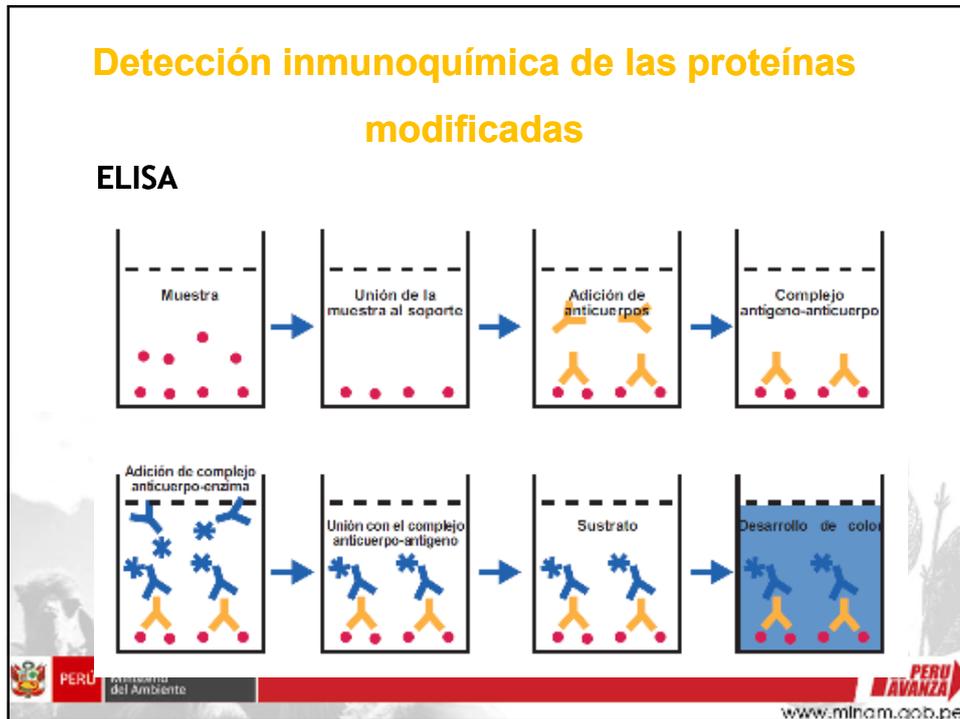
ELISA



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



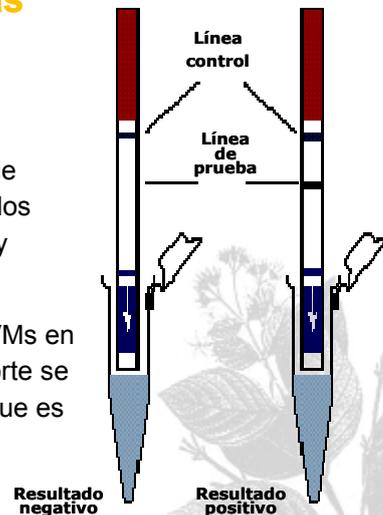
www.minam.gob.pe



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

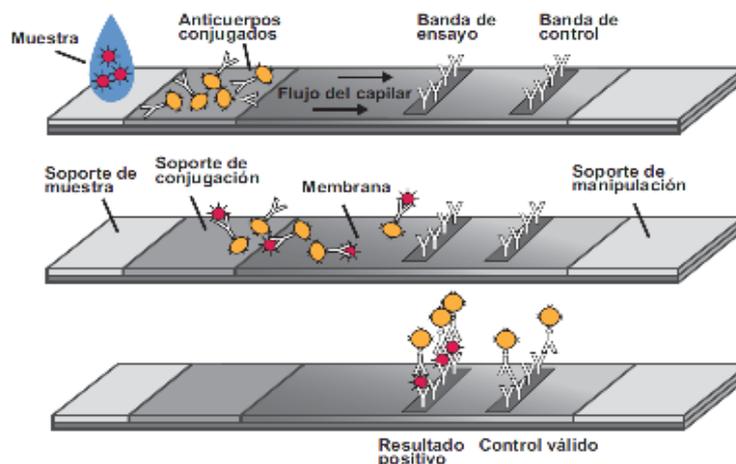
Tiras de flujo lateral

- Variación comercial de las pruebas de ELISA que permiten obtener resultados semi cuantitativos de forma sencilla y rápida.
- Se emplean para la detección de OVMs en hojas, semillas y granos. Como soporte se emplean tiras de papel o plásticas, que es donde ocurre la reacción.



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Tiras de flujo lateral



Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Western Blot

Es un método altamente específico que permite determinar si la muestra contiene la proteína objetivo, eficiente con proteínas insolubles.

Se basa en la separación de proteínas de una muestra en función de su tamaño mediante electroforesis y posterior detección mediante anticuerpos específicos para la proteína.



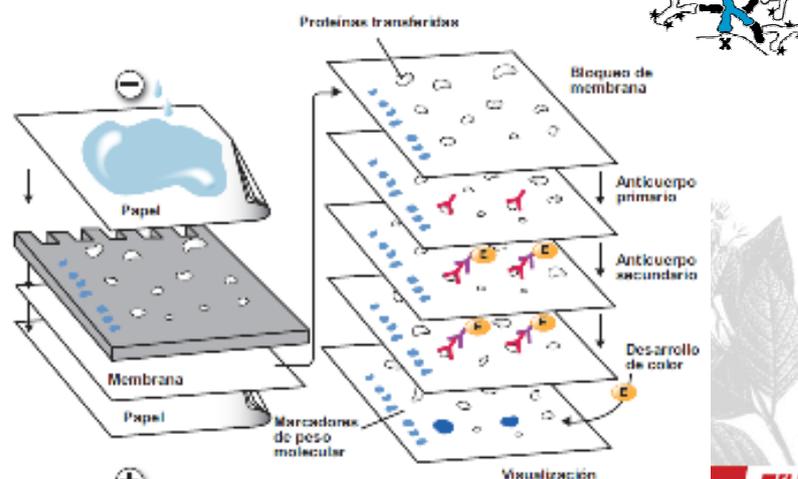
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Western Blot



PERÚ



www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Ventajas

- No requiere mucha preparación de la muestra.
- Ensayo relativamente rápido (2-4 horas, incluyendo preparación de la muestra).
- Produce resultados cualitativos o semi-cuantitativos.
- Costo relativamente bajo.
- Aplicable para el análisis de muestras numerosas.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

Desventajas

- Faltan anticuerpos relevantes para los diversos eventos OVM.
- Pueden producirse falsos positivos debido a contaminación cruzada por otros componentes derivados de la muestra analizada.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección del ADN de los OVMs

- La detección de una secuencia específica de ADN es uno de los métodos más utilizados para la identificación y cuantificación de OVMs y sus productos derivados.
- Los métodos que permiten la detección cualitativa, semicuantitativa o cuantitativa de OVMs.
- Se emplea la tecnología de la PCR, ya sea en punto final (convencional) o en tiempo real.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección del ADN de los OVMs

- **Primers no específicos de evento:** diseñados sobre secuencias presentes en la mayoría de las construcciones vegetales (promotores, terminadores, etc), por lo tanto, permiten detectar varios eventos.
- **Primers específicos de evento:** diseñados sobre el inserto y sobre una región genómica adyacente, por lo tanto, permiten detectar un sólo evento.
- **Primers específicos:** diseñados usualmente sobre la secuencia codificante del transgén, permiten detectar uno o pocos eventos.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Detección del ADN de los OVMs

PCR Multiplex

- Variación de la técnica de PCR en la cual se usan dos o más sets de primers en un único tubo de mezcla.
- Tiene por objetivo lograr la amplificación simultánea de múltiples segmentos de ADN.
- Debe ser estandarizado.



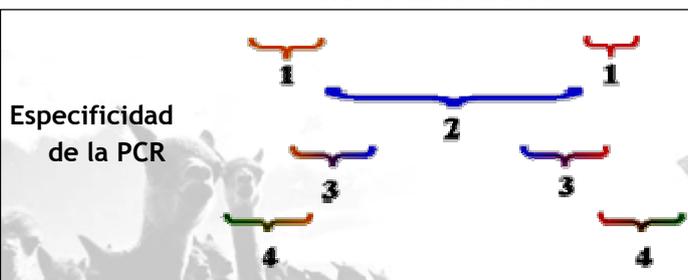
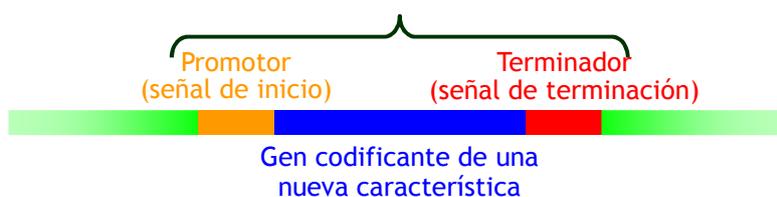
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.mlnam.gob.pe

Detección del ADN de los OVMs

Construcción Génica



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.mlnam.gob.pe

EVENTO T14/T25 LIBERTY LINK MAIZE (TOLERANTE A HERBICIDA)

Nucleic Acid - Based Method
For Exogenous Gene:

Strategy	Method Type	Primer Name	Amplicon	Probe Type	Validation Info	Standard
Screening	Qualitative	sF / sR	79bp			
		CM01 / CM02	220bp			
		T35S 1-5 / T35S 4-3	84bp			
	Quantitative	p35S 1-5 / p35S 1-3	101bp			
		35S-promoter.for / 35S-promoter.rev	68bp	TaqMan		
		P35S 1-5 / P35S1-3	101bp	TaqMan		
Gene-Specific	Chip	T-35S_29-L / T-35S_29-R	134bp			
	Quantitative	pat1.5 / pat1.3	161bp			
Construct-Specific	Qualitative	2F / 2R	262bp			
		KVM-5 / KVM-6	68bp	TaqMan		
		T25 2-5 / T25 2-3	311bp			
		CM01 / PA01	400bp			
		P35S 1-5 / T35S 1-3	800bp			
	Quantitative	T25 1-5 / T35S 4-3	200bp			
		T25-F7 / T25-R3	209bp		Yes	ISO&National
		CM03 / PA01	231bp		Yes	National
		T25 1-5 / T25 1-3	149bp			
		T25 1-5 / T25 1-3	149bp	TaqMan	Yes	National
Event-Specific	Quantitative	T25-F / T25-R	83bp	TaqMan		
		89_12-L / 89_12-R	106bp	TaqMan		
	PM1 / revPM1	155bp	TaqMan			
	Chip	MLD143 / MDB551	Unknown	TaqMan	Yes	
		89_100-L / 89_100-R	149bp			

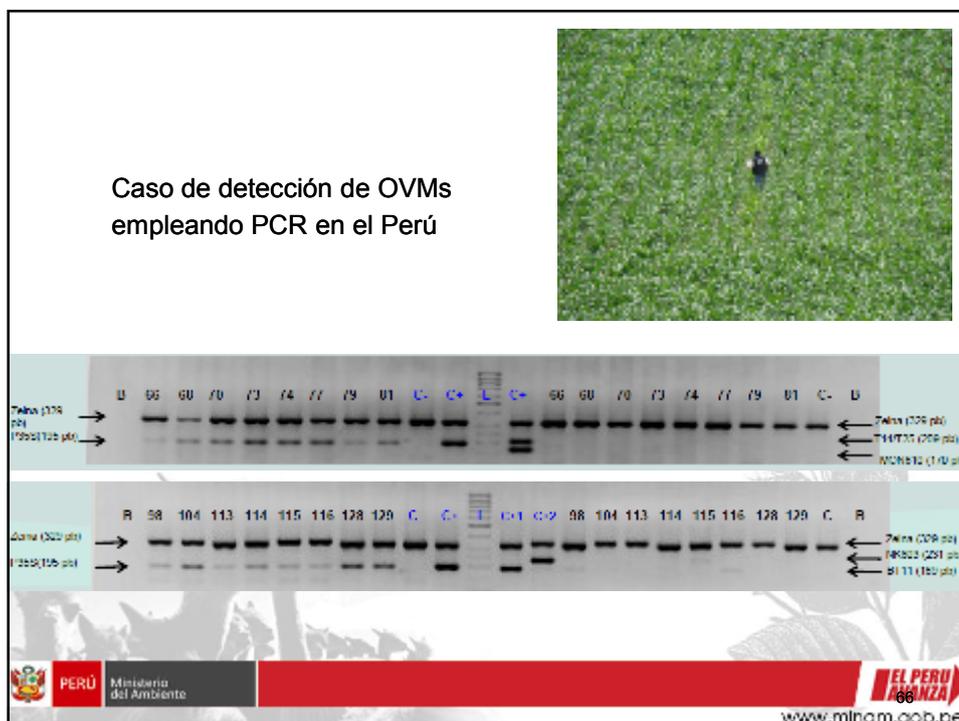


PERÚ Ministerio del Ambiente

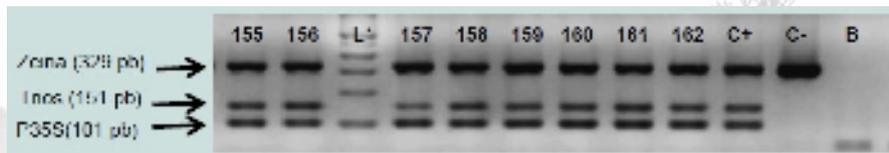


EL PERU PIURAZA

www.minam.gob.pe



Caso de detección de OVMs
empleando PCR en el Perú



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

GRACIAS

Correo electrónico de contacto

eyglesias@minam.gob.pe



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe