

CICLO DE SEMINARIOS
“NUEVAS TÉCNICAS DE
MEJORAMIENTO GENÉTICO
EN PLANTAS”



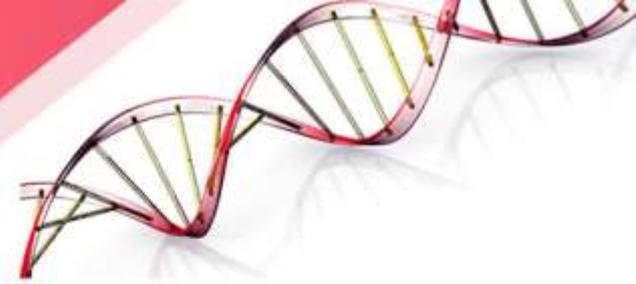
CIBIOGEM

MUTAGÉNESIS DIRIGIDA POR OLIGONUCLEÓTIDOS (ODM)



Dvorak Montiel Condado, Ph. D
Profesor Tiempo Completo
Facultad de Ciencias Biológicas, UANL.

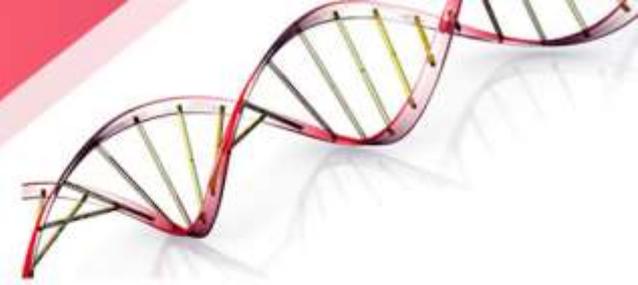
Mejoramiento Genético 1



- El hombre ha seleccionado y modificado a las plantas.
- Más de 10,000 años.
- Fomento del avance de la Ciencia y Tecnología.



Mejoramiento Genético 2



Selección artificial

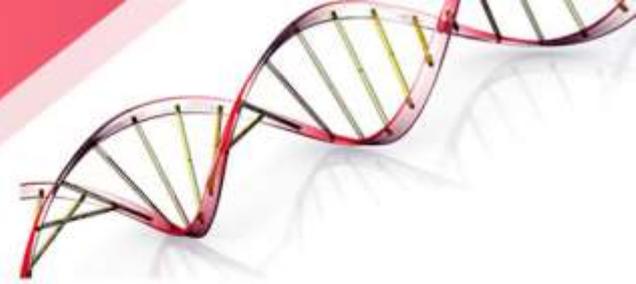
“Cross the best with the best and hope for the best”



Ingeniería Genética

Reduce costos e incrementa rendimientos

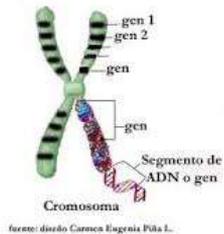
Diversidad Genética



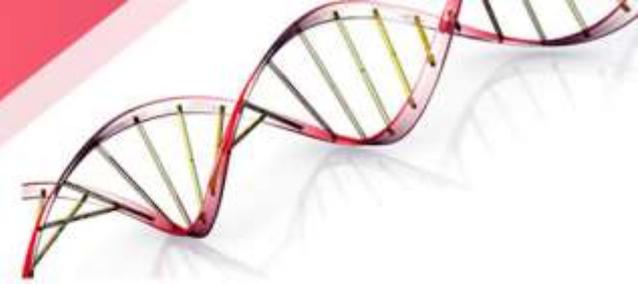
GENOTIPO
Variabilidad genética

AMBIENTE

FENOTIPO
Pluralidad de características

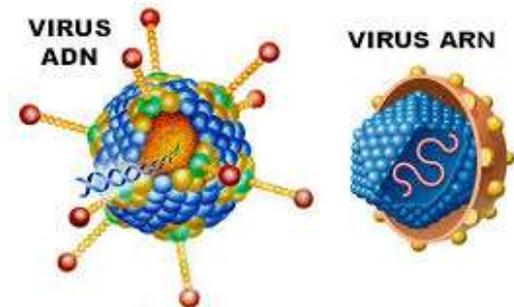


Diversidad Genética

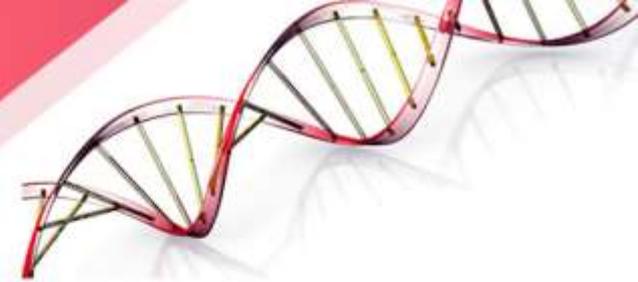


Entre los factores que favorecen la diversidad genética y la interacción de estos genotipos con el ambiente, son las mutaciones.

- **Mutaciones naturales o espontáneas**, son las que se producen en condiciones normales del desarrollo y del ambiente. **Evolución.**
- **Mutaciones inducidas**, son las provocadas por un agente exógeno (físicos, químicos y biológicos).



Mutación



ADN (una cadena)

Normal



Cambio
en una base
individual



Adición



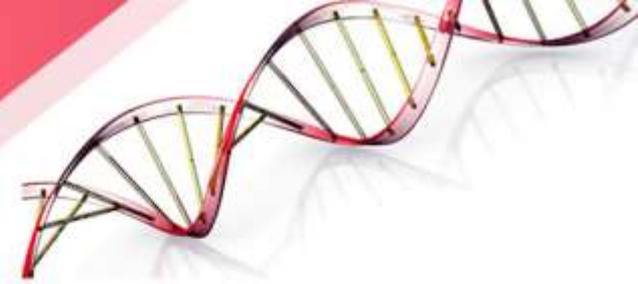
Supresión



Mutare (cambiar)

alteración o cambio en la información genética (**genotipo**) de un ser vivo y que por lo tanto, va a modificar las características de éste; además **se puede heredar** a la descendencia.

Mutaciones Inducidas



La mutagénesis inducida se utiliza desde mediados del siglo XX.

- Sustancias químicas o radiaciones.
- Cambios al AZAR.
- Diversas mejoras.
- Aprox. 3088 nuevas variedades vegetales, **70% área de cultivo.**

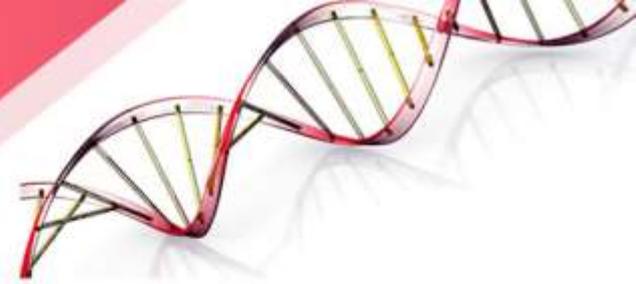
Cambios semejantes a los que ocurren naturalmente de manera espontánea.



W. Murcott mandarin (left) and Tango (right).
Photo credit: T. Williams, UC Riverside.

**No son considerados
Organismos Genéticamente Modificados (OGMs)**

Nuevas Técnicas de Mejoramiento Genético

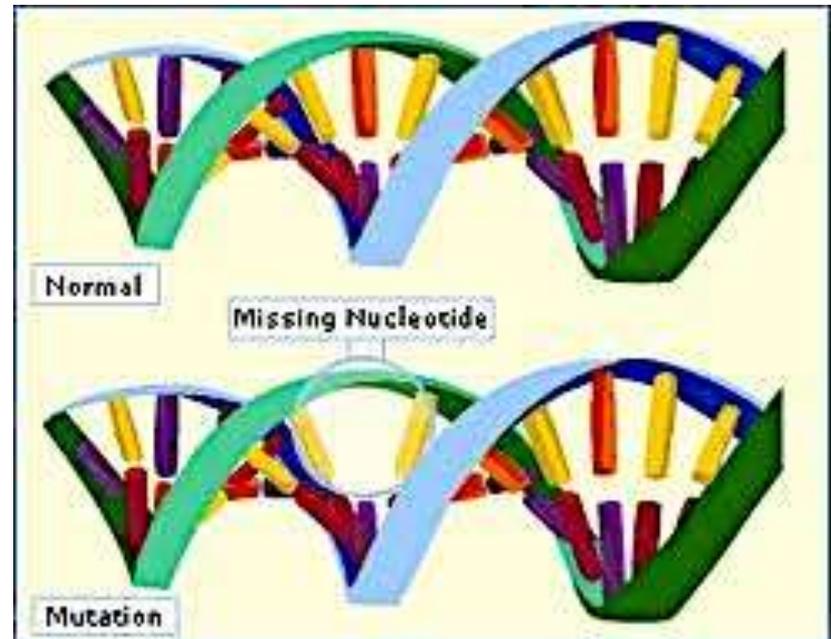


Mutaciones

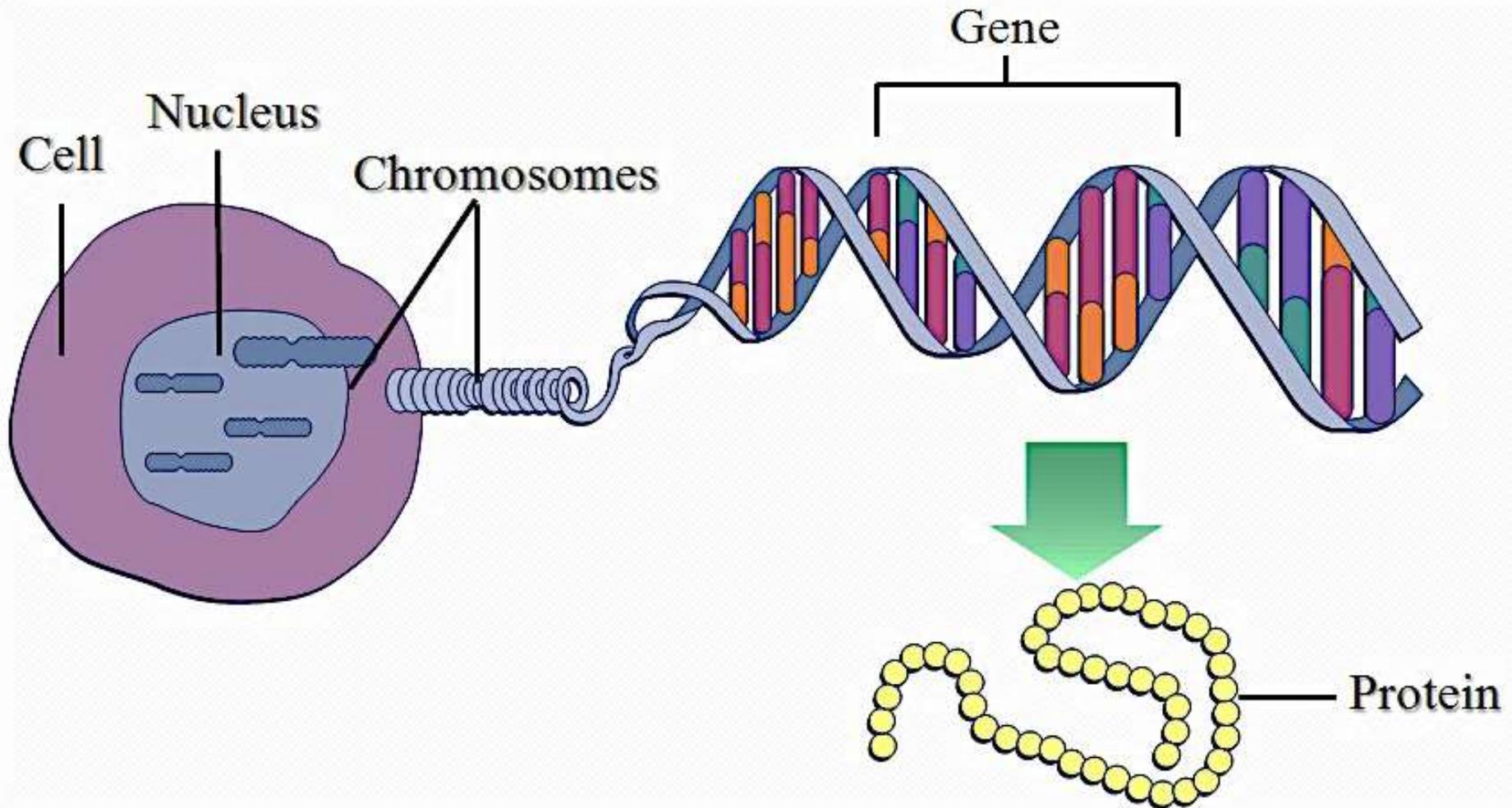
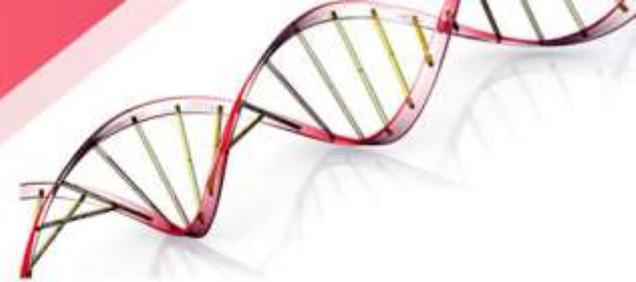
- Nucleasas Sitio Dirigidas (SDN)
- Mutagénesis Dirigida por Oligonucleótidos (ODM)

Producen alteraciones en la secuencia de nucleótidos de un gen.

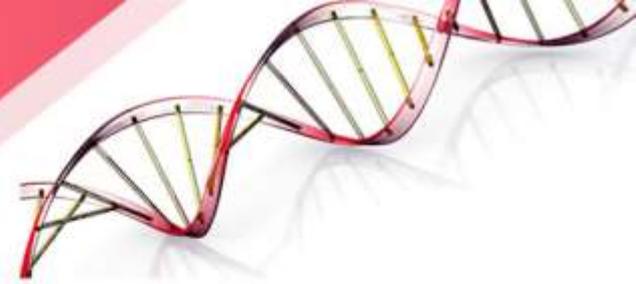
- Pérdidas
- Inserciones
- Sustituciones



ODM – Otros nombres



ODM -Principio



En una proteína, **pequeños cambios específicos** en la secuencia de aminoácidos dentro de un sitio crítico son, en muchos casos, responsables de las diferencias en el desempeño de la proteína y del fenotipo del organismo.

GCGATTACAGGCCAGGTC	CCAC	CGTAGGATGATT	CGGACC	WT								
A	I	T	G	Q	V	P	R	R	M	I	R	T
GCGATTACAGGCCAGGTC	CAA	CGTAGGATGATT	CGGACC	MUT								
A	I	T	G	Q	V	Q	R	R	M	I	R	T

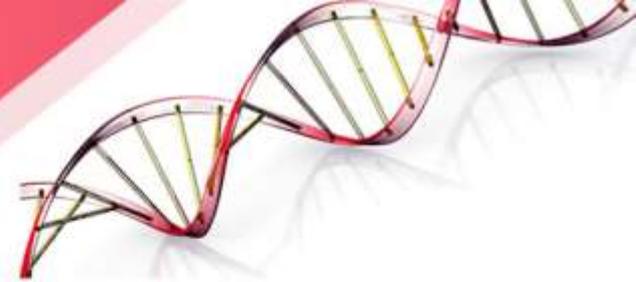
ODM - Definición



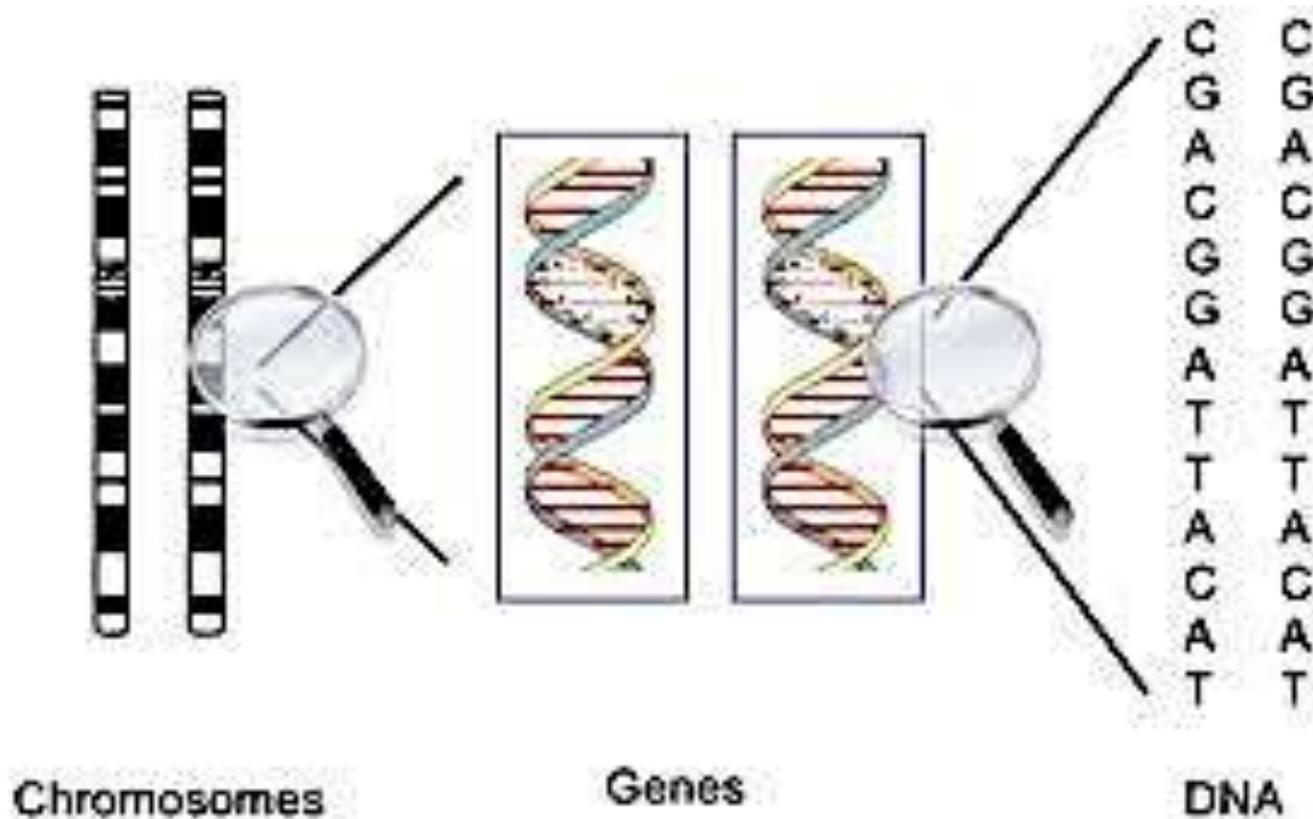
Es la introducción a la célula de oligonucleótidos homólogos a un ADN blanco y que inducen, en nucleótidos sitio-específicos, sustituciones, inserciones o deleciones a través de los Mecanismos de Reparación.

5' ggaTCcaagctgtaatgctcta-

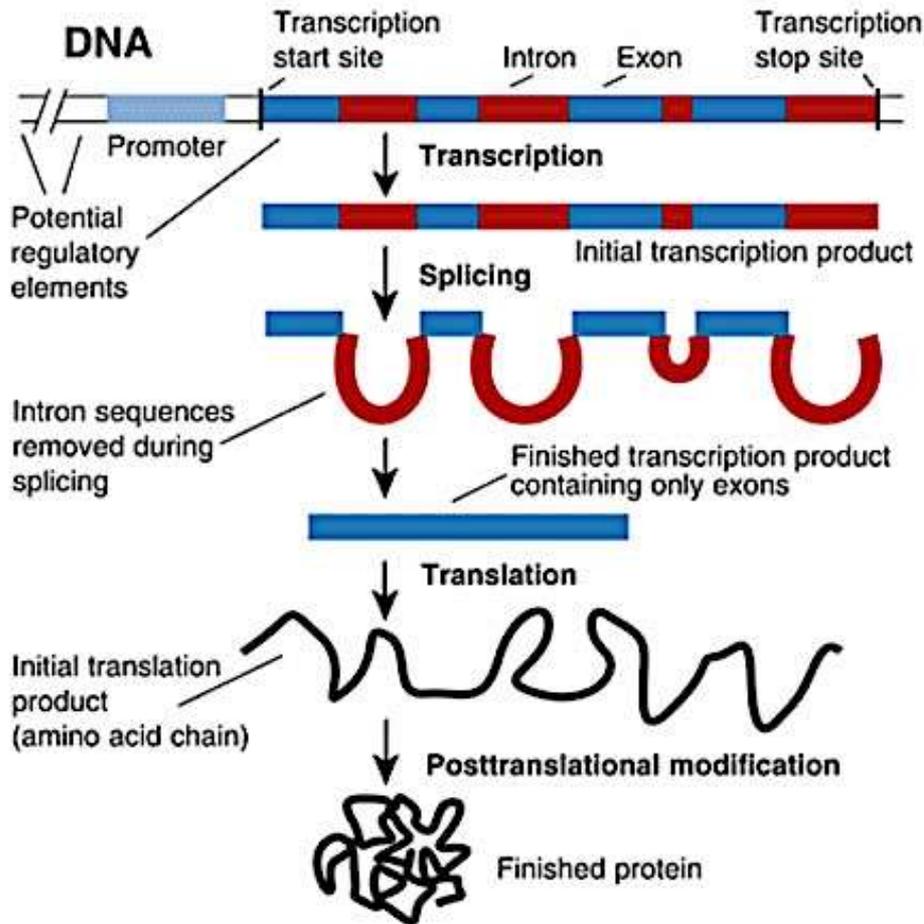
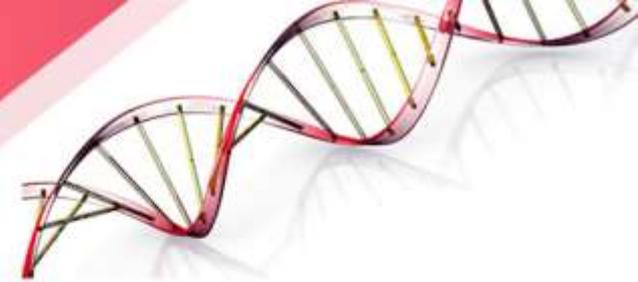
ODM - Usos



Es una técnica empleada para corregir o introducir cambios específicos en sitios definidos del genoma.

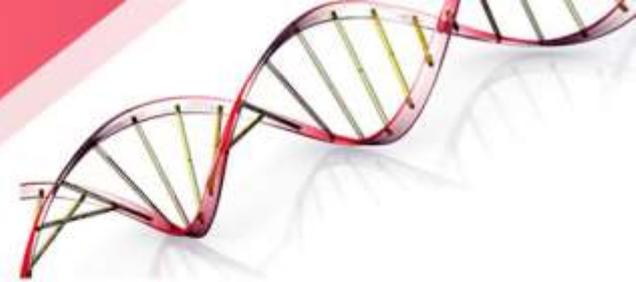


ODM – Cambios inducidos



1. Cambiar la secuencia de aminoácidos de las proteínas.
1. Suprimir la expresión de un gen (*stop codons or frameshift mutations*).
1. Modificar la expresión del gen (por cambios en las secuencias promotoras).

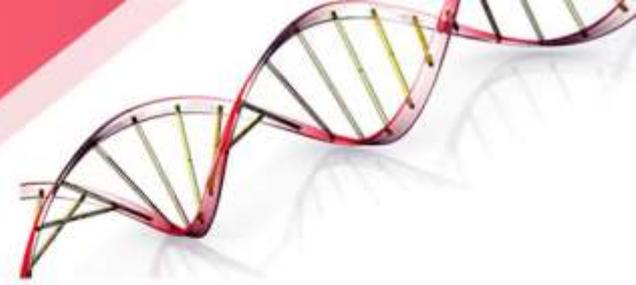
ODM – Otros cambios



- Inhibir la expresión de genes no deseados.
- Aumentar la expresión de genes benéficos.
- Producir cambios en las proteínas para hacerlas más eficientes y efectivas.



ODM - Oligonucleótidos



Los oligonucleótidos son cadenas sencillas (de secuencia conocida) de ADN/ARN, de aprox. 20-100 nucleótidos sintetizados químicamente.

Son diseñados con paridad a una secuencia blanco dentro del genoma de la planta pero con la intención de generar desfase en una o mas bases.

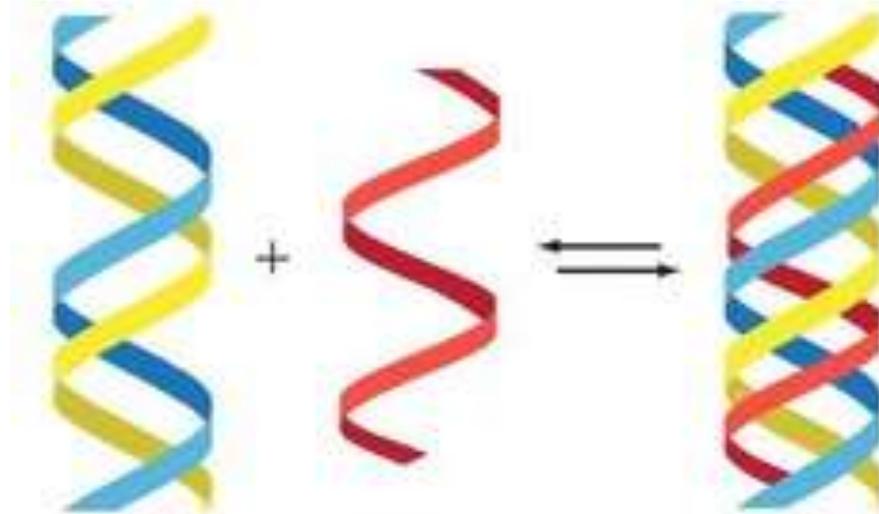
```
CTCCTGTGGAGAAGTCTGC
|||||
... CGTGGACTGAGGACACCTCTTCAGACGGCAATGAC ...
```



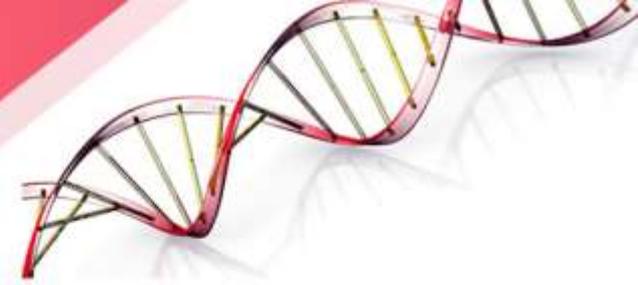
ODM – Tipos de oligonucleótidos



1. **ADN**, cadena sencilla con un solo desfase para la secuencia blanco.
2. **Quimeras RNA/DNA o DNA/DNA**, con baja eficiencia y reproducibilidad.
3. **Oligonucleótidos que forman triple hélice (TFOs)**, tienen una asociación mas estable con el ADN dúplex.
4. **ARN**, se están estudiando.



ODM – Introducción de oligonucleótidos

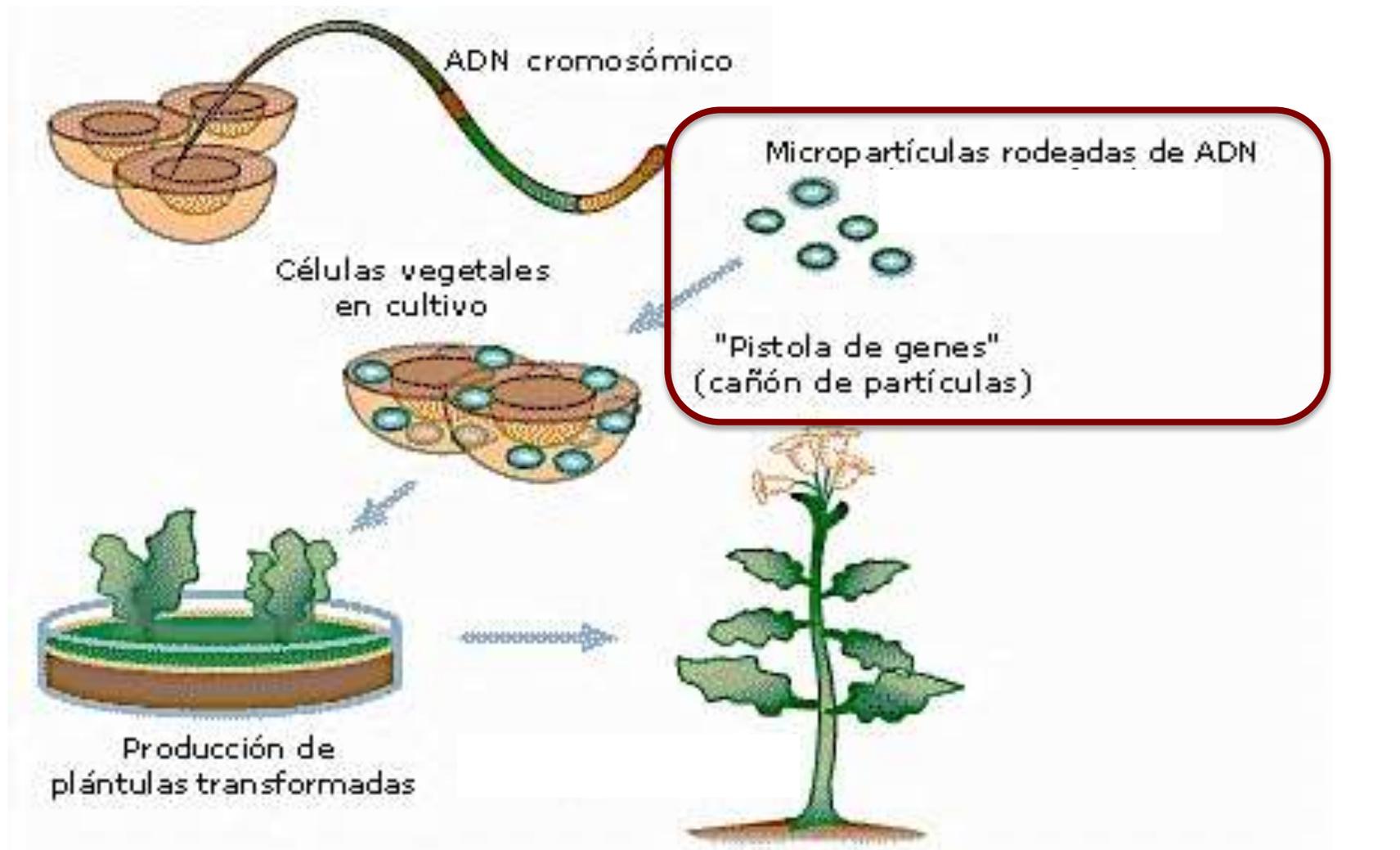
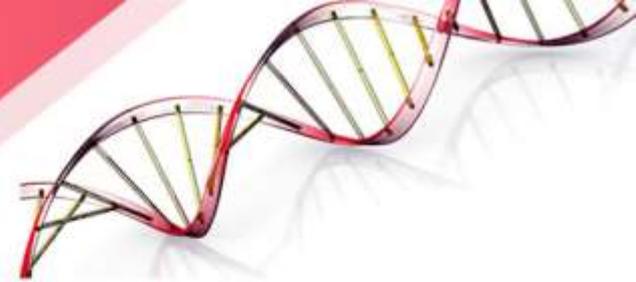


Mecanismos de introducción a las plantas:

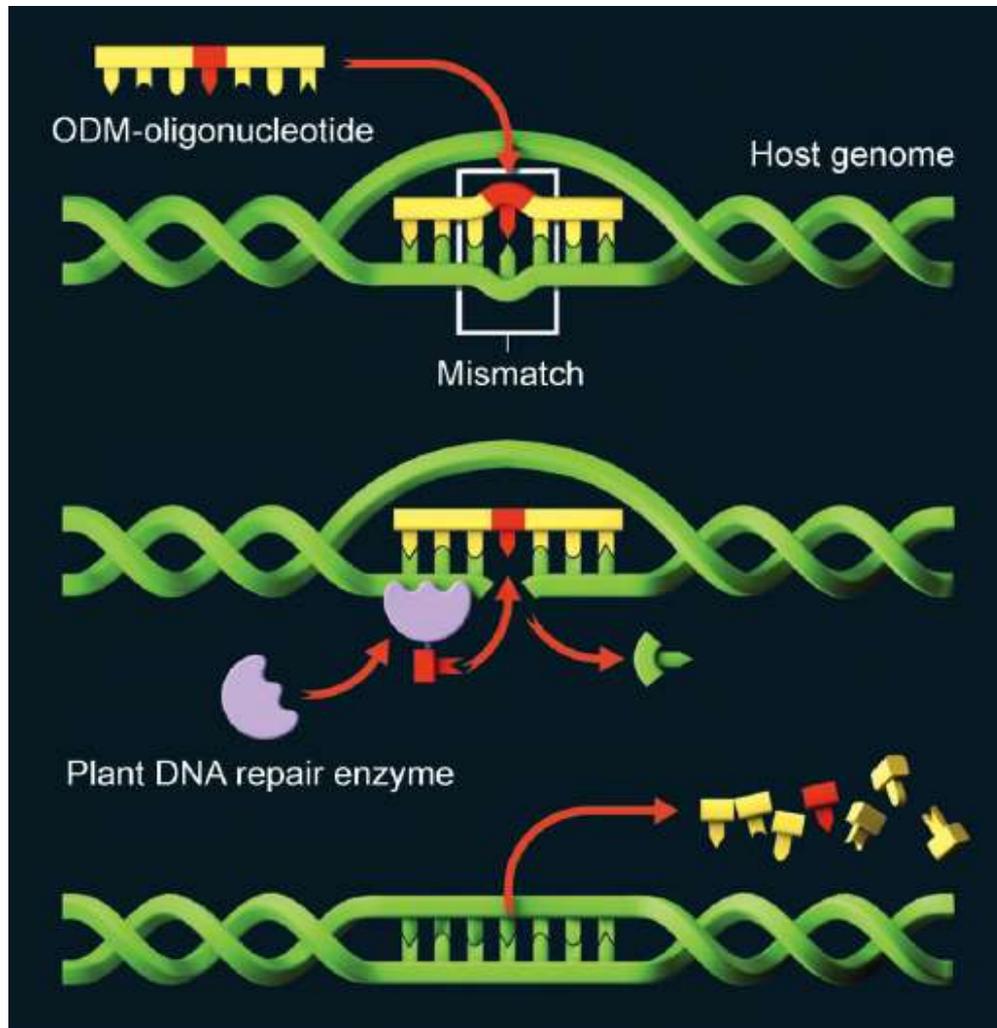
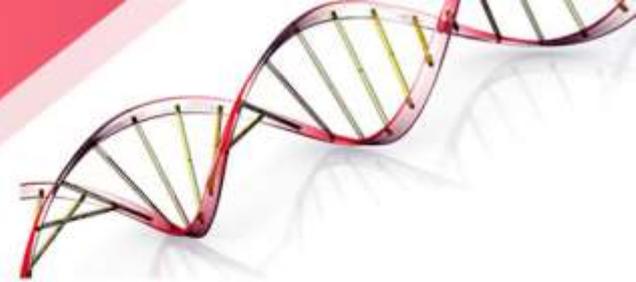
- ✓ Químicos (mediados por *polyethylene glycol*)
- ✓ Electroporación (electropermeabilización)
- ✓ Lipofección (vesículas de lípidos catiónicos)
- ✓ Biobalística (disparos de partículas de oro recubiertas del oligonucleótidos)

~~X Transformación mediada por *Agrobacterium*~~

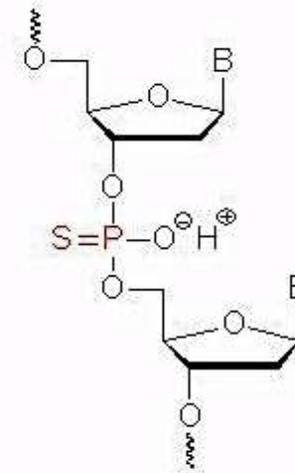
ODM – Biobalística



ODM – Integración de oligos de ADN

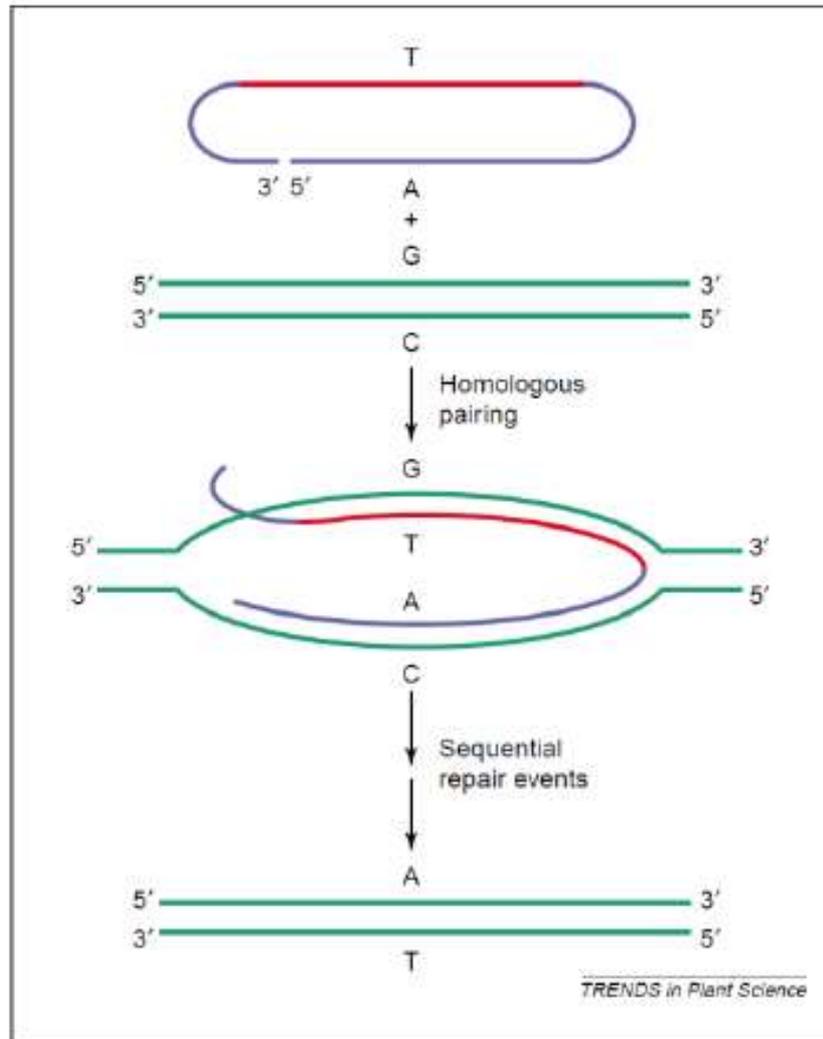
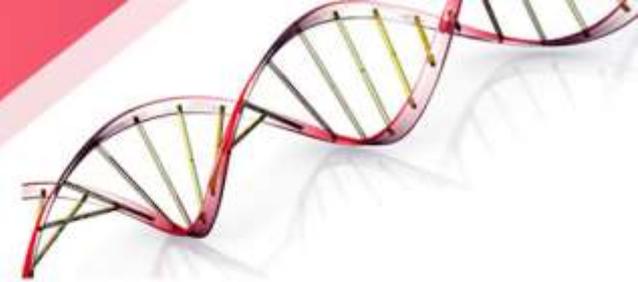


- Algunas modificaciones incrementan la capacidad de union y previenen la degradacion.



5'-3' Phosphorothioate linkage

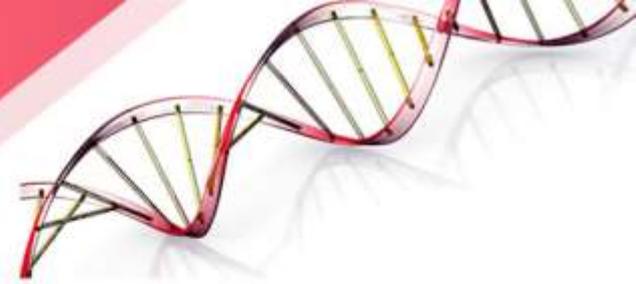
ODM – Integración de oligos quiméricos



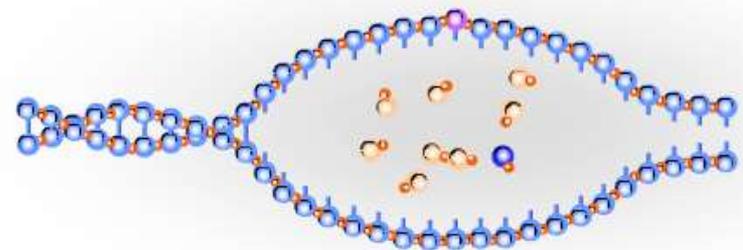
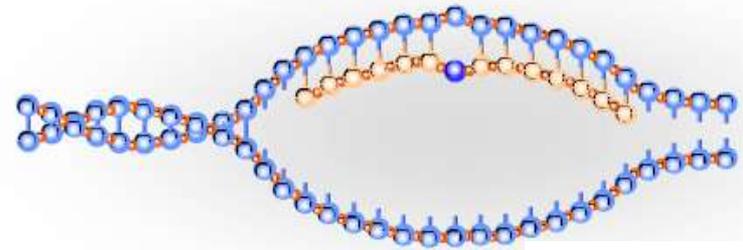
ARN-rojo
ADN-morado

- Se forma una estructura de Bucle
- El *mismatch* se resuelve por un proceso de Reparación del ADN

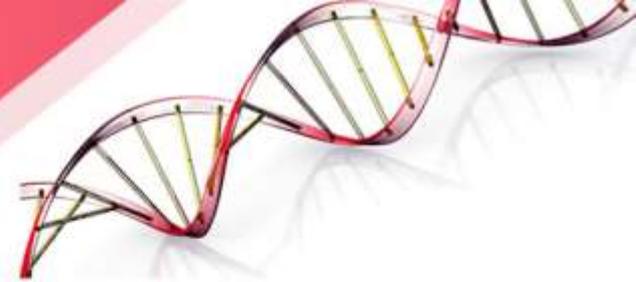
ODM – Destino del oligonucleótido



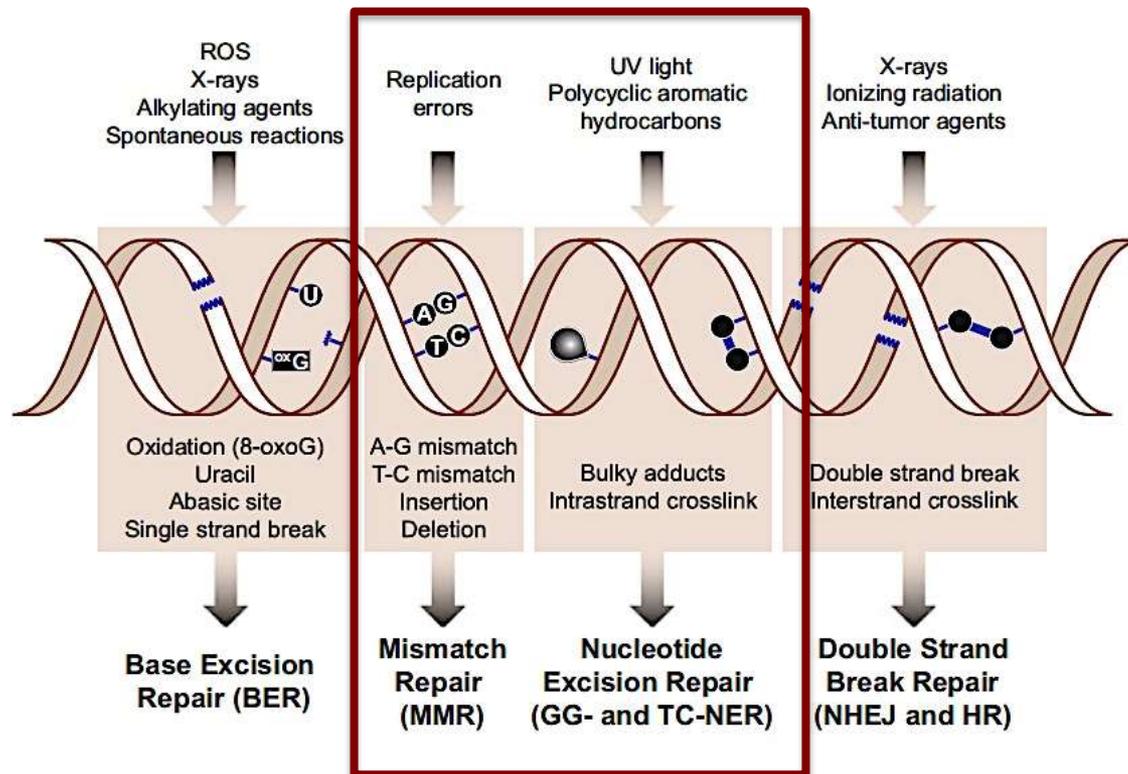
- Oligos de **20-30 nt** son usados eficientemente.
- Oligos de 80-100 nt generalmente son tóxicos para las células.
- Después de la incorporación del cambio, **el oligo es degradado.**



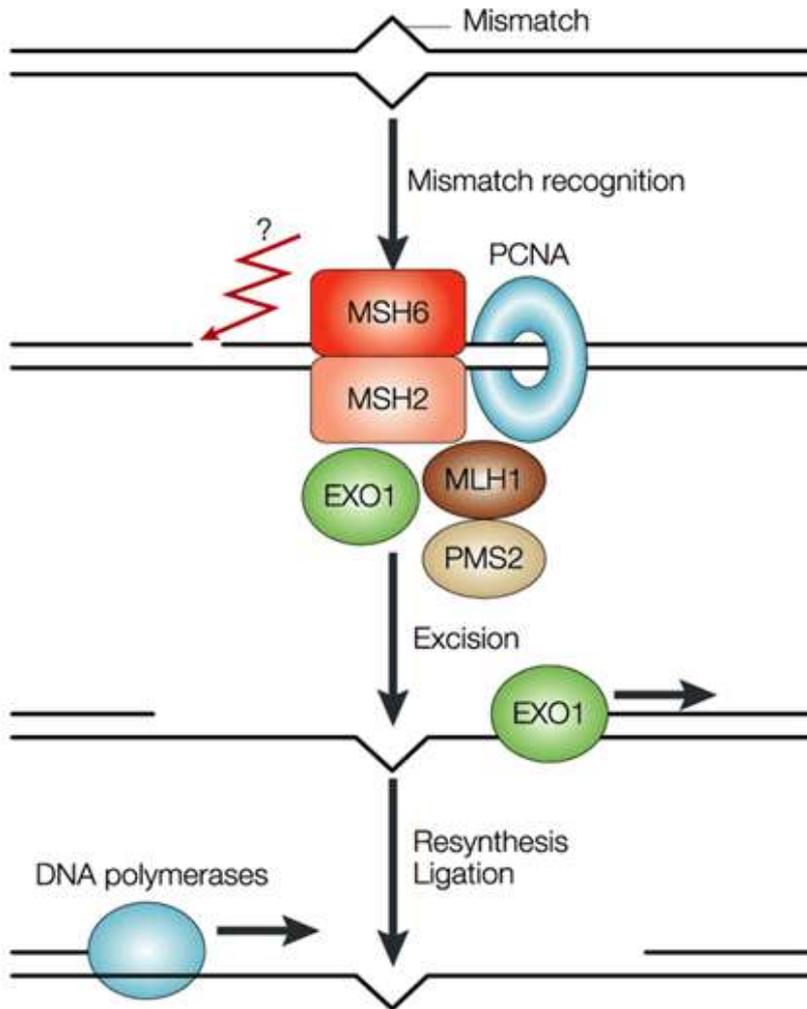
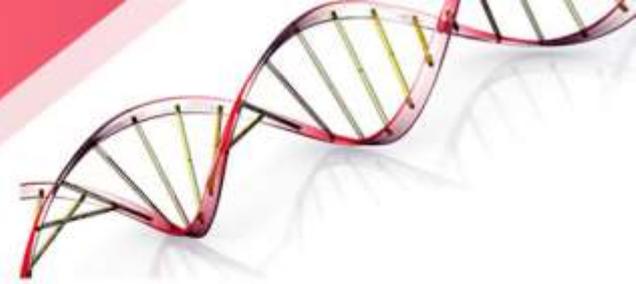
ODM – Mecanismos de reparación del ADN



El oligonucleótido **NO** se integra al genoma de las células de la planta hasta que se **INDUCE el Mecanismo de Reparación** que cambia la secuencia endógena por la secuencia deseada.

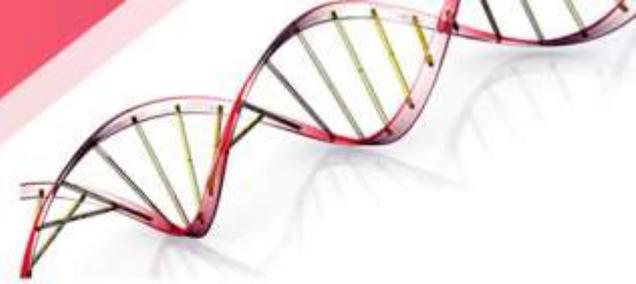


ODM – Mismatch repair

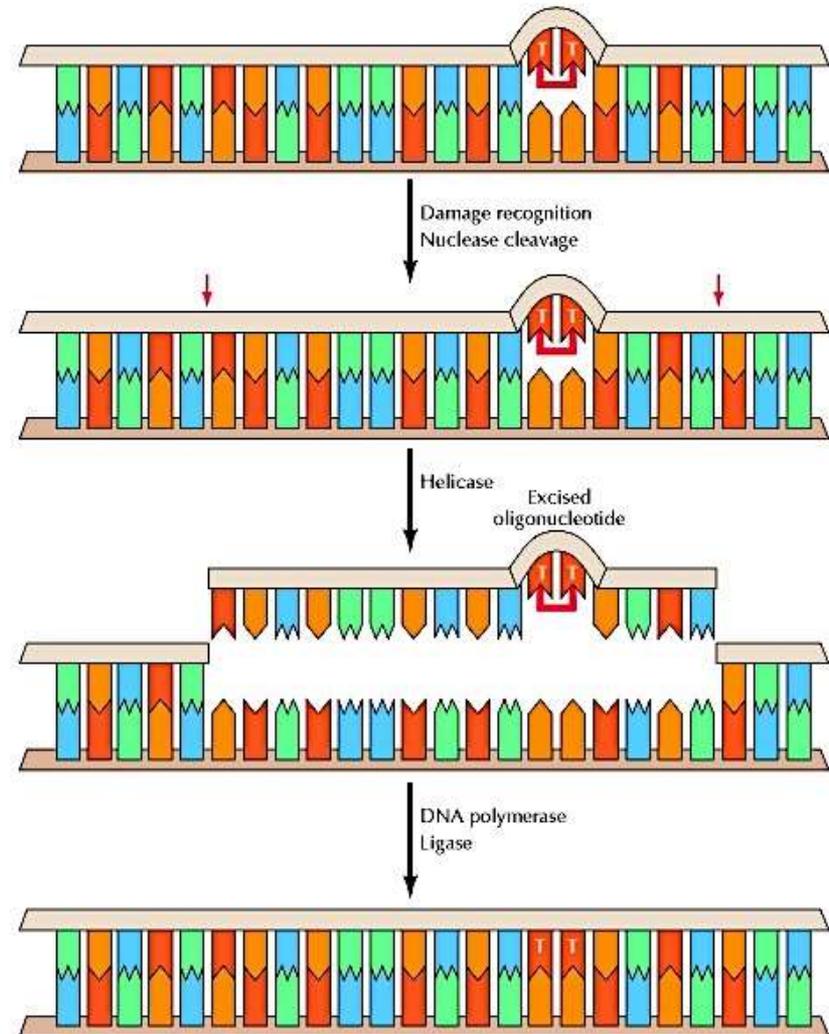


- Altamente conservado.
- Mecanismo de reparacion post-replicacion.
- Desfase de bases y tambien inserciones y deleciones.

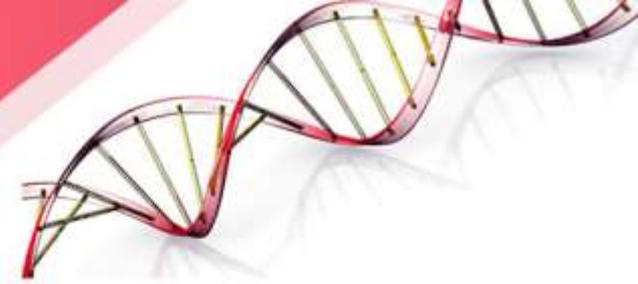
ODM – *Nucleotide excision repair*



- Muy versátil.
- Muy complejo.
- Elimina lesiones del genoma y también de genes transcripcionalmente muy activos.



ODM – Aplicaciones



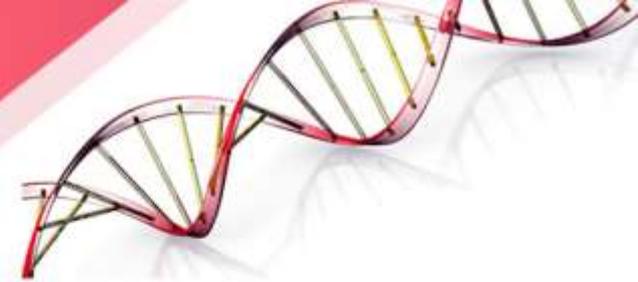
- **Microorganismo:** Bacterias y Levaduras.
- **Mamíferos:** Células animales y, en un futuro, en la ganadería y terapia génica.
- **Plantas:** Maíz, arroz, tabaco, trigo, etc



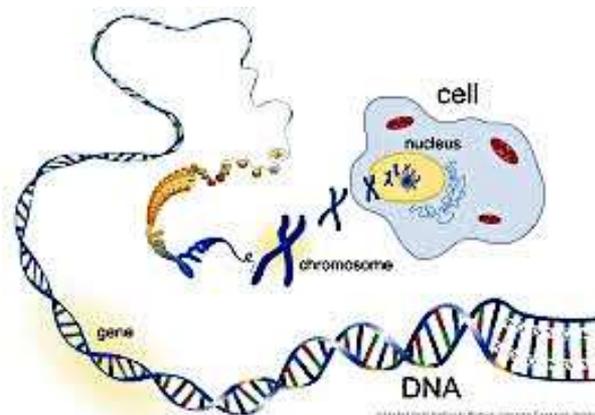
Plantas resistentes a la acción de un herbicida.



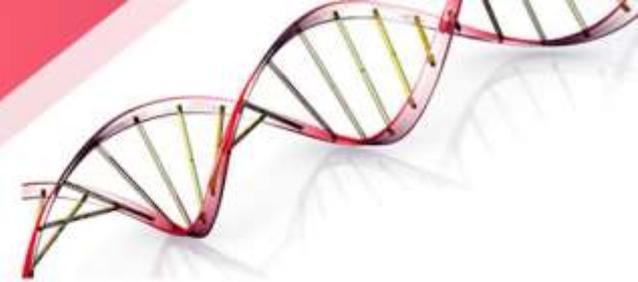
ODM –Plantas



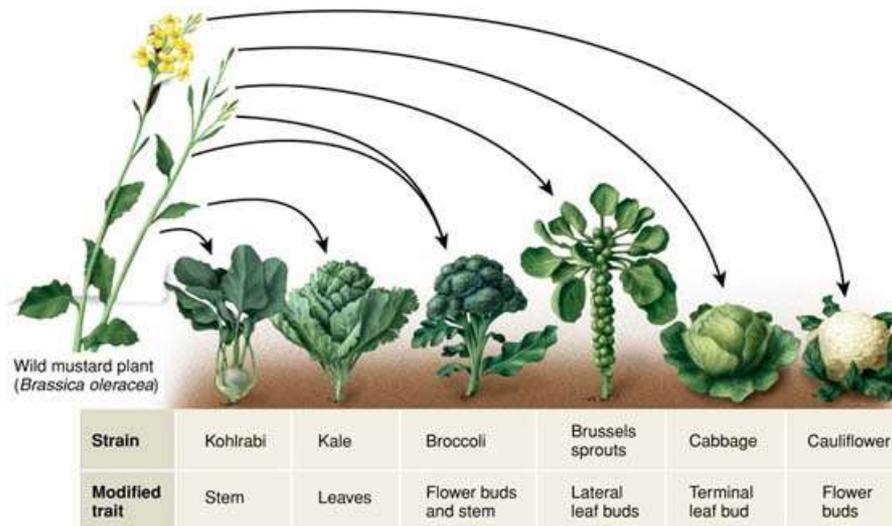
- Esta técnica puede aplicarse a cualquier planta si la secuencia, incluyendo el efecto de la modificación, es **CONOCIDA**.
- En contraste con otros métodos **NO se inserta ADN**, por lo que **NO** hay integración al azar, **NO** hay inserciones múltiples o efectos debidos a la inserción en lugares no deseados.
- El gene de interés se mantiene en su **contexto cromosomal normal**, lo que reduce las oportunidades de alterar su expresión normal, a menos que esa sea la intención.



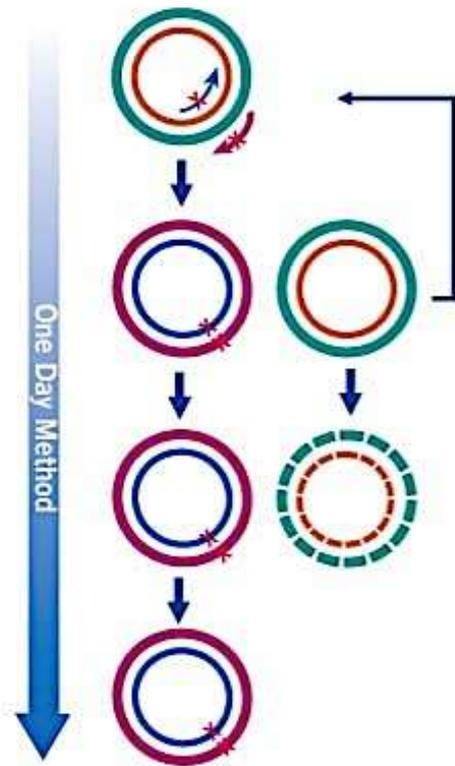
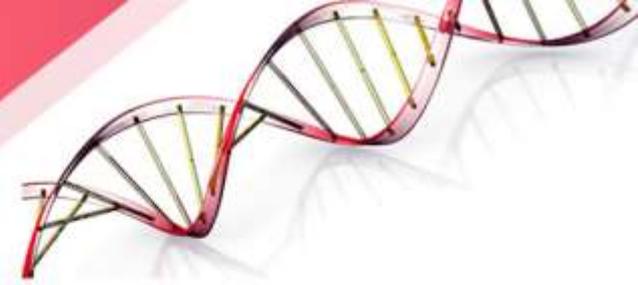
ODM –Plantas



- Se ha observado baja frecuencia de mutación inducida (10^{-4}).
- A nivel molecular **son indistinguibles** de las plantas obtenidas por selección natural.
- Es difícil realizar la selección de las mutaciones deseadas.
- Las técnicas de secuenciación de alto rendimiento son una opción para la selección.

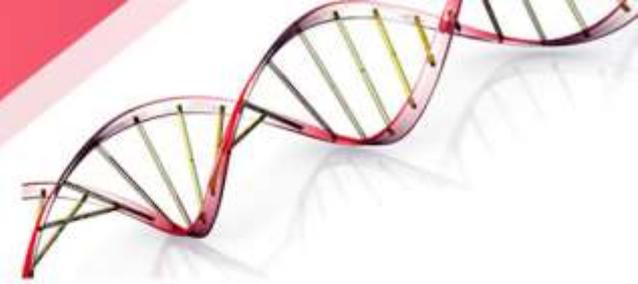


ODM – Ventajas



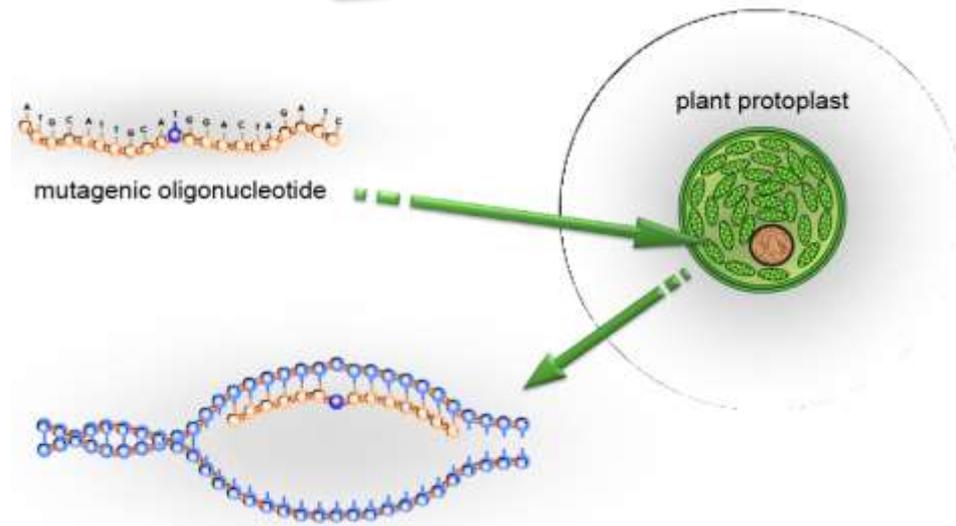
- No emplea vectores, con lo que se elimina el riesgo de mutagenesis asociada.
- Dado que actúa en genes específicos, no se alterarían otros.
- Podría NO generar otros cambios en el genoma, como ocurre con los procesos naturales o inducidos.

ODM – Limitantes

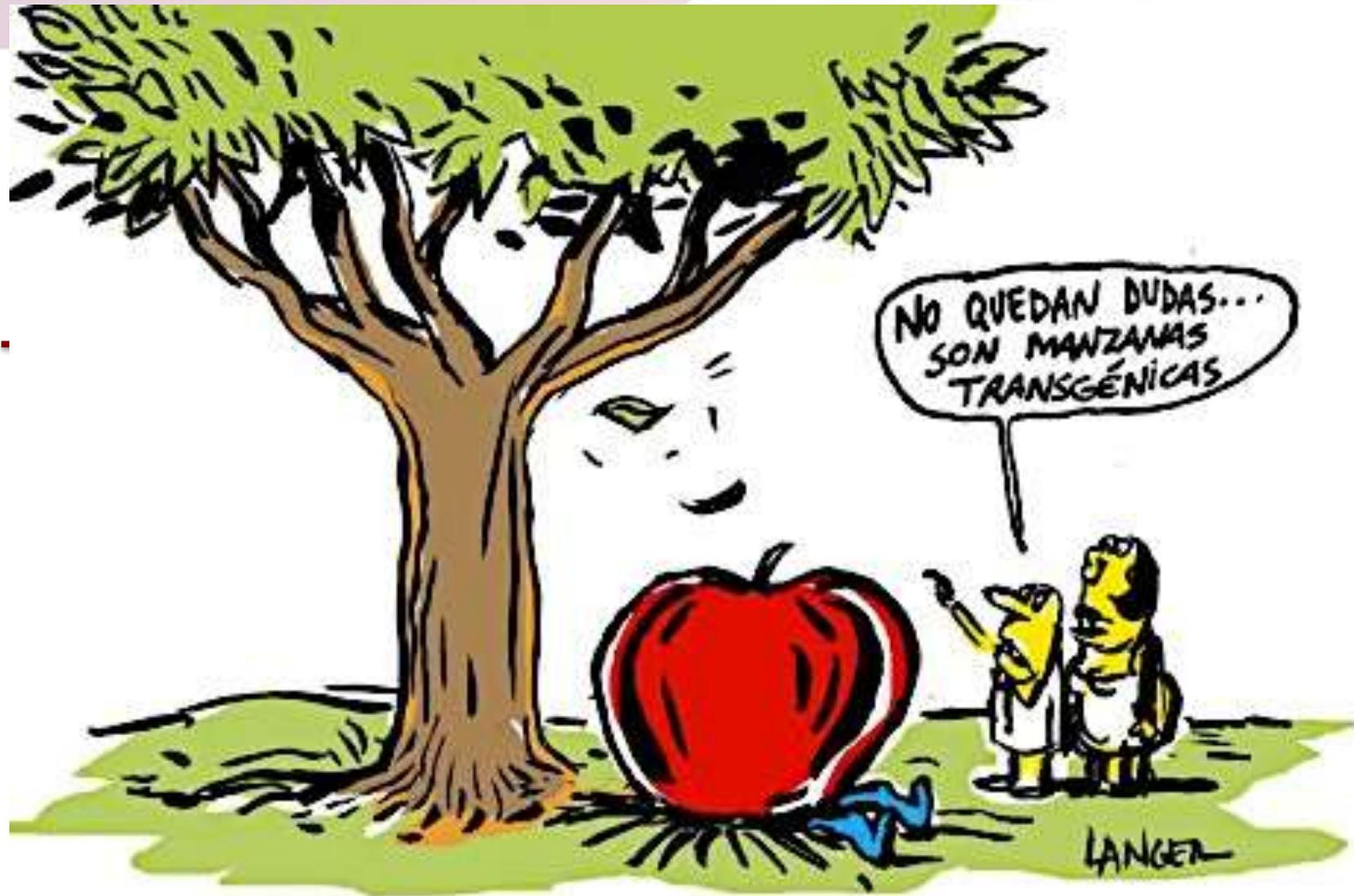
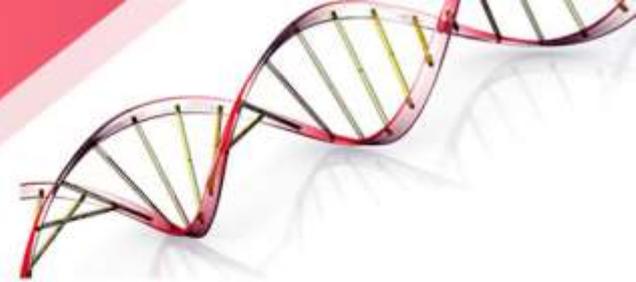


- Diseño del oligonucleótido.
- La secuencia blanco.
- Estructura de la cromatina.
- Componentes de la maquinaria de reparación.
- Etc.

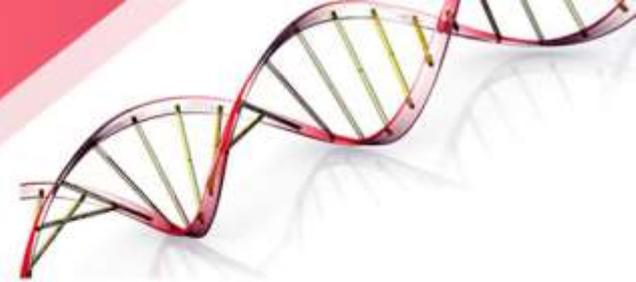
Influyen en el cambio de la secuencia del ADN blanco (1-60%)



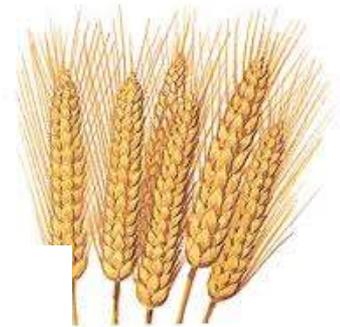
ODM – Limitantes



ODM – Nuevas características



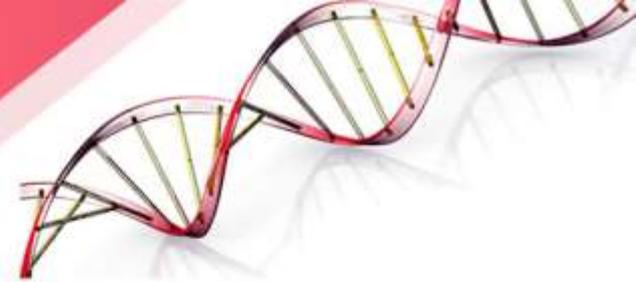
- Maíz, trigo, canola, y plátano.
- Tolerancia a un amplio rango de herbicidas (HT)
- **HT empleado para la selección.**



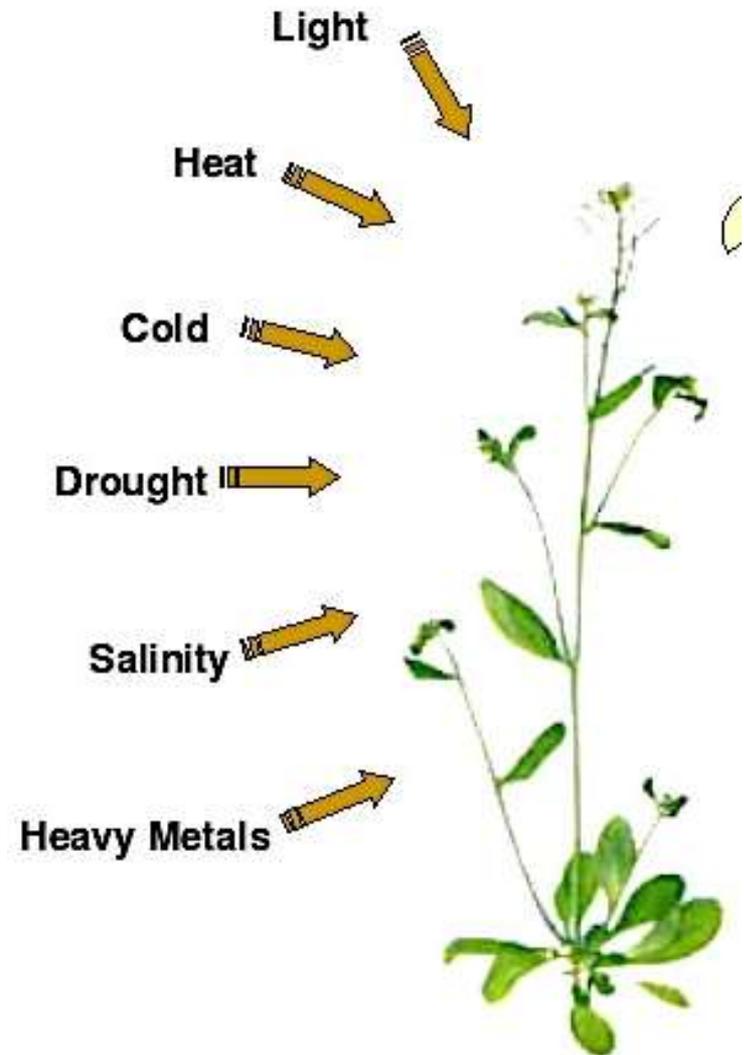
En general, mutaciones que **AFFECTAN A UN GEN ENDÓGENO** en específico.



ODM – Nuevas características



- Posibles nuevas propiedades:
 - Alargar la vida de anaquel
 - Resistencia a plagas
 - Aumentar el rendimiento
 - Alterar el contenido de ácidos grasos y aminoácidos.
 - Tolerancia el estrés abiótico.
 - Mecanismos de defensa contra patógenos.



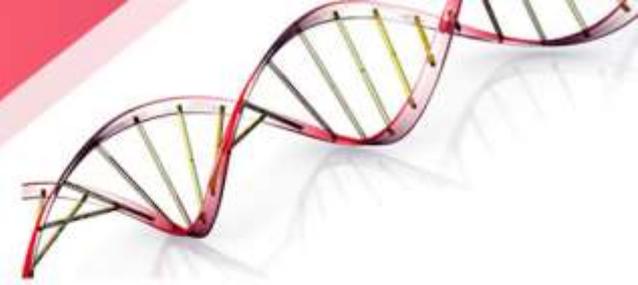
ODM – Consideraciones



- Los organismos desarrollados, en muchos casos, podrían no ser distinguibles de aquellos que se obtuvieron por técnicas de mutación “tradicional” o de los organismos silvestres.
- La detección y trazabilidad son puntos clave en los sistemas regulatorios de los OGMs, pero...la técnica de ODM no requiere de la introducción de secuencias de ADN de otras especies al genoma natural.

(Breyer D, 2009)

ODM – Consideraciones



- Muchos expertos de diferentes países coinciden en que estos materiales deben etiquetarse como NO-GM (Genéticamente Modificados).
- Esta técnica requiere menos tiempo de implementación y análisis, en comparación con otras, y se espera se comercialice más rápido dado que es NO-TRANSGÉNICA y podría evitar restricciones regulatorias.

(Lusser M, 2013)

ODM – Impacto

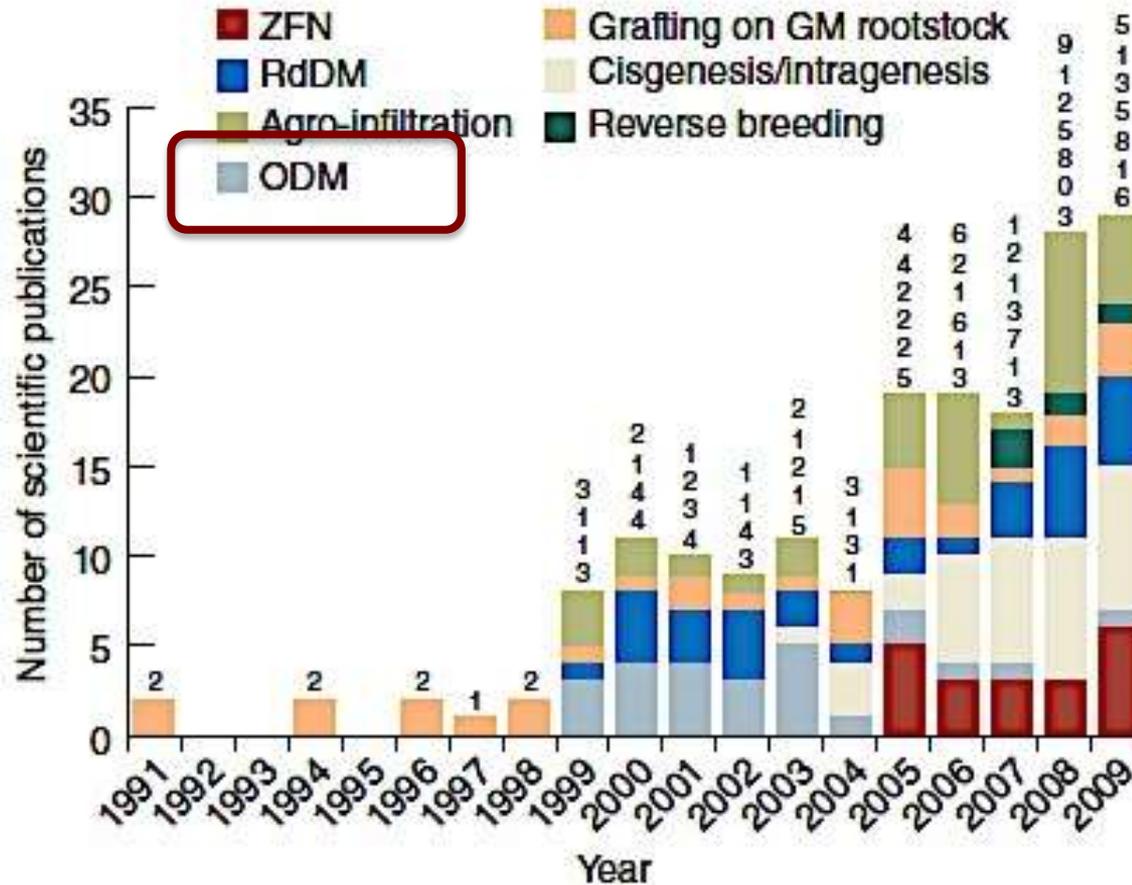
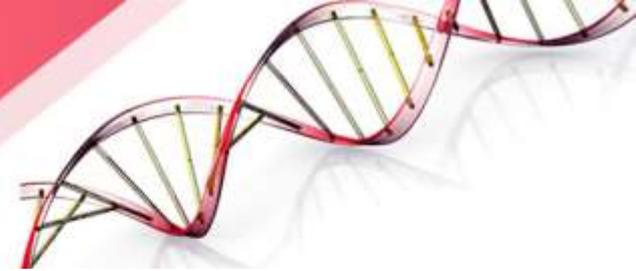


Figure 1 Number of scientific publications on new plant breeding technologies 1991–2009.

ODM – Instituciones Líderes

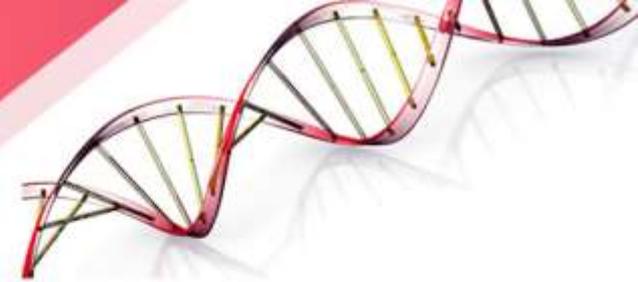


Table 1 Ten leading institutions developing new plant breeding technologies ranked according to absolute number of publications and number of covered techniques

Institution	Location	Number of publications	Techniques ^a
Wageningen University	Wageningen, The Netherlands	21	C,R,G,B,A
University of California, Riverside	Riverside, CA, USA	11	O,R,G,A
John Innes Centre	Norwich, UK	9	C,R,G,A
J.R. Simplot ^b	Boise, Idaho, USA	9	C
Austrian Academy of Sciences	Salzburg, Austria	9	R
University of Amsterdam	Amsterdam	6	Z,O,C,R
Iowa State University	Ames, Iowa, USA	6	Z
Max-Planck Institute	Koln, Germany	4	O,R,G
University of Michigan	Ann Arbor, Michigan, USA	4	C,Z
Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research (IPK)	Gatersleben, Germany	4	O,G

^aEach technique is represented by a letter. Z, ZFN; O, ODM; C, cisgenesis/intragenesis; R, RdDM; G, grafting; B, reverse breeding; A, agro-infiltration. ^bPrivate institution.

ODM – Patentes

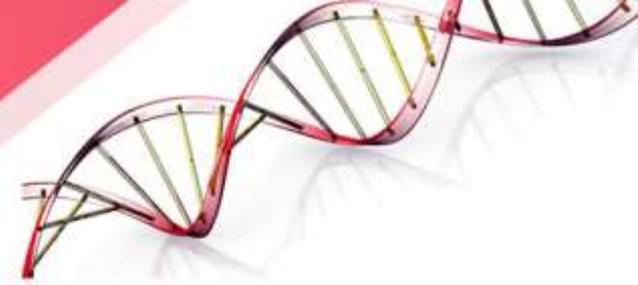
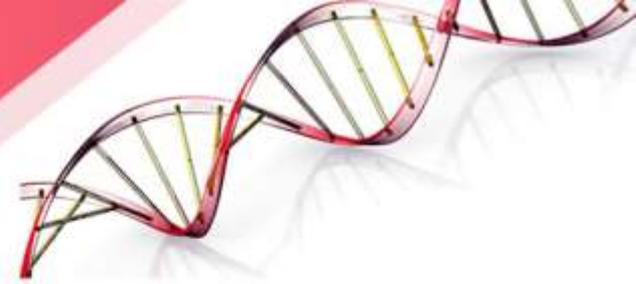


Table 3 Ten leading organizations in patents on new plant breeding techniques ranked according to absolute number of patents and number of covered techniques

Institution	Country	Entity	Number of patents	Techniques
Sangamo Biosciences	US	Private	11	Z
Dow Agrosiences	US	Private	5	Z
University of Delaware	US	Public	5	O
J.R. Simplot	US	Private	5	C
Cornell Research Foundation	US	Private	5	G
Keygene	The Netherlands	Private	4	O
Pioneer Hi Bred	US	Private	3	Z, O
Cibus Genetics	US	Private	3	O
Wageningen University	The Netherlands	Public	3	C
Plant Bioscience	UK	Private	2	C, A

Z, ZFN; O, ODM; C, cisgenesis/intragenesis; G, grafting; A, agro-infiltration.

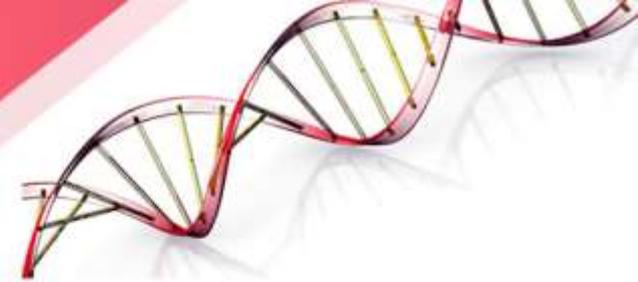
ODM – ¿OGMs?



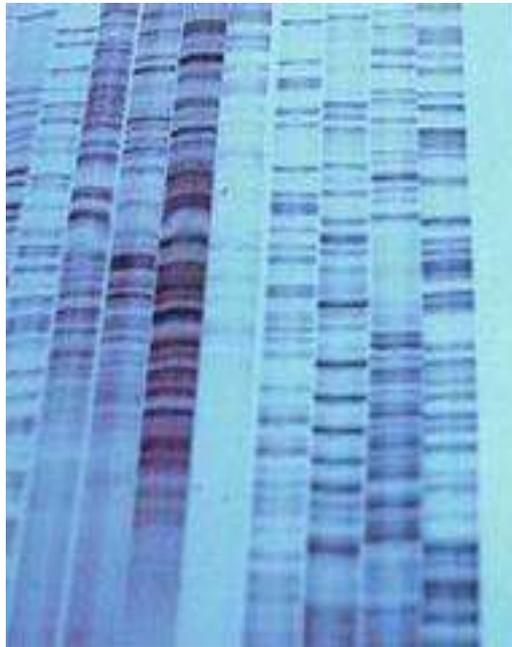
Según el **Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre Diversidad Biológica (2000)** la **Biotecnología Moderna** puede definirse como la aplicación de:

- Técnicas in vitro de ácido nucleico; incluidos el ácido desorribonucleíco (ADN) recombinante y la inyección directa de ácido nucleíco en células u orgánulos,
- La fusión de células mas allá de la familia taxonómica; que superan las barreras fisiológicas naturales de la reproducción o de la recombinación y que no son técnicas utilizadas en la reproducción y selección tradicional.

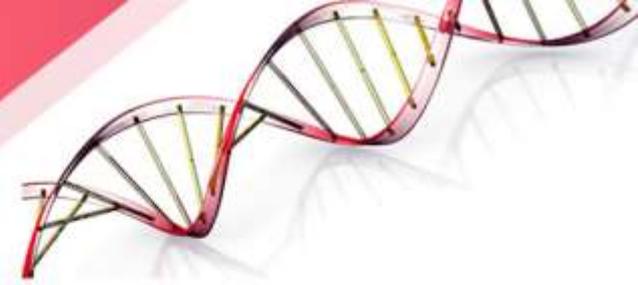
ODM – ¿OGMs?



Organismo Genéticamente Modificado (OGM/OVM): cualquier organismo vivo que posea una combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna.

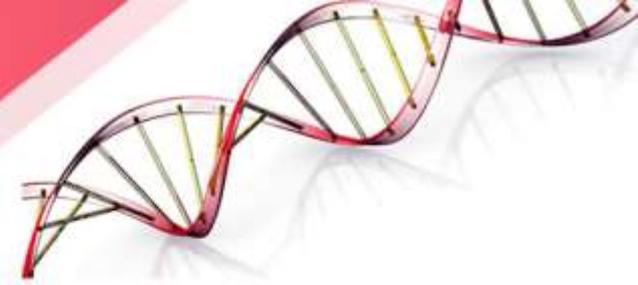


ODM – Sugerencias



- Los organismos obtenidos por Mutagenesis Dirigida por Oligonucleótidos (ODM), al no emplear técnicas de la Biotecnología Moderna, podrían ser considerados como NO Genéticamente Modificados.
- Pero se sugiere que, independientemente de la técnica de mejoramiento genético empleada, las nuevas variedades de plantas sean evaluados de acuerdo a sus nuevas características y a el producto final que se genere. (Evaluación/Análisis de Riesgo).

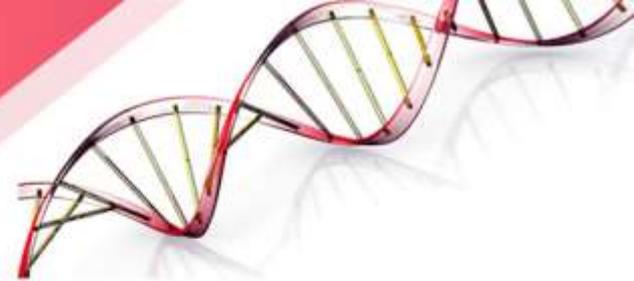
ODM – Sugerencias

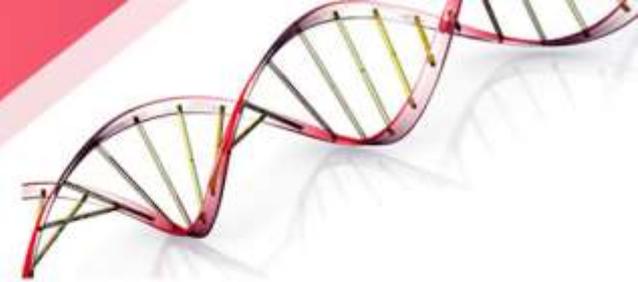


- Que para las instituciones públicas de nuestro país los permisos de experimentación sean menos restrictivos.
- Se incentiven y apoyen económicamente los proyectos que empleen Mutagénesis Dirigida por Oligonucleótidos.
- Se dé prioridad a los productos de consumo nacional y de los cuáles no tenemos autonomía alimentaria.

**MUCHAS GRACIAS POR
SU ATENCION**







Propiedad Intelectual

