



Modulo Didáctico BIOTECNOLOGIAS, TRANSGENICOS Y BIOSEGURIDAD

Cusco, 19-20 de agosto de 2010

“TRANSGÉNICOS”

Eliana Yglesias Gálvez
Dirección General de Diversidad Biológica



PERÚ Ministerio del Ambiente www.minam.gob.pe

TRANSGÉNICOS

1. Definiciones y conceptos básicos
2. Métodos de obtención
3. Las generaciones de transgénicos
4. Detección de OVMs



PERÚ Ministerio del Ambiente www.minam.gob.pe

DEFINICIONES Y CONCEPTOS BÁSICOS

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



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.



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.

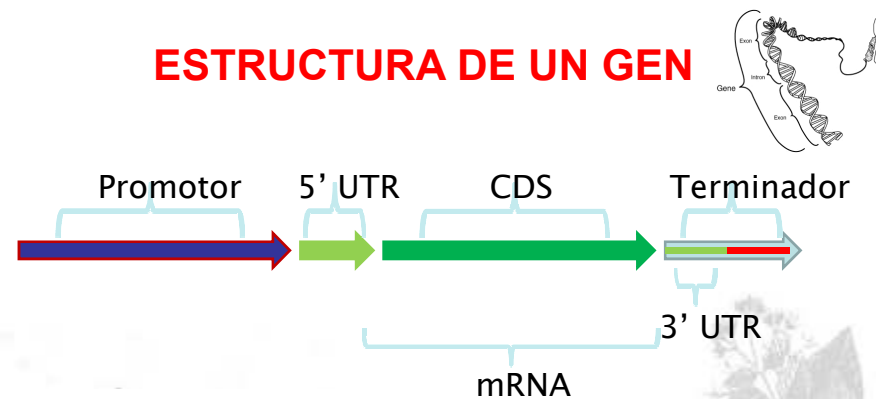


Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ESTRUCTURA DE UN GEN



Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

¿QUE ES UN TRANSGEN?

- 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 TRANSGEN

Su origen puede ser :

- Vegetal
- Animal
- Microbiano
- Sintético



ETAPAS EN LA OBTENCIÓN DEL TRANSGEN

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



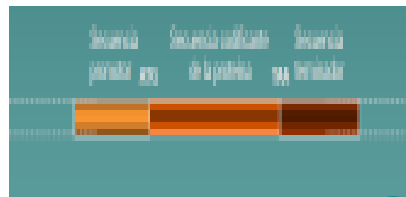
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCIÓN DE UN TRANSGEN

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



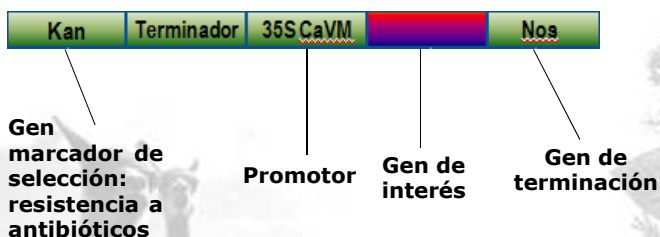
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

Construcción del transgén (“constructo”)



Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

Construcción del transgén (“constructo”)



- 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.



Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

Construcción del transgén (“constructo”)

35S CaVM

- 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 OBTENCION DE UN TRANSGEN

Construcción del transgen (“constructo”)



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



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

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



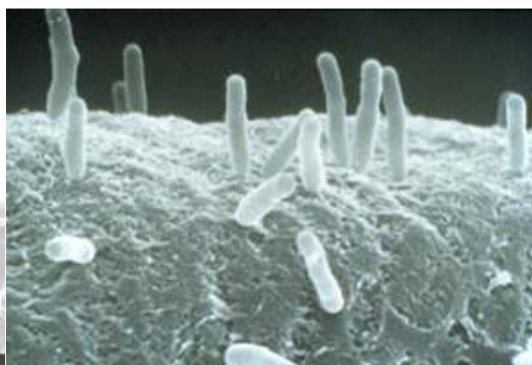
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

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



EL PERÚ
AVANZA

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



EL PERÚ
AVANZA

www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



- Durante el proceso de infección *Agrobacterium* introduce en la célula vegetal una parte de su ADN (ADN-T, de transferencia).
- Los genes ADN-T son integrados a la planta y su expresión induce la formación de tumores y la síntesis de opinas (derivados de aminoácidos) que la bacteria provecha.
- El ADN-T está localizado en el plásmido Ti (Plásmido inductor de tumor).

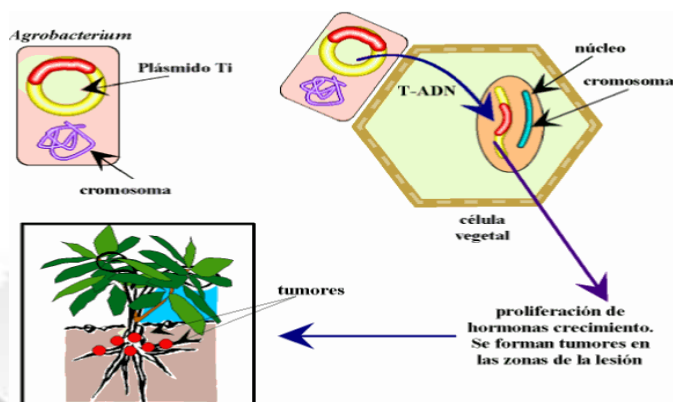


PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*

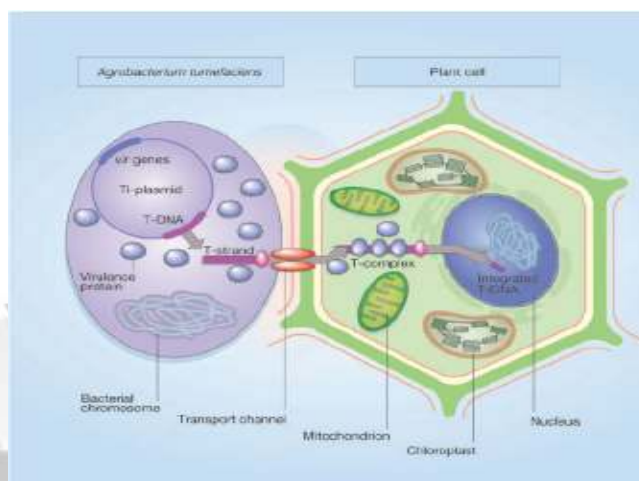


PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Transformación genética mediada por *Agrobacterium*



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

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



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.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.

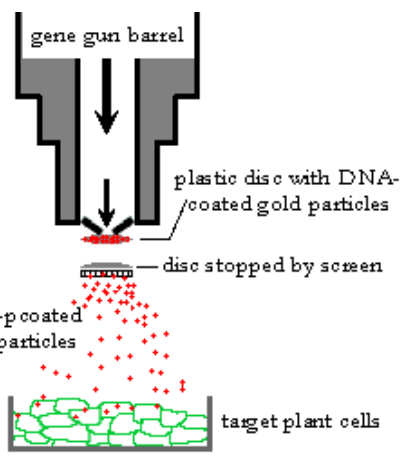
 **PERÚ** Ministerio del Ambiente  www.minam.gob.pe

Helios™ Gene Gun (Bio Rad)



 **PERÚ** Ministerio del Ambiente  www.minam.gob.pe

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

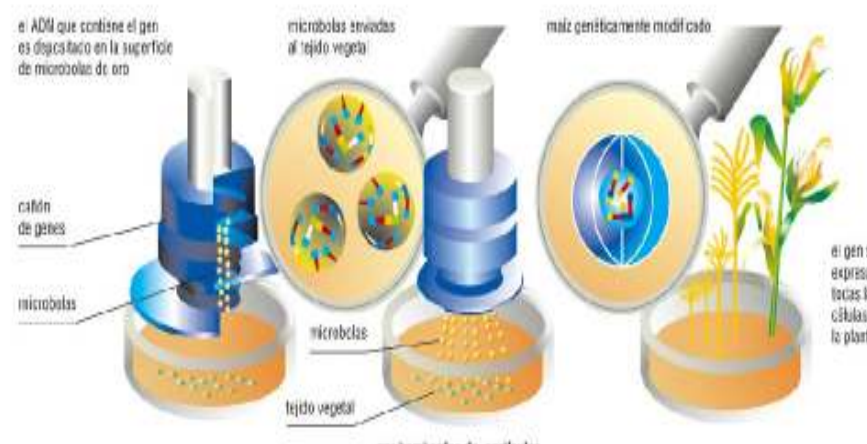


- Emplea partículas de oro recubiertas con ADN, precipitadas en la superficie interna de un disco de plástico, y aceleradas mediante un flujo de helio presurizado.

Labels in diagram: gene gun barrel, plastic disc with DNA-coated gold particles, disc stopped by screen, DNA-coated gold particles, target plant cells.

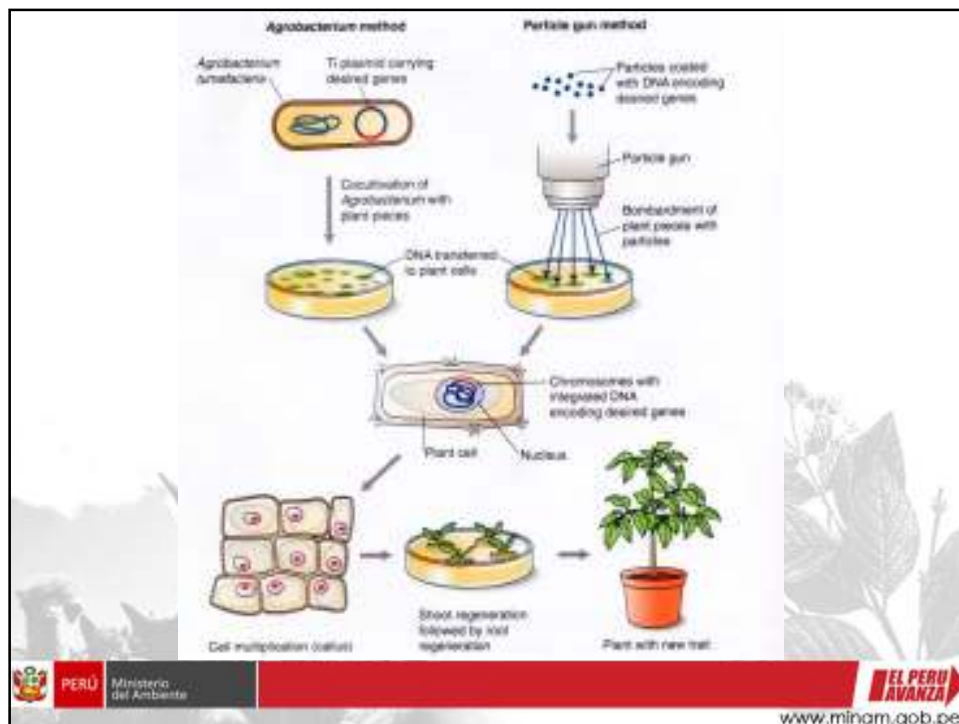
PERÚ Ministerio del Ambiente AVANZA www.minam.gob.pe

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



Labels in diagram: catión de genes, microbolas, microbolas empujadas al tejido vegetal, tejido vegetal, maíz genéticamente modificado, el gen se expresa en todas las células de la planta.

PERÚ Ministerio del Ambiente EL PERÚ AVANZA www.minam.gob.pe



ETAPAS EN LA OBTENCION DE UN TRANSGEN

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.



Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Transformación genética por electroporación



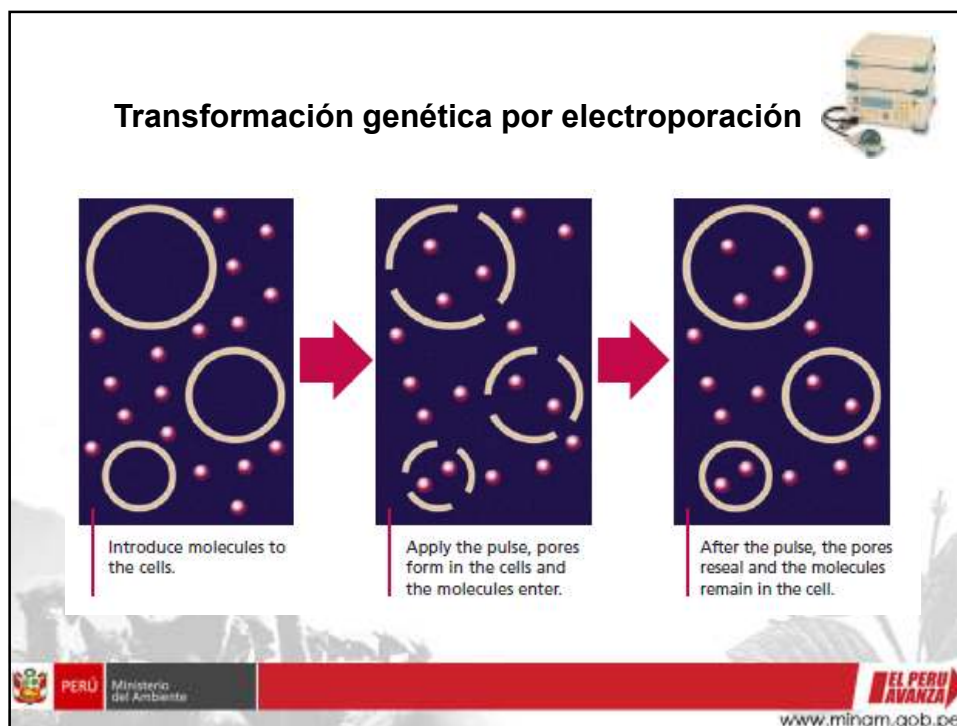
- Electroporador:
equipo que crea un
campo magnético
que altera la
permeabilidad de las
membranas
celulares.



Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe



LAS GENERACIONES DE TRANSGENICOS

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).



The images show coconuts, soybeans, and rice, representing different types of agricultural products.

PERÚ Ministerio del Ambiente

EL PERU AVANZA

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*").

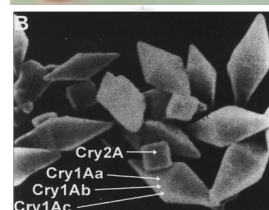
Aplicaciones:

Alimento para animales

Grasas comestibles: Margarina, aceites

Edulcorantes: Bebidas de frutas, cereales y helados.

Maíz molido: Harina, copos de maíz.

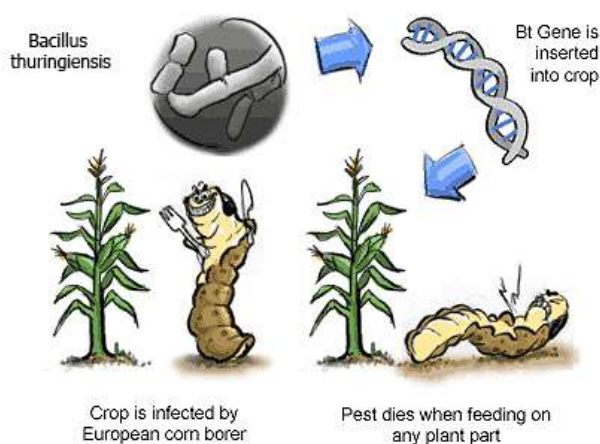


PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Plantas transgénicas *Bt*



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



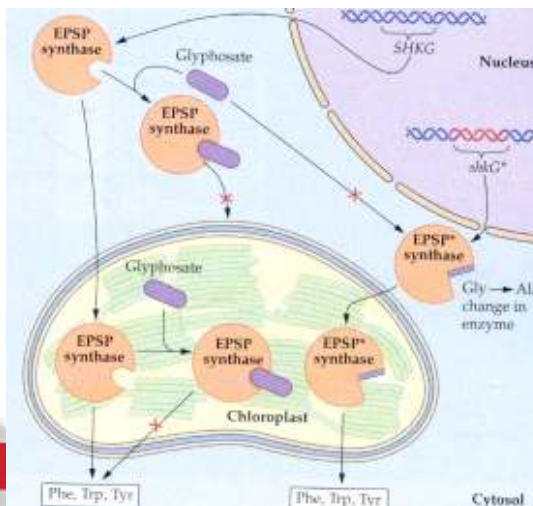
www.minam.gob.pe

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,...



PERÚ

Ministerio
del Ambiente

Transgénicos de 2da Generación

Golden Rice

La deficiencia de vitamina A causa ceguera
en 200 millones de personas

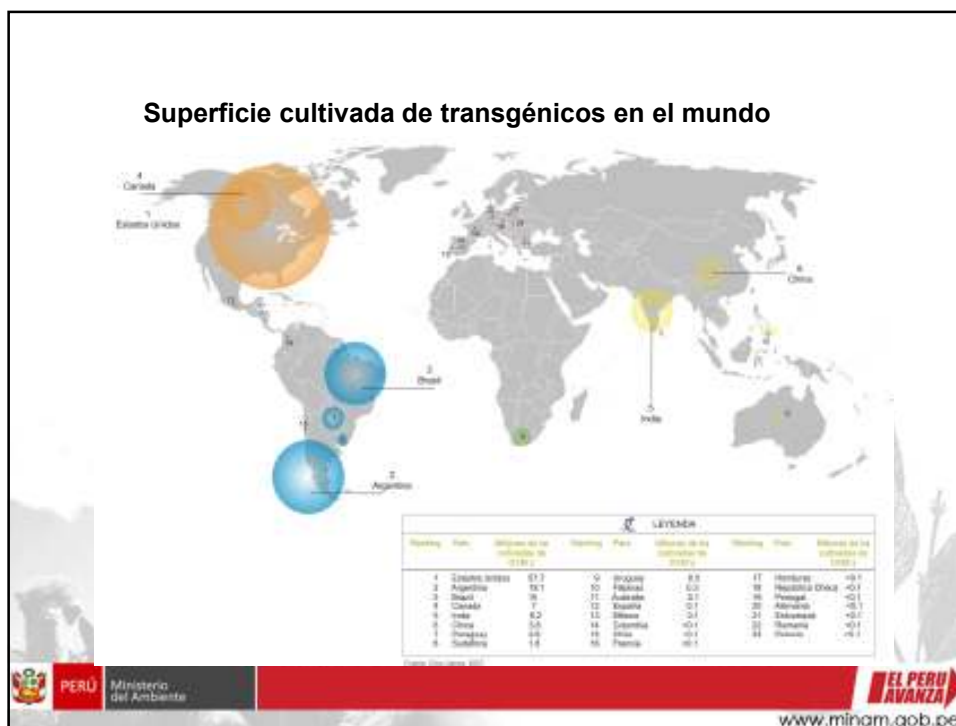


Arroz transgénico enriquecido
con pro-vitamina A



EL PERÚ
AVANZA

www.minam.gob.pe



Algunos transgénicos disponibles hoy

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

DETECCION 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

DETECCION DE OVMs

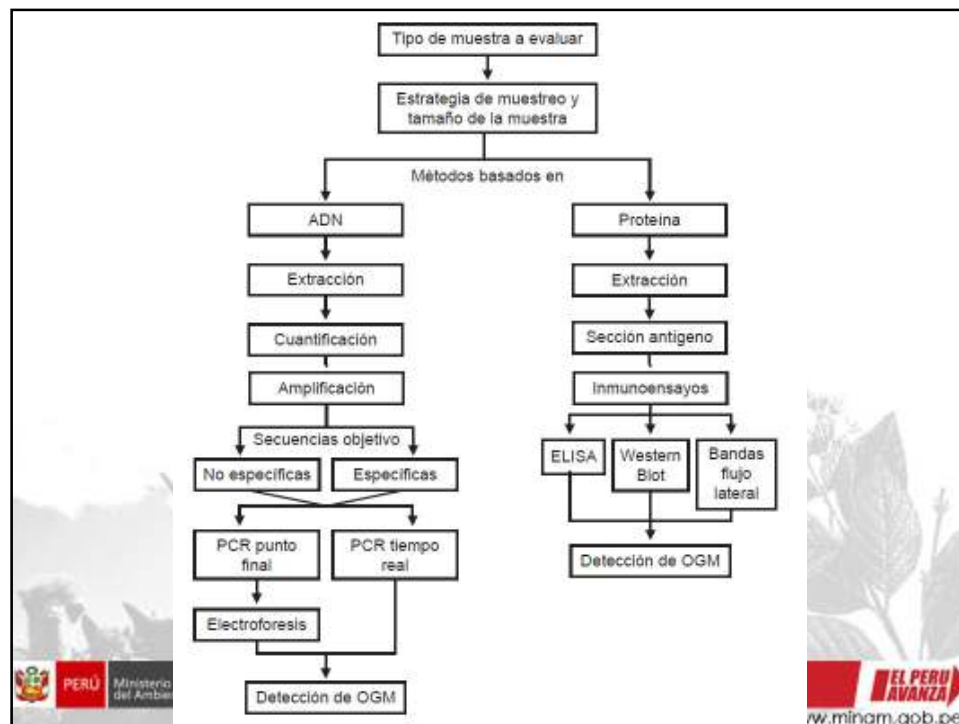
1. Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas
 - ELISA (Ensayo de inmunodetección)
 - Strips o tiras reactivas
 - Western Blot
2. Detección del ADN de los OVMs
 - PCR (Reacción en cadena de la Polimerasa)



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe



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 epítipo único.
- Alta especificidad.

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.



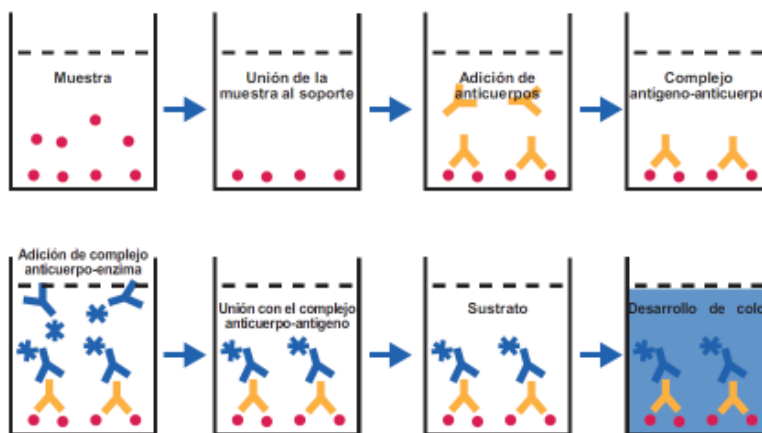
PERÚ
Ministerio
del Ambiente



EL PERU AVANZA
www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

ELISA



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



EL PERU AVANZA
www.minam.gob.pe

Detección inmunoquímica de las proteínas modificadas

ELISA



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 semicuantitativos de forma sencilla y rápida.

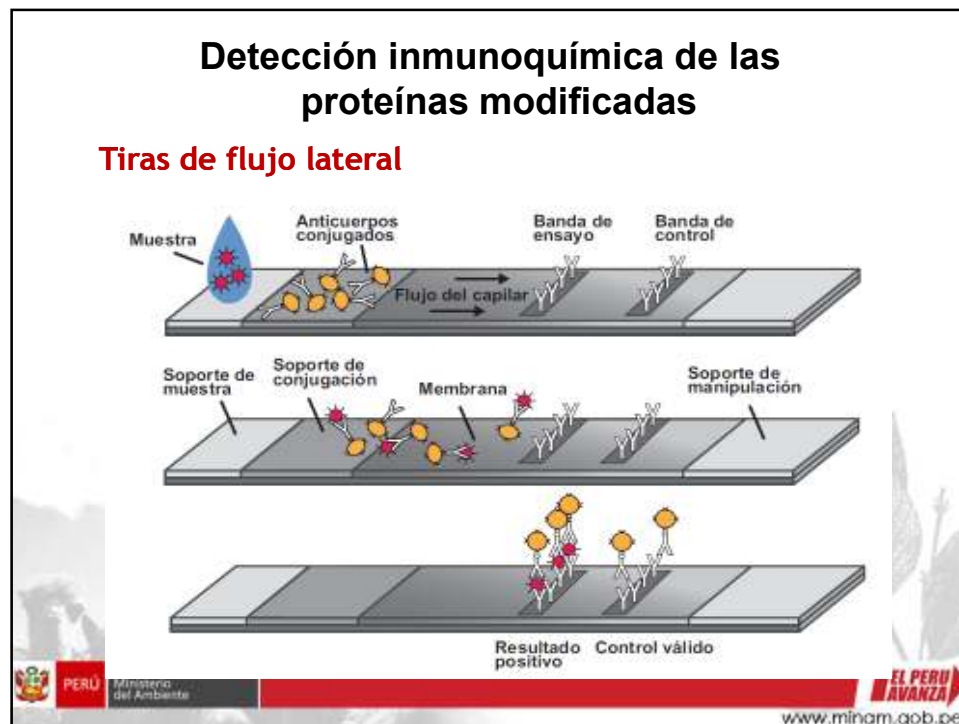
Se emplean para la detección de OVMs en hojas, semillas y granos. Como soporte se emplean tiras de papel o plásticas, que es donde ocurre la reacción.



Ministerio
del Ambiente



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.

Logos: PERÚ Ministerio del Ambiente, EL PERU AVANZA, 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 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.

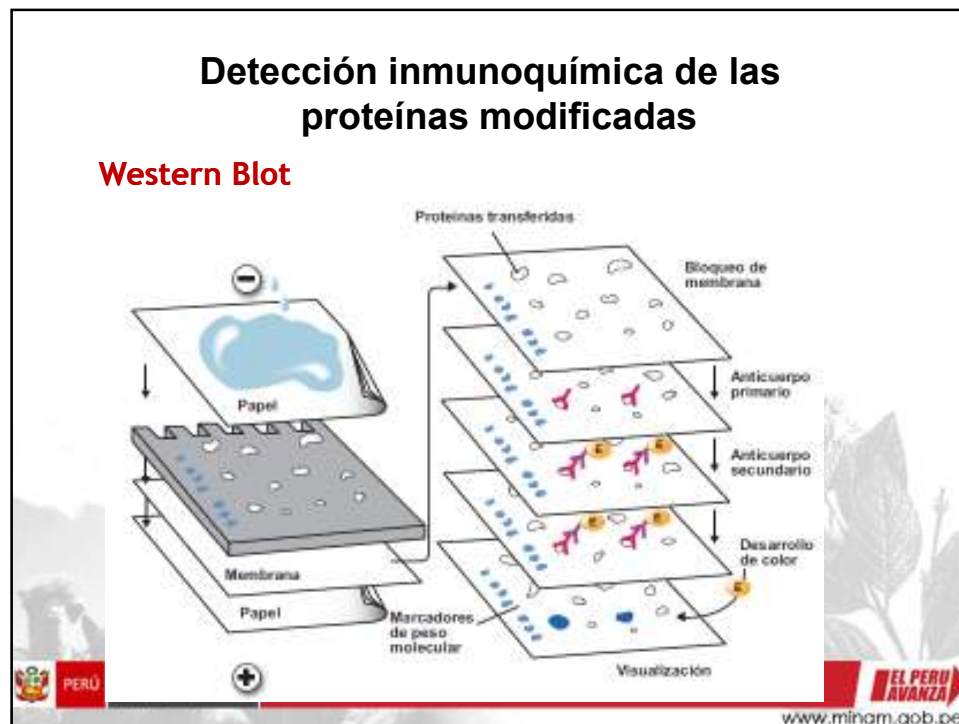
Se basa en la separación de proteínas de una muestra en función de su tamaño mediante electroforesis y posterior detección mediante anticuerpos específicos para la proteína.



PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe



Detección 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.

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

PCR Multiplex

- Variación de la técnica de PCR en la cual se usan dos o mas 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.minam.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			
	Quantitative	T35S 1-5 / T35S 4-3	84bp			
		p35S 1-5 / p35S 1-3	101bp			
	Chip	35S-promoter.for / 35S-promoter.rev	68bp	TaqMan		
Gene-Specific	Qualitative	P35S 1-5 / P35S1-3	101bp	TaqMan		
		T-35S_29-L / T-35S_29-R	134bp			
	Quantitative	pat1-5 / pat1-3	161bp			
		2F / 2R	262bp			
	Chip	KVM-5 / KVM-6	68bp	TaqMan		
Construct-Specific	Qualitative	T25 2-5 / T25 2-3	311bp			
		CM01 / PA01	400bp			
		P35S 1-5 / T35S 1-3	800bp			
		T25 1-5 / T35S 4-3	200bp			
		T25-F7 / T25-R3	209bp		Yes	ISO&National
	Quantitative	CM03 / PA01	231bp		Yes	National
		T25 1-5 / T25 1-3	149bp			
		T25 1-5 / T25 1-3	149bp	TaqMan	Yes	National
		T25-F / T25-R	83bp	TaqMan		
		89_12-L / 89_12-R	106bp	TaqMan		
Event-Specific	Quantitative	PM1 / revPM1	155bp	TaqMan		
		MLD143 / MDB551	Unknown	TaqMan	Yes	
	Chip	89_100-L / 89_100-R	149bp			

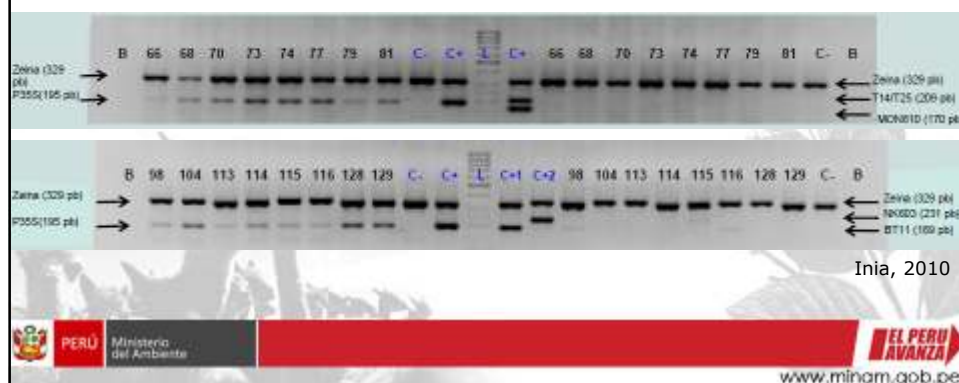
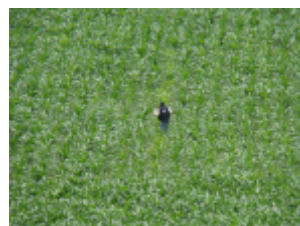


PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Ejemplo de detección
empleando PCR

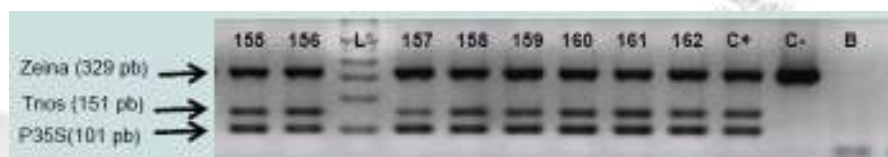


PERÚ
Ministerio
del Ambiente



www.minam.gob.pe

Ejemplo de detección
empleando PCR



Inia, 2010



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