

Taller sobre Bioseguridad de **Plantas Transgénicas**



Conceptos Básicos y Glosario de:

- ADN, Genes y Genomas
- Bio-informática
- Transformación Genética
- Bioseguridad
- Sitios de Interés en la Web sobre Biotecnología

septiembre 20-21 de 2002
Calima

Organiza



QK
981
.5
T3

ADN – GENES y GENOMAS

Introducción

Uno de los más importantes aportes al estudio de la biología ha sido la descripción del ADN (ácido desoxirribonucleico) “la molécula de la vida”. El estudio de sus propiedades fisicoquímicas y biológicas ha desarrollado en menos de cincuenta años un enfoque completamente novedoso en lo referente al origen, flujo y almacenamiento de la información genética en los organismos vivos (dogma central de la biología molecular); además, ha hecho posible la utilización de este conocimiento en la solución de problemas concretos a través de la ingeniería genética o tecnología del ADN recombinante.

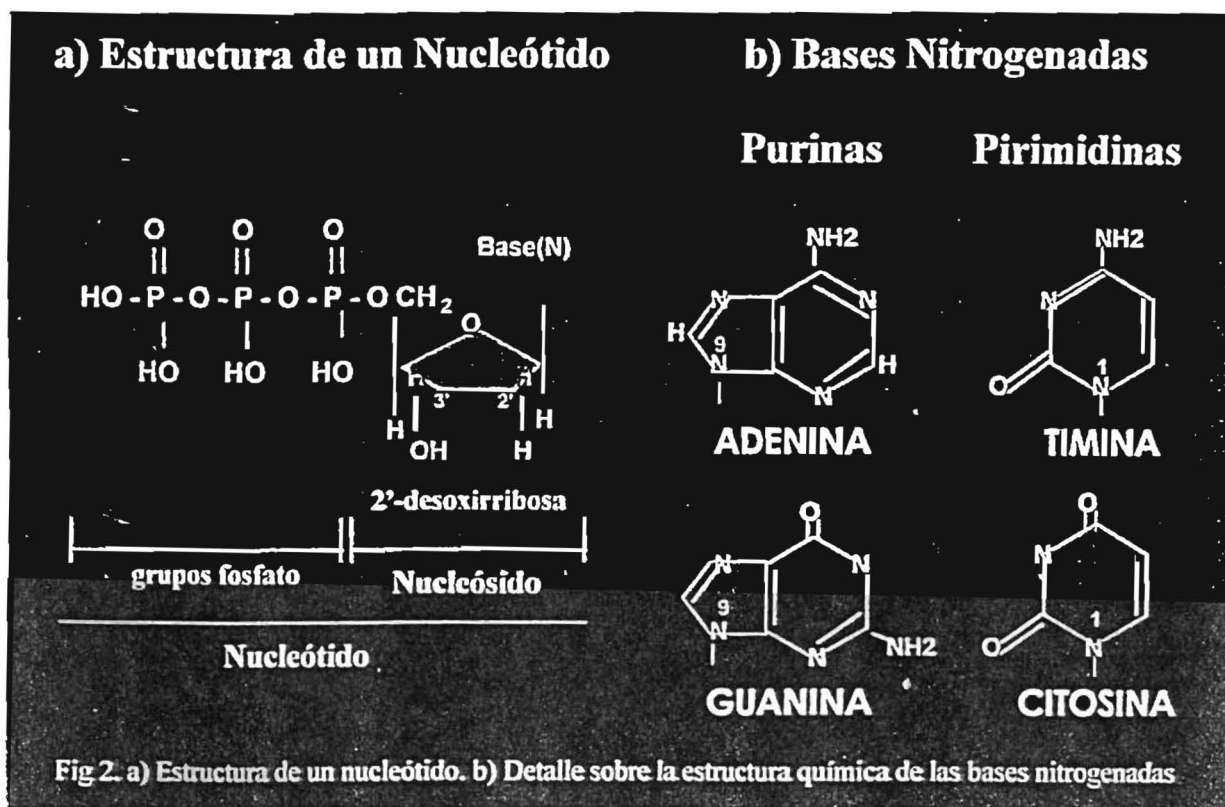
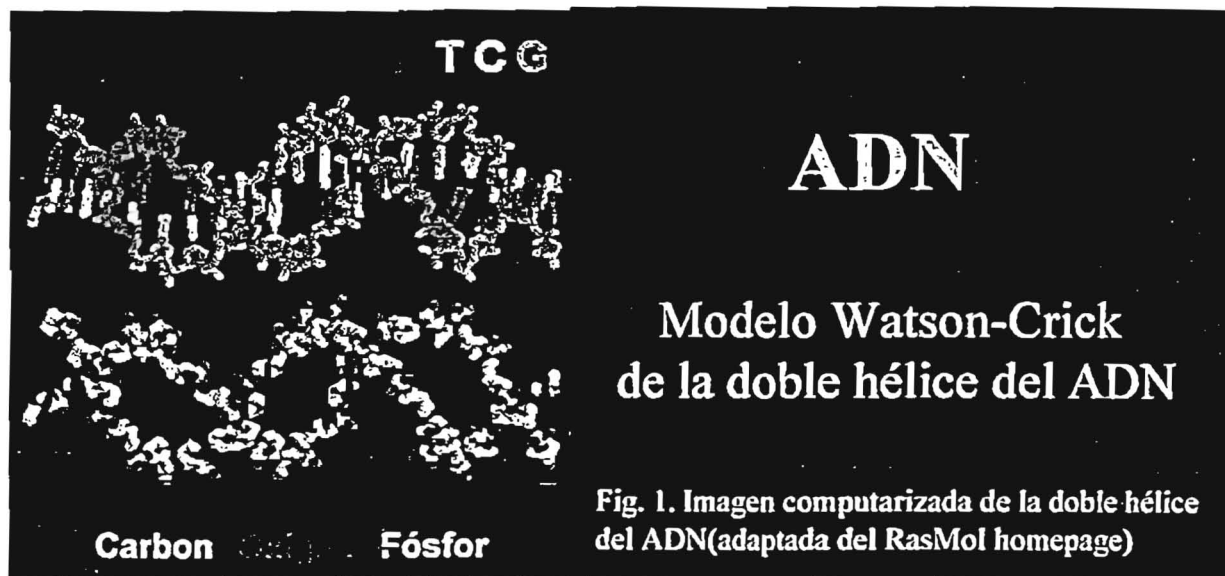
Definición

El ADN es una estructura termodinámicamente estable aunque informacionalmente dinámica y sujeta al cambio. El efecto de su expresión es de enorme complejidad y plasticidad, estos dos hechos definen la originalidad de un organismo a la vez que lo hacen ligeramente distinto de otros individuos de su misma especie y completamente diferente de organismos de otros grupos o taxones que al igual que él comparten el hecho de poseer moléculas de ADN.

El ADN como macromolécula, es un polímero de carácter ácido, con características fisicoquímicas propias responsable de la generación, transmisión y almacenamiento de la información hereditaria en todo organismo vivo. Todas las células poseen en su núcleo ADN, incluyendo organelas tales como cloroplastos y mitocondrias en plantas. El ADN se encuentra asociado a proteínas estableciendo complejos especiales que conforman diversos niveles de organización dentro de los cuales los cromosomas son los más representativos.

El ADN se encuentra en el núcleo de las células asociado con proteínas y organizado en cromosomas como se mencionó antes. Una molécula de ADN consiste en dos cadenas unidas por puentes de hidrógeno formando una doble hélice (fig. 1). Cada cadena es una secuencia repetitiva de unidades similares llamadas nucleótidos, cada uno compuesto de un azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada (fig.2). Cuatro bases diferentes están presentes en el ADN: adenina (A), timina (T), citosina (C) y guanina (G). El orden específico de las bases a lo largo de la cadena se conoce con el nombre de secuencia del ADN. La secuencia específica las instrucciones genéticas exactas requeridas para crear un individuo con características únicas. La información genética puede entonces ser definida como frases escritas usando las bases A, C, T y G como alfabeto. La secuencia de las bases a lo largo de una cadena es exactamente complementaria a la otra, lo cual indica que ambas cadenas poseen la misma información genética. Las dos cadenas de ADN están unidas químicamente por puentes de hidrógeno formando pares de bases. A siempre estará unida a T por dos

puentes de hidrógeno mientras que G estará unida con C por tres puentes de hidrógeno. El tamaño del genoma corresponde al número total de pares de bases.



El Gen

El gen es la unidad básica de la herencia. Posee la información básica para la síntesis de proteínas, las cuales son los compuestos estructurales de las células y los tejidos.

En términos bioquímicos, un gen consiste de una cadena de ácido desoxirribonucleico (ADN) la cual forma parte de una unidad genética mucho más larga conocida como cromosoma (gig3). Organismos unicelulares como las bacterias, poseen pocos miles de genes mientras que organismos complejos como las plantas superiores poseen hasta 50.000 genes diferentes.

El estudio de como los genes guardan la información genética y como es transmitida ésta información ha sido una labor titánica durante mucho tiempo, pero solamente en la última década se ha podido dilucidar la complejidad de estructuras y mecanismos que contribuyen hoy a entender qué es el gen. La información genética completa de un organismo compuesta por muchos genes se conoce con el nombre de genoma. El genoma contiene la información para la construcción de todas las estructuras celulares y las actividades a lo largo de la vida de una célula u organismo.

Solo a mediados de los años setenta con el desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y posteriormente con los métodos de secuenciación de ADN, se pudo estudiar la organización molecular del gen al nivel de la base nucleotídica. En los vegetales se ha estimado que existen entre 10.000 y 100.000 genes según la complejidad de la planta. Los genes varían ampliamente en longitud, teniendo la mayoría de ellos varios miles de bases. Sin embargo, solo aproximadamente el 10% del genoma contiene secuencias codificantes para la síntesis de proteínas. Estas secuencias llamadas exones contienen el código genético que es leído y es finalmente traducido en proteínas. Entre los exones, se encuentran secuencias que no tienen funciones codificantes (intrones). Algunas de éstas secuencias son secuencias reguladoras, necesarias para llevar a cabo la expresión de la información genética. Las secuencias de ADN pueden estar presentes en diferentes cantidades, variando entre una a millones de copias por célula o genoma haploide. Estas secuencias repetidas se pueden encontrar seguidas en el cromosoma o pueden estar dispersas a lo largo del genoma. Normalmente, estas secuencias se encuentran agrupadas o en los centrómeros o en los telómeros de los cromosomas.

Todos los organismos vivientes están compuestos de proteínas, las cuales son moléculas grandes y complejas, compuestas por cadenas de subunidades llamadas aminoácidos. Veinte aminoácidos diferentes son usualmente los que componen las proteínas. En el gen, cada secuencia de 3 bases se conoce con el nombre de codón, en el cual se encuentra el código para la síntesis y ensamblaje de cada aminoácido. Por ejemplo, la secuencia ATG codifica para el aminoácido metionina. Debido a que 3 bases codifican para un aminoácido, la proteína codificada por un gen de 3000 pb, estará compuesta de 1000 aminoácidos.

El código genético es una serie de codones en los cuales está especificado cuales aminoácidos son necesarios para sintetizar proteínas determinadas. Las instrucciones que están en los genes para llevar a cabo la síntesis de proteínas, son transmitidas indirectamente a través de una molécula llamada ARNm (ARN mensajero), la cual es similar a una de las dos cadenas del ADN. Para que la información que se encuentra en el gen sea expresada, una molécula de ARN complementaria es producida a partir

del ADN molde mediante un proceso llamado transcripción. Este ARNm se transporta desde el núcleo al citoplasma donde sirve como molde para la síntesis de proteínas. La maquinaria celular traduce los codones en cadenas de aminoácidos que formarán finalmente la molécula de proteína. En el laboratorio, es posible aislar la molécula de ARNm y usada como molde para sintetizar una cadena de ADN complementario (ADNc), la cual puede ser posteriormente usada con el fin de localizar genes de interés y ser ubicados en un mapa genético.

Genoma

Los estudios sobre organización del genoma son importantes para el entendimiento de la función y evolución del mismo y para dar información que permita diseñar estrategias para su manipulación.

Las características de un organismo están especificadas en su información genética la cual esta representada como una secuencia de ácido nucléico. La suma total de esta secuencia es lo que conforma su genoma. En general el tamaño del genoma es proporcional a la complejidad fenotípica del organismo y esto va de acuerdo a el número de productos génicos necesarios para la replicación y mantenimiento funcional de nuevos individuos.

La información genética almacenada en los cromosomas (**Figura 1**), es multiplicada en dos pasos secuenciales: **Transcripción** en donde una porción lineal del gene es copiado dentro de una molécula de RNA de cadena única y **Traducción** : en los ribosomas el RNA mensajero es traducido dentro de aminoácidos unidos covalentemente (cadena polipeptídica). Una vez liberados del ribosoma, la cadena polipeptídica puede estar sujeta a modificaciones post-traduccionales.

El flujo de información genética de DNA a RNA esta altamente regulado en todas las células y coordinado. Tal control en la expresión genética es necesario para evitar que haya un gasto innecesario de energía sintetizando un producto que no sea necesitado por la célula. Así, la expresión de genes puede estar restringida a algún tiempo durante el desarrollo de un organismo, en la expresión en ciertos tipos de células, o en respuesta a estímulos externos, o requerido por todas las células en todos los estadios.

Organización de Genomas de Organelas

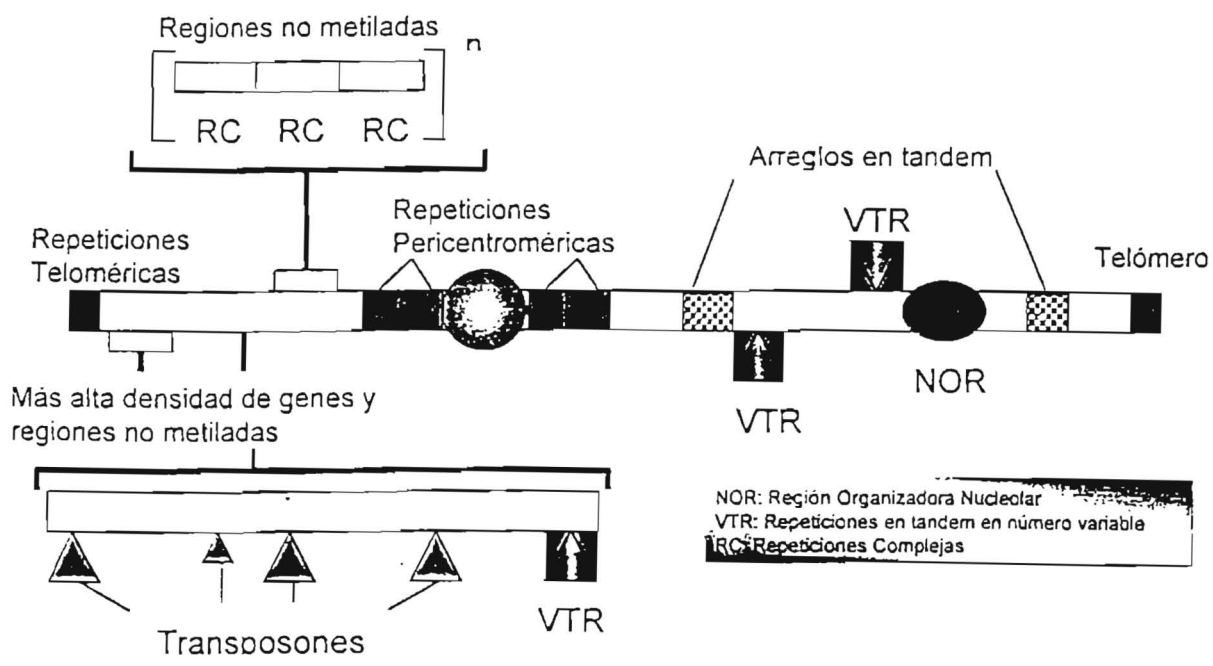
Las mitocondrias y cloroplastos poseen genomas de ADN que codifican para todos las especies de ARN y algunas de las proteínas involucradas en las funciones de la organela. En eucariotes primitivos el ADN mitocondrial es lineal pero usualmente los genomas de las organelas tienen la forma de una molécula de ADN circular. Debido a que cada organela contiene varias copias del genoma y a que existen muchas organelas por célula, el ADN de organelas constituye una secuencia repetitiva.

Genoma de Cloroplasto: Se han realizado varios estudios con el fin de elucidar el tamaño y la organización general de muchas moléculas de ADN de cloroplasto utilizado

mapeo por enzimas de restricción. La forma general del ADN ct de eucariotes primitivos y superiores es una secuencia de 10-24Kb que esta presente en dos copias idénticas como una unidad invertida.

Genoma de Mitochondria: El genoma de mitocondria varía enormemente en tamaño y esto hace imposible generalizar sobre su organización. El ADN de mitocondria de 3 especies (humano, ratón y vaca) han sido secuenciados y la organización del genoma es similar.

Fig 1. Representación esquemática de la organización de un cromosoma vegetal (Flavell, 1996)



ADN FINGERPRINTING

Los marcadores moleculares basados en la variación de las secuencias del ADN (minisatélites, microsátélites y otros) han dado una herramienta para distinguir entre genotipos estrechamente relacionados.

En 1985, Jeffreys y colaboradores desarrollaron el primer fingerprint multilocus de ADN y especularon que estos patrones de ADN podían ser un poderoso método para identificación individual y prueba de paternidad. En abril de 1985 el primer caso de disputa de migración fue satisfactoriamente resuelto por esta metodología.

Este análisis de ADN se puede hacer a partir de muestras de sangre, semen, fluido vaginal, cabellos rotos, células bucales.

Los resultados o patrones moleculares obtenidos con estas técnicas son heredables y únicos para cada individuo, algo similar a las huellas digitales, de ahí que hoy en día son muy utilizados para resolver casos de paternidad disputada, casos de violación y medicina forense. En el caso de plantas es de gran utilidad en la certificación de variedades y semillas, escoger parentales en programas de mejoramiento, estructura genética de poblaciones, estudios de diversidad y variabilidad genética, etc.

El ADN fingerprinting da fenotipos de ADN, no genotipos, en la cual la información sobre los loci y alelos no está disponible. En contraste, minisatélites ya clonados producen patrones de hibridización de ADN específica de locus de la cual la información genotípica puede ser deducida lo que es de crítica importancia para análisis de ligamientos. Cientos de minisatélites clonados han sido aislados ya sea por rastreo de librerías genómicas con clones los cuales detectan locis hipervariables o por hibridización de las librerías con oligonucleótidos basados sobre secuencias de minisatélites ya conocidas o por clonación selectiva de fragmentos de ADN en bacteriófagos vectores. Muchos de estos minisatélites clonados han sido localizados en el genoma humano. Ellos se han encontrado sobre cada cromosoma, incluyendo el X y la región de XY. Los minisatélites no se encuentran distribuidos a lo largo del genoma sino preferentemente localizados cerca a los extremos de los cromosomas humanos. (Tomado de Jeffreys and Pena, 1993)

Además de utilizar los minisatélites para tipificación de DNA, los microsátélites también pueden ser aplicados al ADN fingerprinting. El ADN fingerprinting con oligonucleótidos complementarios a las secuencias cortas tienen varias ventajas: son más rápidas ya que los pasos de prehibridización pueden ser omitidas. Oligonucleótidos sondas como (CAC)₅ y (GATA)₄ son ahora utilizadas como sondas multilocus, revelando regiones hipervariables en muchos organismos eucariotes como animales y vegetales (Epplen, et. al., 1991).

BIOINFORMÁTICA

Introducción

El desarrollo de las técnicas en Biología Molecular ha permitido generar de una manera mucho más eficaz y rápida una gran cantidad de información. Un ejemplo claro lo constituye la secuenciación de ADN (secuenciación del genoma humano). En los años 70s mediante la secuenciación manual, se estimaba que se lograba obtener información a razón de 1500 pb/año/persona. Actualmente con la completa automatización de obtención y análisis de datos de secuencia se estima que se logran secuenciar 1'000,000 pb/año/persona. Estos avances producen una elevada cantidad de información, la cual plantea a su vez la necesidad de generar sistemas altamente eficientes para su almacenamiento y manejo

Dentro de este contexto surge un nuevo concepto en Biología Molecular que ha tomado un gran auge y desarrollo recientemente, y que une a la Biología Molecular con la Biología Computacional. Es en este momento cuando comenzamos a referirnos a una nueva disciplina conocida como Bioinformática.

El objetivo fundamental de la Bioinformática es desarrollar estrategias computacionales para:

- el almacenamiento y depuramiento de la información y
- analizar y examinar datos generados.

La Bioinformática permite, además, en cierta medida resolver preguntas de tipo biológico, relacionadas con la asignación de posibles funciones a regiones codificadoras no caracterizadas. De igual manera, permite entender las interacciones entre los genes y sus productos en las células, y todo esto a la luz de la evolución de las familias de genes dentro y entre especies.

Con las herramientas que ofrece la Bioinformática, una vez generada una secuencia se puede establecer con que otras secuencias previamente reportadas en una base de datos presenta similitud. También es posible tener acceso a dichas secuencias y con ellas es posible generar un alineamiento que permitirá posteriormente establecer relaciones evolutivas o encontrar regiones conservadas. Todas estas aplicaciones se muestran en el diagrama de flujo y serán desarrolladas en el texto y a manera de ejercicio.

Bases de datos

El GenBank

Para cumplir con el primer objetivo (almacenamiento y depuración de la información), la Bioinformática ha recurrido al diseño y desarrollo de bases de datos muy potentes y altamente eficaces.

El comienzo de las bases de datos computacionales se inició en 1982 con los trabajos de la EMBL (European Molecular Biology Laboratory) la cual posteriormente se unió al GenBank. En ese momento ambos centros contribuían mutuamente en la actividad de ingresar la información, lo cual consistía principalmente en la transcripción de las secuencias publicadas en los artículos a un formato apropiado para ser usado en computador. La base de datos que se creó en Japón (DDBJ DNA Data Base of Japan) se unió poco años después. En 1988 se reunieron estos tres grupos (EMBL, GenBank y DDBJ) y unificaron criterios y formatos.

Así, el GenBank es la base de datos de secuencias genéticas que han sido reportadas y son de dominio público. Estas secuencias son aportadas principalmente por los proyectos de secuenciación a gran escala o por remisión directa de laboratorios individuales.

Existen aproximadamente 2,570,000,000 bases en 3,525,000 reportes de secuencias hasta abril de 1999.

La base de datos del GenBank es parte de la International Nucleotide Sequence Database Collaboration, la cual comprende las bases de datos de ADN de Japón (DDBJ), y de Europa EMBL), y del GenBank propiamente dicho del NCBI (National Center for Biotechnology Information). Estas tres organizaciones intercambian información diariamente.

Los datos del GenBank pueden ser adquiridos a través del sistema integrado de recuperación del NCBI, Entrez.

La información generada a través de estos grandes proyectos si bien se ha centrado principalmente en la secuenciación de genomas completos, también ha generado una copiosa información sobre estructura y ubicación de genes y/o secuencias ya identificadas. Esta información ha sido también almacenada en otro tipo de bases de datos.

Entrez

Desde un principio se planteó la necesidad de poder obtener información de varias bases de datos de una manera simultánea. De no existir estrategias computacionales que permitiesen establecer una relación coordinada entre estas bases de datos, sería necesario visitar cada una de ellas por separado. La respuesta a esta necesidad se

encontró con la generación de un sistema conocido como Entrez, el cual fue desarrollado y es mantenido por el NCBI.

Algunas aplicaciones usando las bases de datos:

Alineamiento de secuencias y búsqueda en bases de datos

Una de las principales metas de los investigadores es poder establecer el tipo de relación que existe entre dos secuencias. Este tipo de relación puede cubrir dos conceptos: la similitud que es una medida observable y puede ser expresada, como por ejemplo, porcentaje de identidad. Homología, mientras tanto, implica una relación funcional o evolutiva.

A pesar de que las búsquedas en bases de datos revelan únicamente similitud, es posible que a partir de esta similitud se pueda inferir homología (relación evolutiva) y de allí se podrían establecer algunos principios sobre la función.

Búsqueda de similitud en bases de datos

Una vez se ha generado una secuencia de nucleótidos, en algunos casos se desea saber si corresponde a algún gen, o en otros interesa asegurarse de si lo que se ha obtenido corresponde a aquello que se esperaba. La búsqueda de similitud en la base de datos permite determinar con que tipo de secuencias esta potencialmente relacionada una secuencia recién generada.

Al hacer una búsqueda en la base de datos, la operación básica que se realiza es un alineamiento progresivo de la secuencia recién generada (conocida como query) con cada una de las secuencias presentes en la base de datos. Los resultados son reportados como un listado de "hits" seguido por una serie de alineamientos individuales más varios "scores" y estadísticas. Dada la gran cantidad de información almacenada en la base de datos se debe tener en cuenta los algoritmos computacionales bien diseñados que permiten desarrollar este tipo de búsquedas a una alta velocidad y de una manera confiable.

Ejemplo de un algoritmo para usar con las bases de datos: BLAST

Para desarrollar los alineamientos se han generado diferentes algoritmos matemáticos, los cuales pueden ser clasificados, basados en el método que emplean, en dos grandes grupos: el de programación dinámica y el heurístico. Dentro de los primeros se encuentran los algoritmos de Needleman-Wunsch y de Smith-Waterman. Estos algoritmos trabajan muy lentamente y por esta razón se han diseñado los algoritmos heurísticos que quizás no son tan finos como los primeros pero que dan resultados muy rápidamente y de buena confiabilidad. Los programas BLAST y FASTA, trabajan basados en algoritmos de este tipo.

El tipo de reporte o salida de computador que aparece después de la búsqueda empleando el programa BLAST es como muestra la Figura 2.

Primero aparece el esquema gráfico: Cada color da una información determinada.

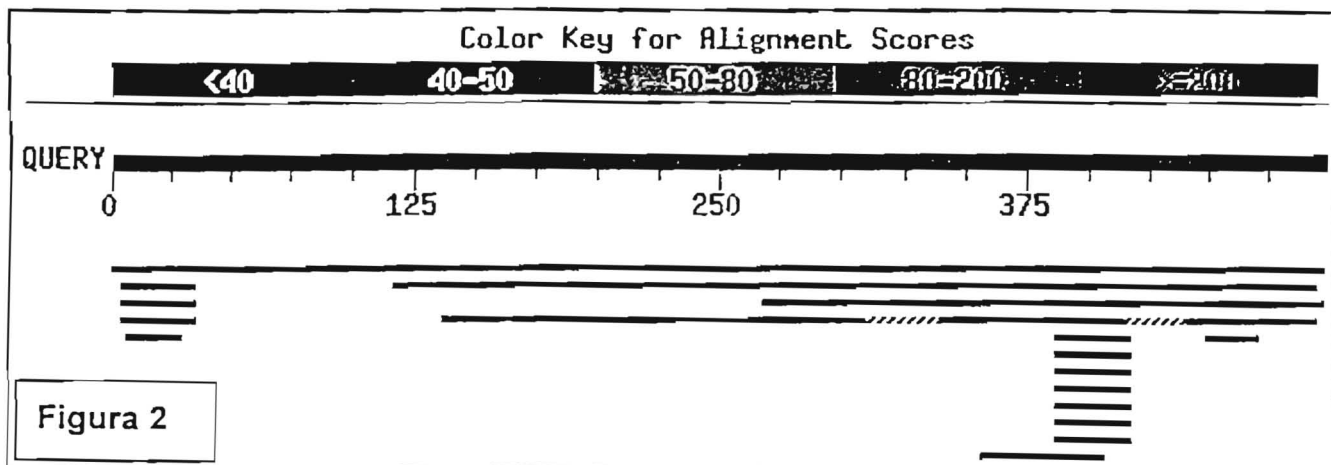


Figura 2

Los resultados de las búsquedas son acompañados de estadísticos .

```
gb|J04103|MUSSETS2 Mouse erythroblastosis virus oncogene homolog... 989 0.0
gb|J04102|HUMETS2A Human erythroblastosis virus oncogene homolo... 301 6e-80
gb|AF057716|AF057716 Ovis aries transcription factor Ets-2 mRNA... 204 1e-50
```

Después aparecen los alineamientos.

```
Query: 1 cgtcagtccccgccacctccccggccccgcgccccggatcgccctacggcctcgtctc 60
      |||
Sbjct: 1 cgtcagtccccgccacctccccggccccgcgccccggatcgccctacggcctcgtctc 60
```

```
Query: 61 gcccggccttgcgcgccgggaccgccgcatctctctccccgccccctccggctggcc 120
      |||
Sbjct: 61 gcccggccttgcgcgccgggaccgccgcatctctctccccgccccctccggctggcc 120
```

Finalmente, de acuerdo a lo anterior se dan los resultados de la búsqueda, permitiendo establecer la relación de similitud de la secuencia problema con porciones de secuencias de organismos depositadas en las bases de datos.

ALGUNOS SITIOS WEB DE INTERÉS

	DEFINICIÓN	SITIO WEB	OBSERVACIONES
EMBL	European Molecular Biology Laboratory	http://www.ebi.ac.uk/	Homepage.
GenBank	(National center for Biotechnology Information)	http://ncbi.nlm.nih.gov	
Entrez		http://ncbi.nlm.nih.gov/Entrez/	Permite obtener información de la base de datos del GenBank, de publicaciones, etc.
BLAST	Basic Local Aligment Search Tool	http://ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/	Búsqueda de similitud
ClustalW	Programa de alineamiento	http://www2.ebi.ac.uk/clustalw/	Permite realizar alineamiento múltiple de secuencias de ADN y de aminoácidos
ClustalX		ftp://ftp-igbmc.ustrasbg.fr/pub/ClustalX/	Interfase gráfica de ClustalW

GLOSARIO DE ALGUNOS TÉRMINOS USADOS EN BIOLOGÍA MOLECULAR

ADN de copia única	Secuencia de ADN la cual esta presente una vez por genoma haploide
ADN repetitivo	Secuencias de ADN las cuales están representadas por más de una copia por genoma haploide. también llamado ADN de copia múltiple
ADN polimerasa	Enzima la cual cataliza la replicación de ADN usando como molde ADN de cadena única
Alelo	Forma alternativa de un gen para un locus en particular
CDNA	"ADN copia" producido por transcripción reversa de ARN mensajero (mRNA) por una transcriptasa reversa
Cebador	ver Oligonucleótido
Clonación	Se refiere al aislamiento de una línea celular en particular conteniendo un fragmento de ADN deseado
Desoxirribonucleasa	Enzima que degrada ADN Distancia: medida matemática de diferencia entre 2 unidades taxonómicas
Electroforésis	Separación de moléculas en un campo eléctrico
Endonucleasa de restricción	Enzima la cual corta ADN. Más comúnmente conocida como enzima de restricción tipo II, la cual corta el ADN en un sitio específico (secuencia de 4-8 nucleótidos)
Fenotipo	Propiedades observados de un caracter o grupo el cual son los productos de su base genética modificados por el medio ambiente y otros factores epigenéticos (ver genotipo, plasticidad fenotípica)
Genoma	Dotación de información genética propia de cada especie
Genotipo	Código genético el cual determinada propiedades de un caracter o grupo (ver fenotipo)
Huellas digitales de ADN	Complejo de bandas electroforéticas producidas por numerosos "loci" polimórficos sobre un gel en particular, como resultado del análisis de restricción con sondas de ADN repetitivas

Librería de ADN	Una colección representativa de fragmentos de ADN genómicos clonados (ver librería genómica)
Librería de cDNA	Una colección representativa de fragmentos de ARN mensajeros clonados
mtADN	ADN mitocondrial
Oligonucleotido	Fragmento corto de ADN de cadena única (usualmente de 10-30 bases) frecuentemente usado como cebador para secuenciación de ADN o PCR
Pb	Par de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa, un poderoso método usado para amplificación <i>in vitro</i> de ADN a partir de ciclos repetidos de cebadores dirigidos para la síntesis de una secuencia blanco usando una ADN polimerasa estable al calor
Plásmido	Un elemento extracromosomal dentro de la célula bacteriana el cual es usualmente capaz de replicarse en forma autónoma. Puede ser usado como vector para clonación de fragmentos de ADN heterólogos.
rDNA	ADN ribosomal el cual contiene los genes codificantes para ARN ribosomal maduro (17S, 5.8S, y 5S y 25S)
RFLP	Polimorfismo en las longitudes de los fragmentos de restricción
Sonda	Fragmento de ADN (o ARN) marcado radioactivamente o no; usado en hibridización de ADN
Taq polimerasa	ADN polimerasa termoestable proveniente de la bacteria acuática <i>Thermus aquaticus</i>

GLOSARIO SOBRE BIOSEGURIDAD y ORGANISMOS MODIFICADOS GENÉTICAMENTE

ACCIDENTE. Cualquier incidente que suponga una liberación de organismos modificados genéticamente durante su utilización contenida o confinada y que presente o pueda presentar un peligro inmediato o diferido para la salud humana o para el medio ambiente.

CONFINADO. Este término es usado para describir métodos seguros de mantenimiento y control de organismos transgénicos, para este caso cultivo en invernadero. Consiste en minimizar un posible impacto ambiental por el manejo de plantas transgénicas a nivel de este tipo de instalaciones.

CONTENIDO. Este término es usado para describir métodos seguros de mantenimiento y control de organismos transgénicos en almacenamiento, transporte y laboratorio. Su propósito es minimizar exposiciones innecesarias del hombre o del medio ambiente a organismos que representan un riesgo potencial.

DIVERSIDAD BIOLÓGICA. Se entiende la variabilidad de organismos vivos de cualquier fuente, incluidos entre otros, los ecosistemas terrestres y marinos y otros ecosistemas acuáticos y los complejos ecológicos de los que forman parte; comprende la diversidad dentro de cada especie, entre las especies y de los ecosistemas.

ECOSISTEMA. Se entiende un conjunto dinámico de comunidades vegetales, animales y de microorganismos en su medio no viviente que interactúan como una unidad funcional.

EVALUACIÓN DEL RIESGO. Metodologías para calcular qué daños podrían causarse, con qué probabilidad se presentarían y la escala para estimar su magnitud.

GEN. Unidad básica hereditaria, que se localiza en los cromosomas de las células y se duplica durante cada división celular; permite la transmisión de los caracteres hereditarios del organismo progenitor a sus descendientes.

GERMOPLASMA. Generalmente se refiere a una muestra de individuos de una población (que puede incluir una o varias especies) y que representan una porción

significativa de la variabilidad genética de dicha(s) especies. La variabilidad genética está representada en el material hereditario que contiene dicha muestra y generalmente está almacenada viva (colecciones de microorganismos, células, plantas, semillas, animales vivos, entre otros), crio-conservada (congelada) o como muestras de ADN.

INGENIERÍA GENÉTICA. Técnicas de recombinación de ADN o ARN.

LIBERACIÓN EN EL MEDIO AMBIENTE. El uso de un producto manipulado fuera de los límites de un confinamiento físico normal de un recinto cerrado, laboratorio, invernadero, fermentador o cualquiera otra estructura cerrada bajo las condiciones de bioseguridad establecidas.

MANEJO DEL RIESGO. Medidas tendientes a prevenir la ocurrencia del riesgo y a mitigar los efectos de éste, si llegare a presentarse.

MATERIAL GENÉTICO. Se entiende todo material de origen vegetal, animal, microbiano o de otro tipo que contenga unidades funcionales de la herencia.

ORGANISMO DONANTE. Un organismo del cual el material genético es extraído para ser insertado dentro, o en combinación con otro organismo.

ORGANISMO RECEPTOR. Un organismo que recibe material genético de un organismo donante,

ORGANISMO TRANSGÉNICO, U ORGANISMO MODIFICADO GENÉTICAMENTE POR BIOTECNOLOGÍA (OMG): Organismo cuyo material genético (ADN/ARN) ha sido alterado por técnicas de ingeniería genética.

ORGANISMO. Cualquier forma viva de los cinco reinos (protista, monera, fungi, vegetal y animal).

PLANTA TRANSGÉNICA. Planta cuyo material genético fue transformado por medio de la adición de ADN de una fuente diferente del germoplasma parental, con uso de técnicas de ADN recombinante.

RIESGO. Combinación entre la magnitud de las consecuencias de una amenaza y la probabilidad de que tales consecuencias se presenten.

SEMICONFINADO. Se refiere a los métodos y prácticas para el manejo seguro de material que esté siendo evaluado en campo con el fin de minimizar el impacto ambiental en el proceso de prueba de materiales transgénicos que tienen posibilidad de comercialización. Se consideran dos niveles: Pruebas a nivel de parcela experimental y pruebas a nivel semicomercial. La evaluación del riesgo en este tipo de pruebas se juzga con un alto componente cualitativo, por lo que es esencial el análisis caso por caso, teniendo en cuenta la experiencia acumulada y la familiaridad con la especie en estudio.

VECTOR O AGENTE VECTOR. Organismo, material u objeto utilizado para transferir material genético del organismo donador al organismo receptor.

USUARIO. Cualquier persona natural o jurídica, pública, privada o mixta, nacional o extranjera, que realice actividades de introducción, uso, investigación, manejo, liberación al ambiente y comercialización en el territorio nacional de organismos genéticamente modificados, así como de las materias primas y productos derivados de éstas. Cualquier consumidor que compra y/o utiliza un OMG no es un usuario en el sentido de esta regulación a menos que su uso esté sometido a condiciones específicas.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA

Qué son y para qué sirven las plantas transgénicas?

Las plantas transgénicas o genéticamente modificadas, y en general todos los organismos transgénicos, son aquellos a los cuales se les ha introducido material genético nuevo (p.e., nuevos genes, nueva información genética), a través de medios no convencionales (sin necesidad de hacer cruzamientos de tipo sexual). Los nuevos genes pueden provenir de individuos de la misma especie o de otras especies, lo cual rompe la **barrera de la compatibilidad sexual** entre dos organismos para intercambiar información genética.

Se han utilizado básicamente dos mecanismos para obtener transgénicos:

- 1- La transformación mediada por un vector natural como es la bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens* (Figura 3).
- 2- La transformación mediada por el **bombardeo de micropartículas** recubiertas con el material genético de interés (Figura 4).

Ambas figuras muestran que el material genético es introducido en células individuales, de las cuales se puede **regenerar un organismo completo** que expresa los genes que se le han introducido. Dentro de los genes introducidos generalmente van genes que permiten **seleccionar** las células que los han recibido. En el caso de las plantas, la nueva tendencia es usar genes que le permiten a las células alimentarse de azúcares que no utiliza en condiciones naturales (por ejemplo, manosa en vez de sacarosa).

Dependiendo del gen introducido, así mismo es la **utilidad de la planta transgénica**. Por ejemplo, la mayoría de las plantas transgénicas comercializadas hoy contienen genes de **resistencia a herbicidas y a plagas** (virus, insectos, y bacterias entre otros). Estas características pueden ser útiles para el agricultor, el productor de semillas, e indirectamente el consumidor, por el menor uso de pesticidas para controlar plagas, que igualmente beneficiaría al medio ambiente. Si el gen introducido mejora la **calidad nutritiva** de la planta y sus derivados comestibles (raíces, frutos, hojas, etc), el beneficiario directo sería el consumidor. El caso más reciente es el del arroz con alto contenido de Vitamina A .

En el **CIAT** se han desarrollado plantas transgénicas con resistencia a virus (arroz) y a herbicida (yuca, pastos tropicales), y actualmente se trabaja en la introducción de resistencia a insectos (en yuca). Existen también plantas transgénicas de frijol (*P. acutifolius*) con genes marcadores de selección. También se está colaborando con instituciones como la Universidad Nacional, CENICANA y CORPOICA para aplicar esta tecnología en tomate, frutales y caña de azúcar.

La liberación (pruebas en campo, comercialización y/o consumo) de plantas transgénicas está regida por normas de **Bioseguridad** establecidas en Colombia por el ICA. Esta reglamentación tiene como objetivo minimizar o prevenir el impacto negativo

que pudieran tener los organismos transgénicos y sus derivados en el ambiente y la salud humana. Por ser una tecnología "nueva", con gran potencial para mejorar el bienestar del hombre, deben tomarse precauciones para minimizar los efectos no deseados.

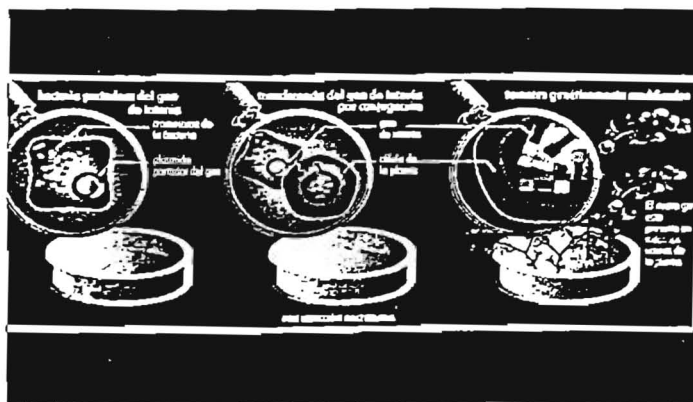


Figura 3.
Esquema del proceso de transformación genética mediada por *Agrobacterium*.
Fuente: Mundo Científico (1999).

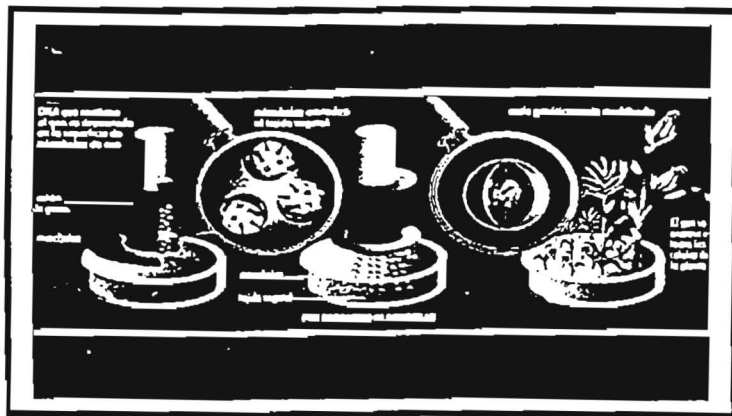


Figura 4.
Esquema de la transformación genética mediada por bombardeo de micropartículas.
Fuente: Mundo Científico (1999).



January 2002

Dear Friends and Colleagues:

PREVIEW

Global Review of Commercialized Transgenic Crops: 2001 by Clive James, ISAAA Briefs No. 24-2001


I have pleasure in sending you the enclosed Brief, which is the sixth that I have authored in an annual review series, published as ISAAA Briefs, to characterize and monitor the global status of commercialized transgenic or GM crops. Brief 24 provides the most recent data on transgenic crops globally for 2001, and features the following highlights:

- The estimated global area of transgenic or GM crops for 2001 is 52.6 million hectares (has.) or 130.0 million acres, grown by 5.5 million farmers. 2001 is the first year when the global area of GM crops has exceeded the historical milestone of 50 million has.
- The increase in area between 2000 and 2001 is 19%, equivalent to 8.4 million has. or 20.8 million acres. This increase is almost twice the corresponding increase of 4.3 million has. between 1999 and 2000, which was equivalent to an 11% growth.
- During the six-year period 1996 to 2001, global area of transgenic crops increased more than 30-fold, from 1.7 million has. in 1996 to 52.6 million has. in 2001.
- More than one quarter of the global transgenic crop area of 52.6 million has. in 2001, equivalent to 13.5 million has., was grown in developing countries where growth continued to be strong.
- In 2001, four principal countries grew 99% of the global transgenic crop area. The USA grew 35.7 million has. (68% of global total), followed by Argentina with 11.8 million has. (22%), Canada 3.2 million has. (6%) and China 1.5 million has. (3%); China had the highest year-on-year percentage growth with a tripling of its *Bt* cotton area from 0.5 million has. in 2000 to 1.5 million has. in 2001.
- Globally, the principal GM crops were GM soybean occupying 33.3 million has. in 2001 (63% of global area), followed by GM corn at 9.8 million has. (19%), transgenic cotton at 6.8 million has. (13%), and GM canola at 2.7 million has. (5%).
- During the six-year period 1996 to 2001, herbicide tolerance has consistently been the dominant trait with insect resistance second.

- In 2001, herbicide tolerance, deployed in soybean, corn and cotton, occupied 77% or 40.6 million hectares of the global GM 52.6 million has., with 7.8 million has. (15%) planted to *Bt* crops, and stacked genes for herbicide tolerance and insect resistance deployed in both cotton and corn occupying 8% or 4.2 million has. of the global transgenic area in 2001.
- The two dominant GM crop/trait combinations in 2001 were: herbicide tolerant soybean occupying 33.3 million has. or 63% of the global total and grown in seven countries; and *Bt* maize, occupying 5.9 million has., equivalent to 11% of global transgenic area and planted in six countries; the other six GM crops occupied 5% or less of global transgenic crop area.
- On a global basis, 46% of the 72 million has. of soybean were GM in 2001- up from 36 % in 2000; 20% of the 34 million has. of cotton were GM - up from 16 % in 2000; areas planted to GM canola and maize, were unchanged from 2000 at 11% of the 25 million has. of canola, and 7% of the 140 million has. of maize. If the global areas (conventional and transgenic) of these four principal GM crops are aggregated, the total area is 271 million has., of which 19% is GM, up from 16% in 2000.
- In the first six years, 1996 to 2001, a cumulative total of over 175 million has. (almost 440 million acres) of GM crops were planted globally in 16 countries, and met the expectations of millions of large and small farmers.
- The number of farmers that benefited from GM crops increased from 3.5 million farmers in 2000 to 5.5 million in 2001. More than three quarters of the farmers that benefited from GM crops in 2001 were resource-poor farmers planting *Bt* cotton, mainly in China and also in South Africa.
- There is cautious optimism that global area and the number of farmers planting GM crops will continue to increase in 2002

In an effort to cater to the information needs of developing countries relative to transgenic crops, ISAAA's policy is to distribute free copies of Briefs to nationals of developing countries. We will be pleased to send complimentary copies to colleagues in developing countries upon request. To cover the costs of publication, ISAAA charges a nominal US\$25 per copy (including postage) for the Briefs for orders from industrial countries. We encourage you to share comments and suggestions with us on the ISAAA Brief series so that we can better meet your information needs on the fast developing science of crop biotechnology.

Best regards.



Dave James

**Sitios de Interés en la Web (web pages) sobre Biotecnología
(Plantas Transgénicas, Bioseguridad, Seguridad de Alimentos, entre otros)**

- **Entidades Gubernamentales**

US Federal Drug Administration: CDER Freedom of Information Office
<http://www.fda.gov/cder/foi/index.htm>

La Agencia de Protección Ambiental de los USA (EPA)
<http://www.epa.gov/>

- **Industria**

Biotechnology Industry Organization
<http://www.bio.org>

- **ONG**

American Council of Science and Health: Food Safety
<http://www.acsh.org/food/index.html>

Greenpeace
<http://www.greenpeaceusa.org>

Friends of the Earth (USA y Europa)
<http://www.foe.org/>
<http://www.foeeurope.org>

- **Organizaciones Internacionales**

FAO: ELECTRONIC FORUM ON BIOTECHNOLOGY IN FOOD AND AGRICULTURE
<http://www.fao.org/biotech/forum.htm>

Información sobre Biotecnología de Plantas
<http://www.checkbiotech.org/root/index.cfm>

AgBio Forum. Special Issue: The Codex Alimentarius Commission And GM Food Labeling
<http://www.agbioforum.org/>

BINAS ONLINE. Noticias sobre biotecnología
<http://binas.unido.org/binas/>

Rural Advancement Foundation International
<http://www.isaaa.org/>

International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications
<http://www.isaaa.org/>

Programa de Desarrollo de las Naciones Unidas
<http://www.undp.org/>

CIAT
<http://www.ciat.cgiar.org>

- **Universidades**

Genetically Modified Pest-Protected Plants: Science and Regulation (2000)
<http://www.nap.edu/books/0309069300.html/>

Monarchs and Bt corn: questions and answers (6/14/1999)
<http://www.ent.iastate.edu/ipm/icm/1999/6-14-1999/monarchbt.html>

Información sobre cultivos transgénicos de Colorado State University
<http://www.colostate.edu/programs/lifesciences/TransgenicCrops>

Investigación sobre Transformación Genética en el CIAT

Un Pacto con la Sociedad

El CIAT realiza investigación social y ambientalmente progresiva dirigida hacia el mejoramiento de la cantidad y la calidad de los alimentos, la reducción de la pobreza y la conservación del medio ambiente en todo el trópico. Una manera como nuestros científicos contribuyen a estas metas consiste en hacer un mejor uso de la diversidad fitogenética mediante una investigación práctica, que busca solucionar problemas que satisfagan las necesidades de los agricultores en los países en desarrollo.

La tecnología de transformación genética es vital para aumentar la eficacia y acelerar el ritmo de esa investigación. Por consiguiente, el CIAT estudia, desarrolla, difunde y hace un seguimiento de esta tecnología, al igual que los productos desarrollados a partir de ésta, mediante asociaciones colaborativas con programas nacionales de investigación y con las autoridades de bioseguridad de cada país.

En nuestro trabajo donde utilizamos herramientas de transformación genética, nos apegamos a las normas dispuestas a continuación:

- En la búsqueda de soluciones genéticas para resolver los problemas de los agricultores, el CIAT da preferencia a los acervos de genes de especies cultivadas y de sus ascendientes y parientes silvestres.
- La mayor parte de la investigación sobre mejoramiento genético que hace el CIAT se basa en métodos convencionales de cruzamiento. Cuando estos enfoques demuestran ser poco promisorios para resolver problemas específicos, los científicos del Centro prueban la tecnología de transformación genética (como uno de los componentes de una estrategia de fitomejoramiento más amplia) en cuanto a su capacidad para mejorar, sin riesgo alguno, los rasgos que son claramente pertinentes a las metas humanitarias del Centro.
- En el desarrollo de cultivos transgénicos, el CIAT no emplea genes de origen animal ni humano.
- El CIAT evalúa, caso por caso, los riesgos de las plantas transgénicas que desarrolla para el trópico. En su investigación sobre bioseguridad, el Centro colabora activamente con sus socios nacionales, para determinar los posibles efectos ambientales de las tecnologías de transformación genética.

Transformación Genética en el CIAT

Centro Internacional de Agricultura Tropical

A.A. 6713, Cali, Colombia

z.lentini@cgiar.org

p.chavariaga@cgiar.org

j.tohme@cgiar.org

Resumen

Enfoque de Investigación

En el CIAT, la transformación genética se usa como uno de los componentes de las estrategias de fitomejoramiento en frijol, pastos *Brachiaria*, yuca y arroz. Las tecnologías de transformación se probaron en casos clave donde las alternativas estándares son mucho menos promisorias debido, por ejemplo, a la falta de genes, a la necesidad de modular la expresión de rasgos existentes o a la necesidad de introducir nuevos rasgos. El enfoque tradicional de transformación genética ha consistido en introducir fuentes nuevas de resistencia a tipos de estrés biótico. En la actualidad, se está prestando mayor atención a los rasgos de calidad de alimentos, tanto para consumo humano como para consumo animal, la adaptación ambiental de plantas, los temas de bioseguridad alimentaria y ambiental (por ejemplo, la bioseguridad del flujo de genes en parientes silvestres o malezas emparentadas en el trópico) y los análisis de costo-beneficio de estas nuevas tecnologías.

Equipo de Mejoramiento—Transformación Genética

Tony Bellotti	Matthew Blair	Lee Calvert	Hernán Ceballos
Paul Chavarriaga	Fernando Correa	Daniel Debouck	Myriam Duque
Martin Fregene	Zaida Lentini	César Martínez	Álvaro Mejía
John Miles	Joe Tohme		

Frijol

Se realizaron el bombardeo de partículas y la transformación mediada por *Agrobacterium* en la especie de frijol silvestre *Phaseolus acutifolius*. El frijol común *P. vulgaris* es altamente recalcitrante y, aunque se han desarrollado algunas plantas transgénicas, la metodología todavía no es reproducible para uso práctico. Actualmente se utiliza un esquema de retrocruzamiento congruente para hacer introgresión (transferencia de genes de una especie a otra) con una mayor respuesta de regeneración de *P. acutifolius* en *P. vulgaris*, mientras se preservan los rasgos agronómicos deseables del frijol. Ya se han generado híbridos transgénicos con este enfoque. Los genes de interés seleccionados para la incorporación incluyen aquellos que son

generación de plantas resistentes al virus de la hoja blanca del arroz, una enfermedad vírica endémica de importancia económica en América tropical. El genoma del virus se caracterizó en el CIAT; se clonaron los genes víricos y se introdujeron en la variedad de arroz CICA 8, cultivada por pequeños agricultores y utilizada en procesos de mejoramiento como material parental. En el campo, las mejores líneas transgénicas superaron en rendimiento a las variedades comerciales. Se están desarrollando cruzamientos avanzados, generados con esta fuente de resistencia transgénica, para desplegarla en un rango más amplio de materiales. También se está desarrollando arroz con resistencia al añublo de la vaina, para lo cual existe tolerancia en el campo, pero no resistencia genética. Los trabajos futuros incluyen la adaptación ambiental de plantas y rasgos de calidad.

Transformación genética y mejoramiento

En forma gradual se están aumentando las operaciones para introducir líneas transgénicas en procesos de mejoramiento. Se está siguiendo un enfoque interdisciplinario para evaluar las plantas transgénicas en condiciones de invernadero y de campo.

Ingeniería Genética de Precisión

Se asigna alta prioridad a la aceptación del público. Actualmente se hace énfasis en tecnologías de ingeniería genética de precisión para desarrollar eventos transgénicos limpios, que expresarán el gen de interés en el tejido seleccionado, sin necesidad de genes marcadores para seleccionar resistencia a antibióticos y herbicidas. El CIAT usa genes de plantas o de organismos relacionados.

Bioseguridad Ambiental

El CIAT participa activamente en la evaluación del impacto potencial del flujo de genes de plantas transgénicas hacia la estructura genética de poblaciones silvestres y tipo 'maleza' relacionadas. Se están utilizando el frijol y el arroz como modelos para ofrecer un escenario integral que sea aplicable al trópico y que incluye especies de cultivos nativos y líneas locales, sitios experimentales a escala de finca y otros factores.

Capacitación de Científicos, Funcionarios Gubernamentales y la Sociedad Civil

El CIAT también participa activamente en el fortalecimiento de capacidades en bioseguridad. En los últimos tres años, el CIAT ha desarrollado cursos para el Comité de Bioseguridad de Colombia, para mejoradores de América Latina y el Caribe, y para periodistas.

Expectativas de las Inversiones en Investigación

Asumiendo que la investigación seguirá orientada hacia el desarrollo eficaz de variedades de bajos insumos de mejor calidad, que satisfagan las necesidades de los socios nacionales, la investigación en bioseguridad

Investigación en Genómica en el CIAT

Centro Internacional de Agricultura Tropical
A.A. 6713, Cali, Colombia
j.tohme@cgiar.org

Resumen

Enfoque de Investigación

La investigación en genómica en el CIAT se enfoca hacia frijol, yuca, arroz y pasto *Brachiaria*. Se integra con los esfuerzos de mejoramiento y de caracterización de germoplasma. El CIAT se ha centrado en el mejoramiento de la resistencia a tipos de estrés biótico, especialmente en lo relacionado con enfermedades y plagas. Ahora, se hace énfasis en mejorar variedades en lo referente a un mayor valor nutritivo bajo condiciones de estrés abiótico. Actualmente hay varios proyectos que buscan desarrollar o incorporar las herramientas de genómica que son necesarias en el proceso de mejoramiento.

Equipo de mejoramiento—investigación en genómica

Steve Beebe	Matthew Blair	Hernán Ceballos	Daniel Debouck
Myriam Duque	Martin Fregene	César Martínez	Chike Mba
John Miles	Idupulapati Rao	Silvia Restrepo	Joe Tohme

Desarrollo de Marcadores

Una de las prioridades de los trabajos en genómica del CIAT ha sido usar los recursos existentes de marcadores de arroz y frijol para desarrollar nuevos marcadores a base de la RCP para frijol, yuca y pasto *Brachiaria*. En el CIAT se han desarrollado dos de los principales tipos de marcadores: los marcadores SCAR (región amplificada de secuencia conocida) y los RSS (repetición de secuencia simple) o microsatélites. Se desarrollaron paquetes de RSS para frijol, yuca y *Brachiaria*. Se han usado otros sistemas de marcadores, como AFLP y RAPD, para mapeo detallado, para aumentar la saturación de los mapas de frijol, yuca y *Brachiaria* y para estudiar la diversidad de los acervos de genes en frijol y yuca.

Mapeo Genético

Frijol: Todos los marcadores nuevos se trazan en la principal población de mapeo del CIAT, que ahora contiene más de 500 marcadores. Se está armando un grupo de microsatélites para el mapeo eficiente de otras poblaciones. Se identificaron marcadores ligados para el mosaico dorado del frijol, la antracnosis, el añublo bacteriano y la mancha angular, y se están

resistente a múltiples enfermedades, incluyendo la antracnosis y la mancha angular. Más de 140,000 clones han sido colocados en placas y obtenido de placas, con 384 receptáculos. Se han construido bibliotecas cADN de raíces adventicias y basales cultivadas bajo estrés de deficiencia de P. Hasta el momento se han analizado las secuencias de cerca de 4000 clones de estas bibliotecas. Muchas de las secuencias expresadas (EST) tienen homólogos en la base de datos de soya.

Yuca: Un proyecto sobre EST, realizado en colaboración con IRD y CNRS (Francia), busca generar EST de cuatro colecciones o bibliotecas de cADN construidas, utilizando mRNA de un genotipo resistente a CBB y de un genotipo con alto contenido de almidón. Un segundo proyecto, sobre SAGE para CMD, está en marcha con la colaboración del Centro de Investigación en Biotecnología Iwate de Japón. Hasta el momento se han desarrollado más de 4000 EST para anotación.

Pasto *Brachiaria*: Se están desarrollando bibliotecas de cADN radical, a partir de progenitores resistentes y sensibles al Al, para hacer seguimiento a la expresión de genes en los ápices radicales y para identificar genes que pueden servir de candidatos para la resistencia al Al.

Análogos de Genes que Confleren Resistencia

El CIAT ha generado y analizado análogos de genes que confieren resistencia, utilizando iniciadores degenerados para las regiones cerradas para NBS-LRR, TIR y P para arroz, frijol, yuca y pasto *Brachiaria*.

Poblaciones Mutantes Generadas por Inserción de ADN

El CIAT está colaborando con Steve Dellaporta, de la Universidad de Yale, con parte de un proyecto de arroz Ac/Ds, financiado por USDA. Ya se han iniciado las discusiones con CIRAD e IRD (Francia) para utilizar una población de arroz T-ADN.

Bioinformática y Bases de Datos

El CIAT forma parte de un consorcio de centros del GCIAI que busca crear herramientas de bioinformática para relacionar el mapeo, los análisis de QTL y las evaluaciones de germoplasma. Se está enfatizando en la creación de bases de datos para manejar la información sobre genotipos y mapeo genético y establecer el almacenamiento de secuencias. Se están actualizando los datos sobre marcadores moleculares contenidos en las bases de datos *BeanGenes* y *CassavaDB AceDB* del CIAT. Un sistema LIMS está en la etapa final de desarrollo.

Microarreglos y SNP

A mediados de 2001, el CIAT diseñó una infraestructura para microarreglos de ADN, que facilitará el desarrollo de nuevos sistemas de marcadores genéticos basados en un sistema de colecciones de diversidad desarrollado en CAMBIA. Generará chips de ADN para la expresión de genes para tipos

CIAT BIBLIOTECA
FECHA DE DEVOLUCION

--	--	--

+