

Programa de BIOTECNOLOGÍA VEGETAL

Carrera: *Licenciatura en Biotecnología*

Asignatura: *Biotecnología Vegetal*

Núcleo al que pertenece: *Complementario Electivo (Ciclo Superior de la Orientación en Genética Molecular y de la Orientación en Bioprocesos)*¹

Profesores: *Fernando Bravo Almonacid, Martín Lema*

Correlatividades previas: *Ingeniería Genética I*

Objetivos:

El curso pretende familiarizar a las/os estudiantes, desde el punto de vista teórico y práctico, con las metodologías de trabajo e investigación en el campo de la Biología Molecular de Plantas, su aplicación en el mejoramiento vegetal, así como en el uso de plantas como sistemas de producción de proteínas de interés económico.

Se pretende que el/la estudiante adquiera un sólido conocimiento de temas concretos de la Biotecnología Vegetal y de los temas regulatorios que la/os capaciten para el desarrollo de su actividad profesional futura, ya sea en investigación en organismos públicos o privados, en industrias biotecnológicas y en la docencia.

Contenidos mínimos:

Nociones de fisiología vegetal. Biología celular vegetal. Biodiversidad. Cultivo de tejidos vegetales. Micropropagación. Plantas transgénicas. Tejidos y plantas enteras como fuente de productos recombinantes. Interacciones planta-microorganismos. Interacciones planta-patógeno. Mecanismos celulares y moleculares de resistencia a agentes químicos y microbianos. Adaptaciones a características del ambiente. Nociones de sanidad vegetal.

Carga horaria semanal: 6horas

¹ En plan vigente, Res CS N° 125/19. Para el plan Res CS N° 277/11, pertenece al Núcleo de Orientación. Para el Plan Res CS N° 181/03 pertenece al Núcleo Orientado.

Programa analítico:

Actividades teóricas

1. La “revolución verde” y la moderna agrobiotecnología: Tendencias y perspectivas en agrobiotecnología. Prospectivas socioeconómicas en los países en desarrollo.
2. Cultivo de tejidos vegetales, organogénesis y embriogénesis somática. Semillas artificiales. Micropropagación de plantas: aspectos generales y prácticos. Avances en cultivo de tejidos de plantas de importancia agronómica
3. Ingeniería genética de plantas. Nociones de clonado molecular. Enzimas de uso corriente en biología molecular. Clonado de genes vegetales. Vectores: plásmidos, fagos, fósmidos, cósmidos; YACS y BACS. Bibliotecas de cDNA y genómicas. Procedimientos de selección
4. Técnicas de transformación vegetal. *Agrobacterium tumefaciens* y *A. rhizogenes*. Biología molecular del *Agrobacterium*. Sistemas de transferencia de genes basados en *Agrobacterium*: ventajas y limitaciones. Genes reporteros y genes de selección. Sistemas de transferencia de genes basados en virus vegetales. Agroinfección.
5. Sistemas de transferencia directa de genes. Transferencia de genes a protoplastos basada en métodos químicos o en electroporación. Biobalística. Electroporación de tejidos vegetales. Edición Génica.
6. Resistencia a virus vegetales por métodos de ingeniería genética. Protección mediada por la cápside. Protección mediante transcritos antisentido. Protección mediada por otras funciones virales (replicadas, proteínas de transporte). Resistencia derivada de genes no virales. Cosupresión. Silenciamiento génico transcripcional y postranscripcional.
7. Resistencia a insectos por métodos de ingeniería genética. Entomotoxinas de *Bacillus thuringiensis*, mutagénesis dirigida e intercambio de dominios. Inhibidores de proteasas y de α -amilasas.
8. Resistencia a bacterias por métodos de ingeniería genética. Expresión de proteínas antibacterianas: lizosima, atacina y cecropina. Otras proteínas con actividad antimicrobiana

9. Mejoramiento de cosechas con resistencia a hongos por ingeniería genética. Estrategias en desarrollo: muerte celular artificial; producción de fitoalexinas; expresión de proteínas con actividad antifúngica. Utilización de interacciones sinérgicas.
10. Manipulación genética de resistencia a herbicidas. Principales estrategias. Resistencia a imidazolidonas, sulfonilureas, triazinas, glifosatos y fosfinotricinas.
11. Manipulación genética de fenotipos vegetales y de rutas metabólicas. Control de la maduración de los frutos. Durabilidad y pigmentación floral. Manipulación de los niveles de ácidos grasos y almidón. Modificación del contenido de ácidos grasos saturados e insaturados. Modificación de la síntesis de sacarosa y almidón y de la partición de carbohidratos.
12. Las plantas como biorreactores. Producción de proteínas exógenas en plantas: anticuerpos, hormonas, enzimas, etc. Utilización de raíces transformadas para la producción de compuestos de interés farmacológico. Manipulación de proteínas de reserva de las semillas.
13. Detección y caracterización de patógenos vegetales. Plantas indicadoras. Inmunoensayos: test de ELISA e *inmuno-blots* sobre membranas. Métodos de hibridación molecular. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR), ICTR-PCR. Detección de RNA viral doble cadena.
14. Pruebas de campo con plantas transgénicas. Establecimiento de riesgo en el caso de organismos genéticamente modificados. Diseño de normas de bioseguridad. Normativas de bioseguridad en Argentina.

Actividades prácticas

Los trabajos prácticos comprenden la transformación estable, obtención de plantas transgénicas de tabaco, y la caracterización de estas utilizando las técnicas de PCR y *Western-blot*. También se enseñará la técnica de agroinfiltración como un ejemplo de sistema de expresión transitoria.

TP N°1: (desarrollado en dos jornadas)

Transformación genética de plantas mediante Agrobacterium tumefaciens.

Objetivos: Profundizar el entendimiento y ganar habilidad práctica en el uso de *Agrobacterium tumefaciens* como sistema para obtener plantas transgénicas. Asimismo, se refuerzan nociones de trabajo en condiciones de esterilidad y cultivo de tejidos.

Actividades: cocultivo de explantos de tabaco con *Agrobacterium* que porta diferentes plásmidos binarios con T-DNAs con distintos genes marcadores, o de aplicación agropecuaria o para molecular *pharming*.

TP N°2: (desarrollado en dos jornadas)

Análisis de plantas transgénicas mediante la técnica de PCR

Objetivos: Profundizar el entendimiento y ganar habilidad práctica en técnicas de extracción de ADN vegetal y el uso de PCR para confirmar el éxito de un procedimiento de transformación vegetal.

Actividades: Extracción de ADN en pequeña escala (minipreparación) a partir de tejidos vegetales y verificación del producto de la extracción utilizando geles de agarosa. Con este DNA se realiza un ensayo de PCR evento específica de controles positivas y negativos (*wild type*) e incógnita, y verificación por electroforesis en gel de agarosa.

TP N°3: (desarrollado en dos jornadas)

Detección de proteínas recombinantes utilizando la técnica de western-blot

Objetivos: Profundizar el entendimiento y ganar habilidad práctica en técnicas de aislamiento de proteínas a partir de tejidos vegetales, y el uso de *western blot* para revelar y estimar el nivel de expresión de proteínas recombinantes.

Actividades: Aislamiento de proteínas totales a partir de extractos vegetales, separación de estas por medio de geles de poliacrilamida-SDS, tinción reversible para verificar eficiencia de extracción, seguido de transferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa y revelado con anticuerpos específicos. Comparación con controles (proteína purificada y *ladder* de peso molecular preteñido)

TP N°4: (desarrollado en dos jornadas)

*Agroinfiltración con *Agrobacterium tumefaciens* y expresión transiente de inhibidores de silenciamiento*

Objetivos: Profundizar el entendimiento y ganar habilidad práctica en técnicas de agroinfiltración para la producción de proteínas recombinantes en modalidad *molecular pharming* o para el chequeo preliminar de construcciones destinadas a la transformación de plantas. Asimismo, se refuerzan nociones sobre interferencia de ARN y el uso de supresores de silenciamiento para mejorar los niveles en los ensayos de expresión transitoria.

Actividades: Agroinfiltración en forma conjunta o combinada de construcciones conteniendo un gen marcador (GFP) y/o un gen inhibidor de silenciamiento. Ello, sobre plantas *wild type* o transgénicas para el gen GFP. Análisis de resultados utilizando luz UV.

Bibliografía (obligatoria y de consulta):

La materia se dicta utilizando como bibliografía Trabajos publicados en revistas de investigación con referato y revisiones de revistas especializadas, provistas por los docentes.

Como literatura de consulta se utiliza el libro:

Biochemistry & Molecular Biology of Plants, Edited by Buchanan, Grissem and Jones. American Society of Plant Physiologists, Rockville, Maryland 2000

La bibliografía que no se encuentra en la Biblioteca de la UNQ es suministrada por los docentes, ya sea porque se dispone de las versiones electrónicas y/o se dispone del ejemplar en el grupo de investigación asociado.

Organización de las clases:

La modalidad es teórica-práctica. Además, la/os estudiantes deberán exponer trabajos de investigación, publicados en revistas internacionales, que versan sobre los temas desarrollados en las clases teóricas. Los artículos son seleccionados por los docentes. La exposición es individual.

Modalidad de evaluación:

La evaluación se realiza sobre la base de dos exámenes parciales con sus correspondientes exámenes recuperatorios y un examen integrador. Además, la/os estudiantes deben entregar informes de laboratorio y exponer artículos científicos.

Aprobación de la asignatura según Régimen de Estudios vigente de la Universidad Nacional de Quilmes:

La aprobación de la materia bajo el régimen de regularidad requerirá: Una asistencia no inferior al 75 % en las clases presenciales previstas, y cumplir con al menos una de las siguientes posibilidades:

- (a) la obtención de un promedio mínimo de 7 puntos en las instancias parciales de evaluación y de un mínimo de 6 puntos en cada una de ellas.

(b) la obtención de un mínimo de 4 puntos en cada instancia parcial de evaluación y en el examen integrador, el que será obligatorio en estos casos. Este examen se tomará dentro de los plazos del curso.

Los/as alumnos/as que obtuvieron un mínimo de 4 puntos en cada una de las instancias parciales de evaluación y no hubieran aprobado el examen integrador mencionado en el Inc. b), deberán rendir un examen integrador, o en su reemplazo la estrategia de evaluación integradora final que el programa del curso establezca, que el cuerpo docente administrará en los lapsos estipulados por la UNQ.

Modalidad de evaluación exámenes libres:

En la modalidad de libre, se evaluarán los contenidos de la asignatura con un examen escrito, un examen oral e instancias de evaluación similares a las realizadas en la modalidad presencial. Los contenidos a evaluar serán los especificados anteriormente incluyendo demostraciones teóricas, laboratorios y problemas de aplicación.

Anexo II

CRONOGRAMA TENTATIVO

Semana	Tema/unidad	Actividad*				Evaluación
		Teórico	Práctico			
			Res Prob.	Lab.	Otros Especificar Seminarios	
1	Introducción a la Biotecnología Vegetal	X				
2	Cultivo de tejidos y Transformación por <i>Agrobacterium</i>	X				
2	Práctico de aislamiento de ADN vegetal			X		
3	Transformación por métodos directos - Transformación de cloroplastos	X				
3	Práctico de verificación de transgénesis por PCR			X		
3	Seminarios: Transformación nuclear				X	
4	Vectores virales	X				
4	Seminarios: Transformación de Cloroplastos				X	
5	Silenciamiento y cosupresión	X				
5	Seminarios: Transformación de Cloroplastos				X	
6	Resistencia a virus	X				
6	Práctico de Transformación de Tabaco por <i>Agrobacterium</i>			X		
7	Clase de repaso	X	X			
7	Seminarios: Vectores virales y Silenciamiento				X	
8	PRIMER PARCIAL					X
9	Resistencia a insectos y nematodos	X				
9	Práctico de aislamiento de proteínas vegetales y visualización por SDS-PAGE		X			
10	Plantas como biorreactores	X				

10	Seminarios: Resistencia a virus y a insectos				X	
11	Resistencia a herbicidas	X				
11	Práctico de detección de proteínas por Western-blot		X			
11	Seminarios: Plantas como biorreactores				X	
12	Resistencia a hongos y bacterias	X				
12	Práctico de Agroinfiltración		X			
13	Bioseguridad y percepción pública	X				
13	Continuación práctica de Agroinfiltración		X			
13	Seminarios: Resistencia a Herbicidas				X	
14	Consultas y repaso	X	X			
14	Seminarios: Resistencia Hongos y bacterias				X	
15	SEGUNDO PARCIAL					X
16	Entrega resultados 2do Parcial - clase de repaso y discusión	X				
17	Recuperatorios					X
18	Integrador					X

*INDIQUE CON UNA CRUZ LA MODALIDAD