



KATHOLIEKE  
UNIVERSITEIT  
LEUVEN

# **Bioluminiscencia en Biotecnología de Plantas: Las Bananas resplandecen de luz!**

E. Santos, S. Remy, E. Thiry, S. Windelinckx,  
R. Swennen and L. Sági

ACORBAT 2008, 10-14 noviembre  
Guayaquil-Ecuador

# Contenido

- I. Bananos genéticamente modificados
- II. Expresión de los genes
- III. Genes reporteros
- IV. El gen reportero de la luciferasa en biotecnología aplicada al banano
- V. Caracterización y aislamiento de promotores y genes de banano
- VI. Conclusiones y perspectivas

# Plantas modificadas genéticamente

- **Mejoramiento convencional** es un proceso largo y tedioso especialmente en banano y plátanos. Consiste en la polinización cruzada de una planta con una especie relacionada. Por tanto, el “pool” de genes está limitado a especies compatibles para cruzamiento.
- Bananos del subgrupo **Cavendish** no se pueden mejorar convencionalmente debido a esterilidad.
- **Transformación genética** de plantas permite la integración de genes útiles de diferentes organismos a las plantas.

# Plantas modificadas genéticamente

- **Transformación genética** en plantas puede ser definido como la inserción estable de genes en el genoma y su expresión en la planta transgénica (o cisgénica).
- **Plantas cisgénicas.** La introducción de genes en una planta, con sus promotores originales, de una planta compatible de cruzamiento o de la misma planta (Schouten and Jacobsen, 2006) .

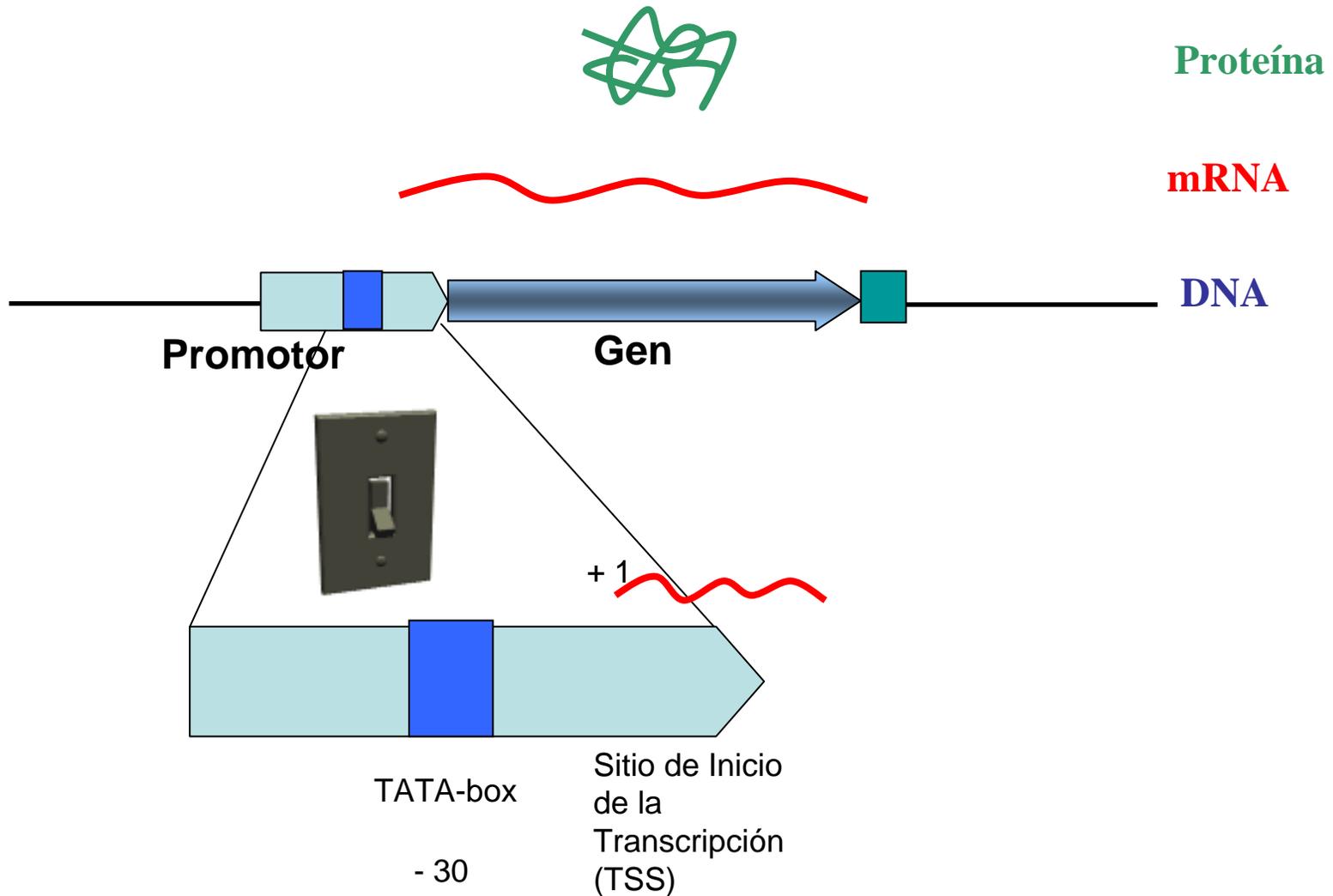
# Genómica en Banano

**Genoma:** 500-600 Mbp; 11 chromosomes; ploidia: 2x, 3x, 4x; grupos genómicos (AAA, AAB, ABB ...)

**Herramientas moleculares:** Sistemas de transformación genética, Secuencia de datos ‘limitada’ (EST, BAC, SAGE libraries), análisis proteómico, marcadores moleculares, ...

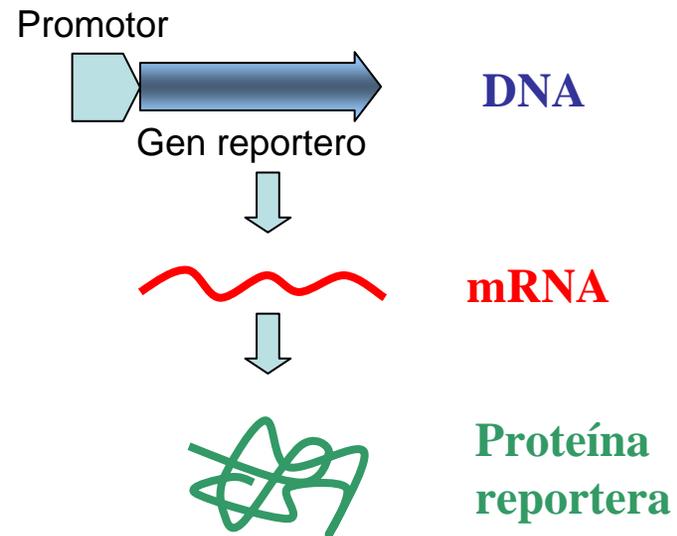
**“Revolución verde” a la “revolución de los genes”**  
(transformación genética)

# Expresión de genes



# Genes reporteros

- Mediciones de la expresión de genes se realizan generalmente a través de ensayos específicos del mRNA, sin embargo requiere esfuerzo substancial.
- Genes reporteros proveen información análoga más eficientemente.
- Puede ser detectado mediante un ensayo visual y simple.
- Es usado para confirmar transformación genética temporal o estable.



# Genes reporteros

- Importantes para la prueba de la actividad de promotores.
- Genes reporteros más usados en biotecnología de plantas:
  - $\beta$ -glucuronidase (GUS)
  - Proteína Fluorescente Verde (GFP)
  - **Luciferasa (LUC)**

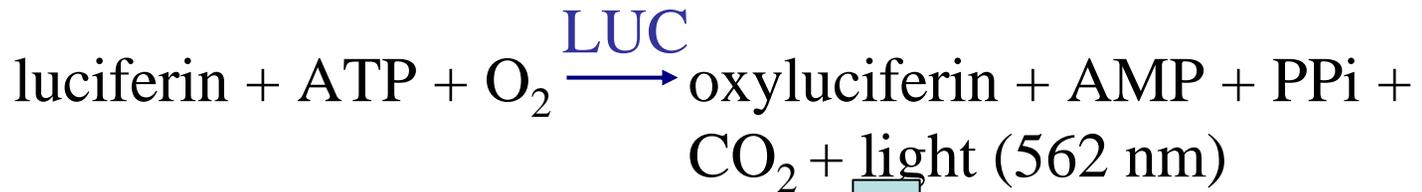
# Sistema del gen reportero Luciferasa



*luc*

- Tiempo real
- Sensibilidad ↑

*luc*<sup>+</sup>

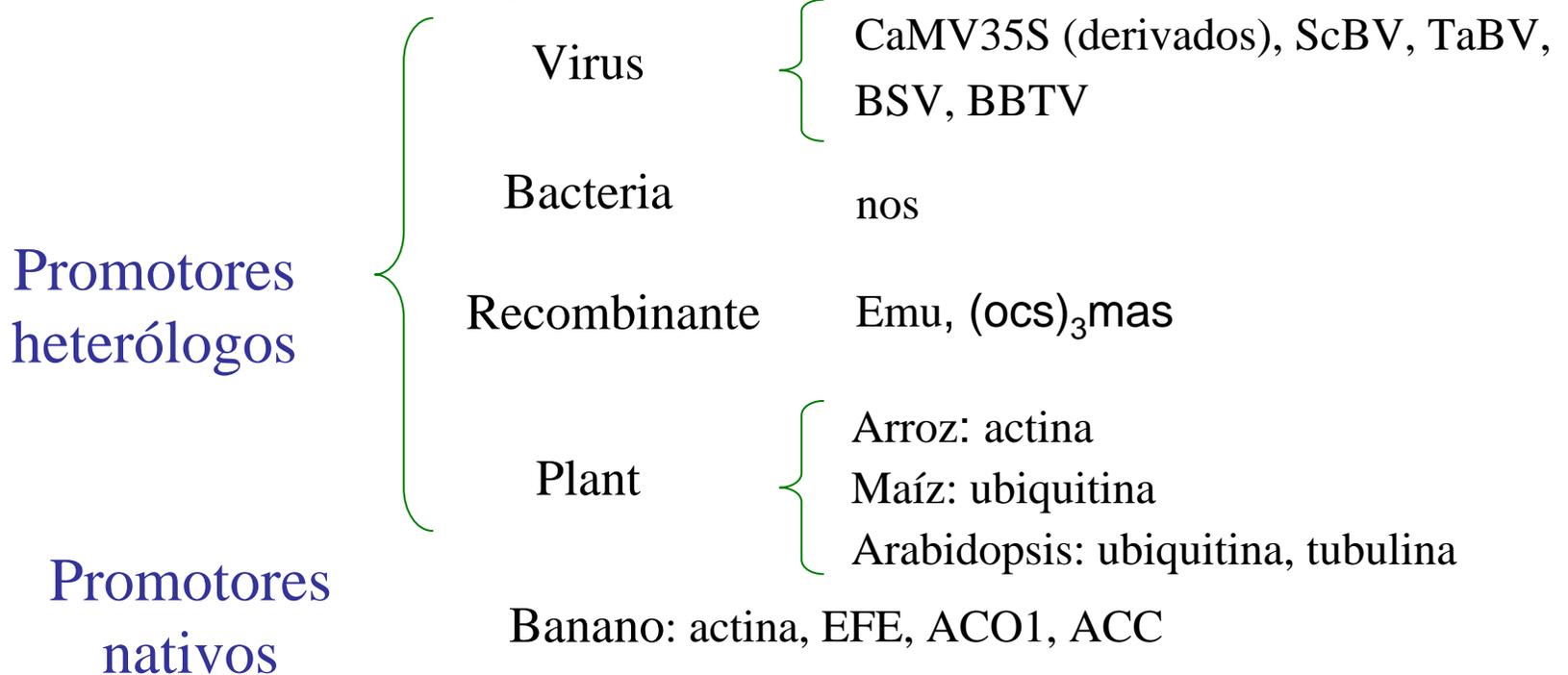


Sistema de cámara CCD digital ultrasensible



# Uso de promotores en bananos modificados

## genéticamente



Funcionabilidad/estabilidad, mayor aceptación por el público

Clases de promotores: Constitutivos, regulados de acuerdo al desarrollo de la planta, tejido específico, inducibles (estrés biótico/abiotico)

# Aislamiento de promotores

## **Basados en técnicas de mRNA**

- Cantidad de tejido/RNA
- Alto nivel de expresión de genes

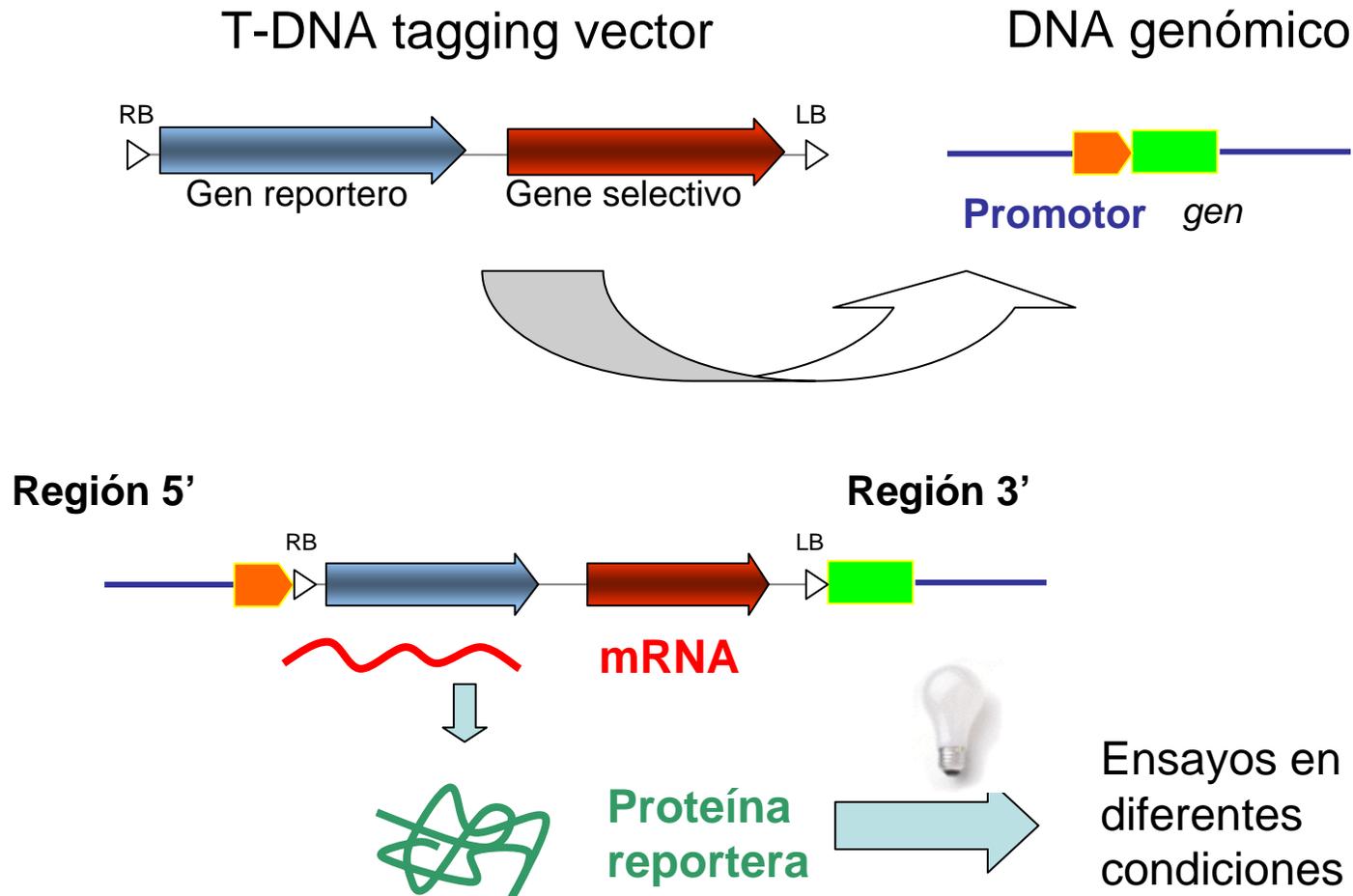
## **Trampeo de promotores “Promoter tagging”**

- Eficiencia en transformación genética

# Aislamiento de promotores en banano

- **Objetivo.** Identificar y caracterizar promotores de banano para su uso en el desarrollo de bananos genéticamente modificados.

# Trampeo de promotores a través de transformación con *Agrobacterium*



# Trampeo de promotores en banano

Meses después de  
infección con  
*Agrobacterium*

1 2 3 4 5 6 7 8 ...



Fase

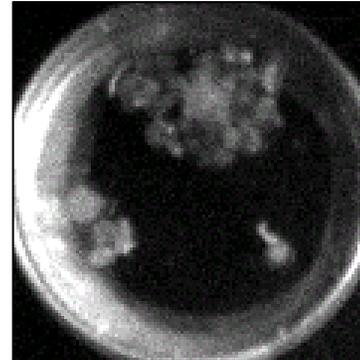
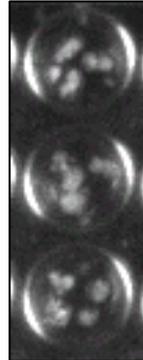
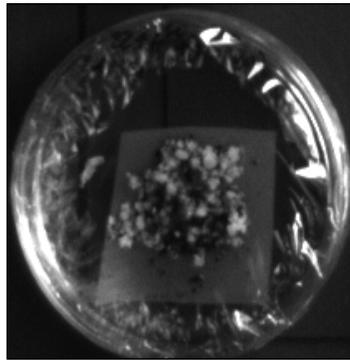
Colonias  
celulares

Inducción de  
embrión

Inducción para  
regeneración

Vitroplantas

Cultivo



400-600/Petri Dish  
5,600-8,400/image

Análisis

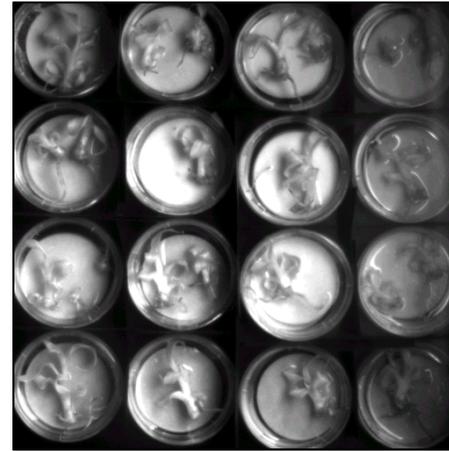
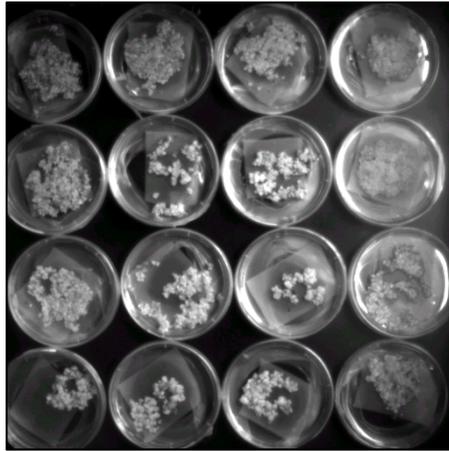


# Detección de luciferasa en banano

Colonias celulares

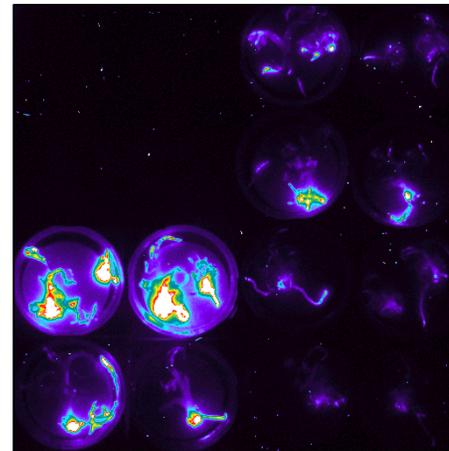
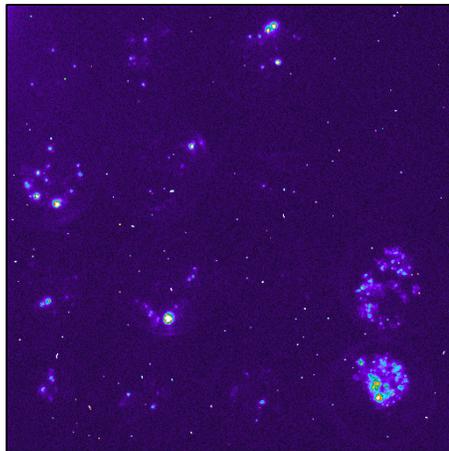
Vitroplantas

Live



~42,000

LUC



346

## Detección de luciferasa en banano

Number and frequency of cell colonies showing luciferase activity (LA)

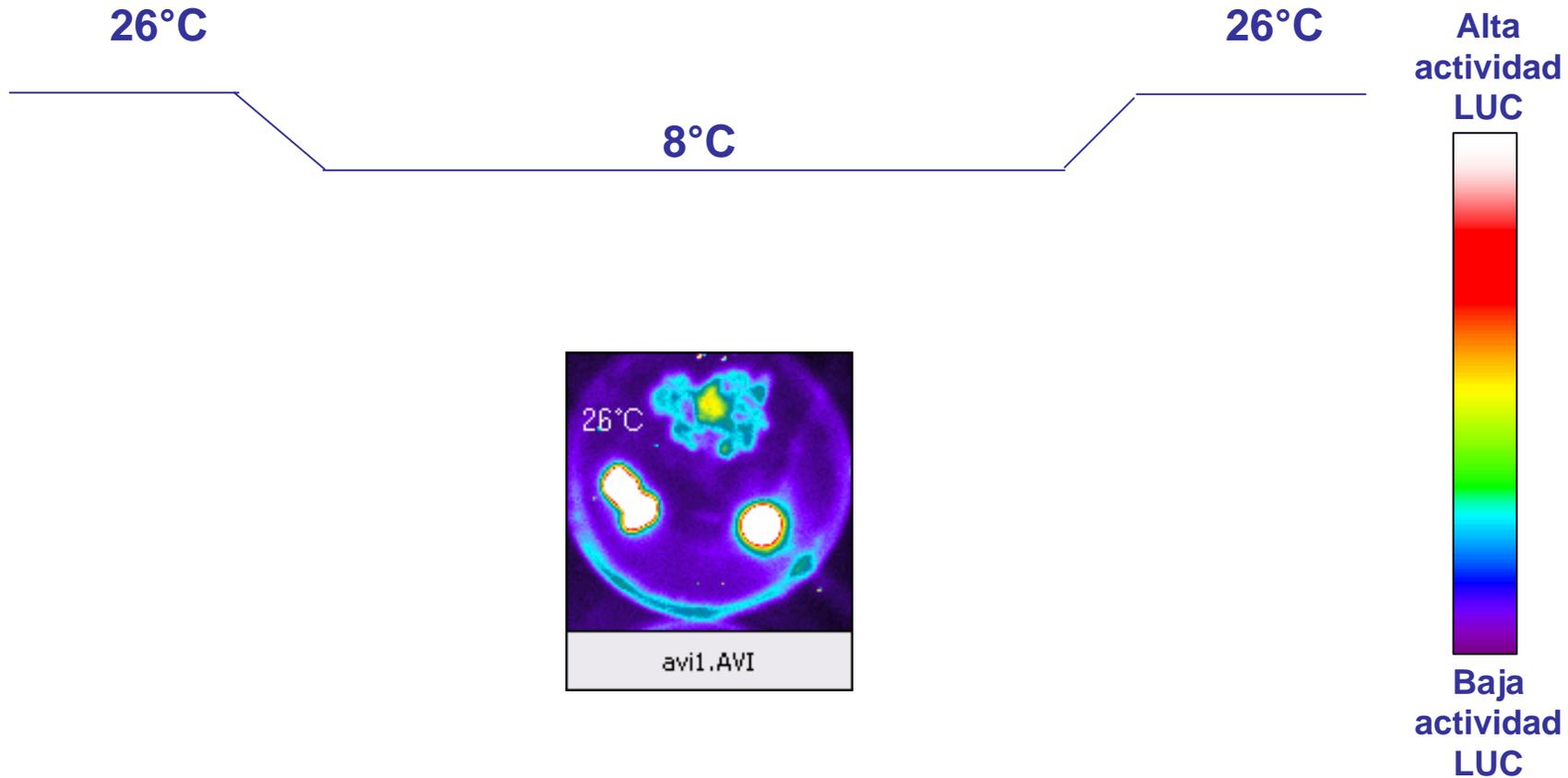
<b>Experiment</b>	<b>Cultivar</b>	<b>Total No. of cell colonies screened<sup>a</sup></b>	<b>Number and frequency (%)<sup>b</sup> of cell colonies showing LA</b>
A	THP <sup>c</sup>	15,887	155 (0.98)
B	THP	11,973	84 (0.70)
C	THP	11,375	101 (0.89)
D	THP	3570	6 (0.17)
	TOTAL	42,805	346 (0.80)

<sup>a</sup>Based on the average number of independent cell colonies calculated from at least three samples per construct and per cultivar.

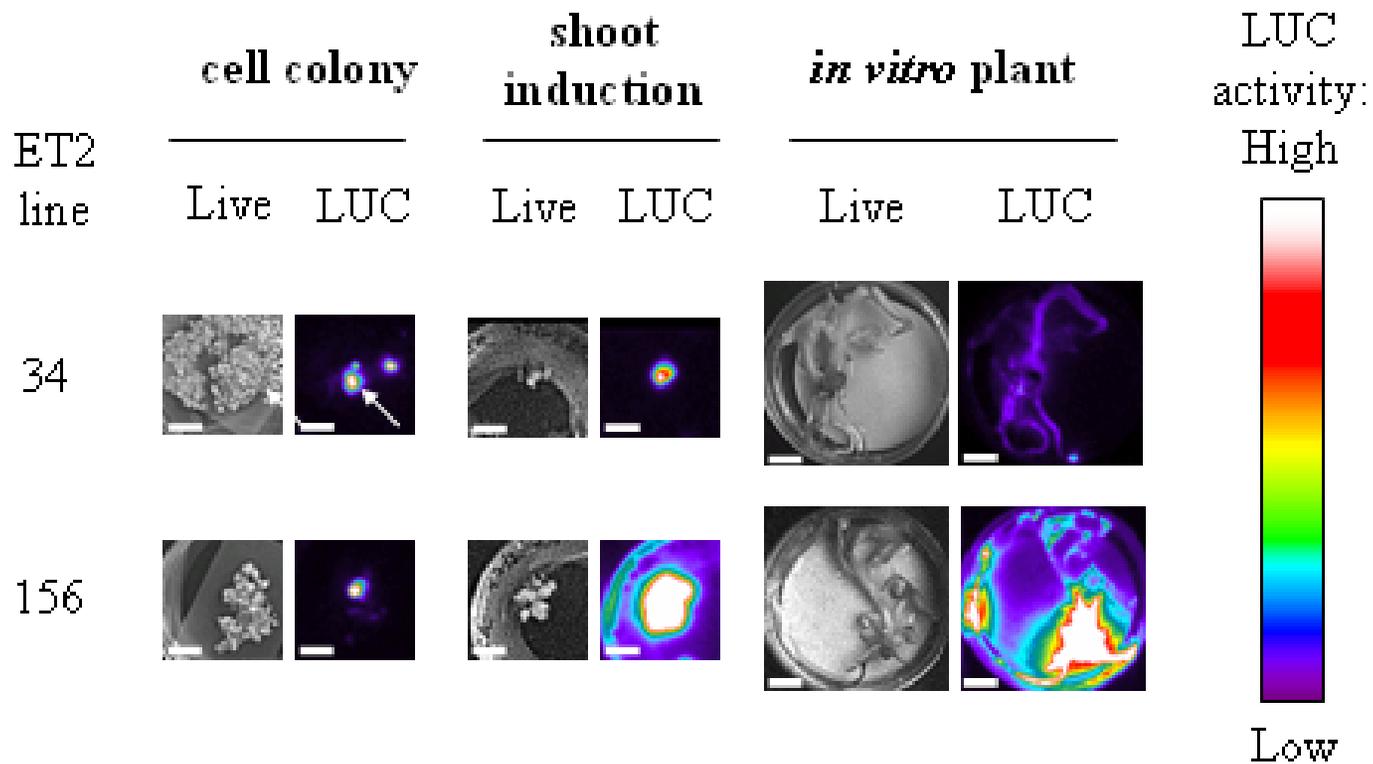
<sup>b</sup>The number of independent candidate promoter-tagged cell colonies showing LA expressed in percentage of the total number of independent transgenic cell colonies screened.

<sup>c</sup>Plantain cultivar 'Three Hand Planty' (genotype AAB).

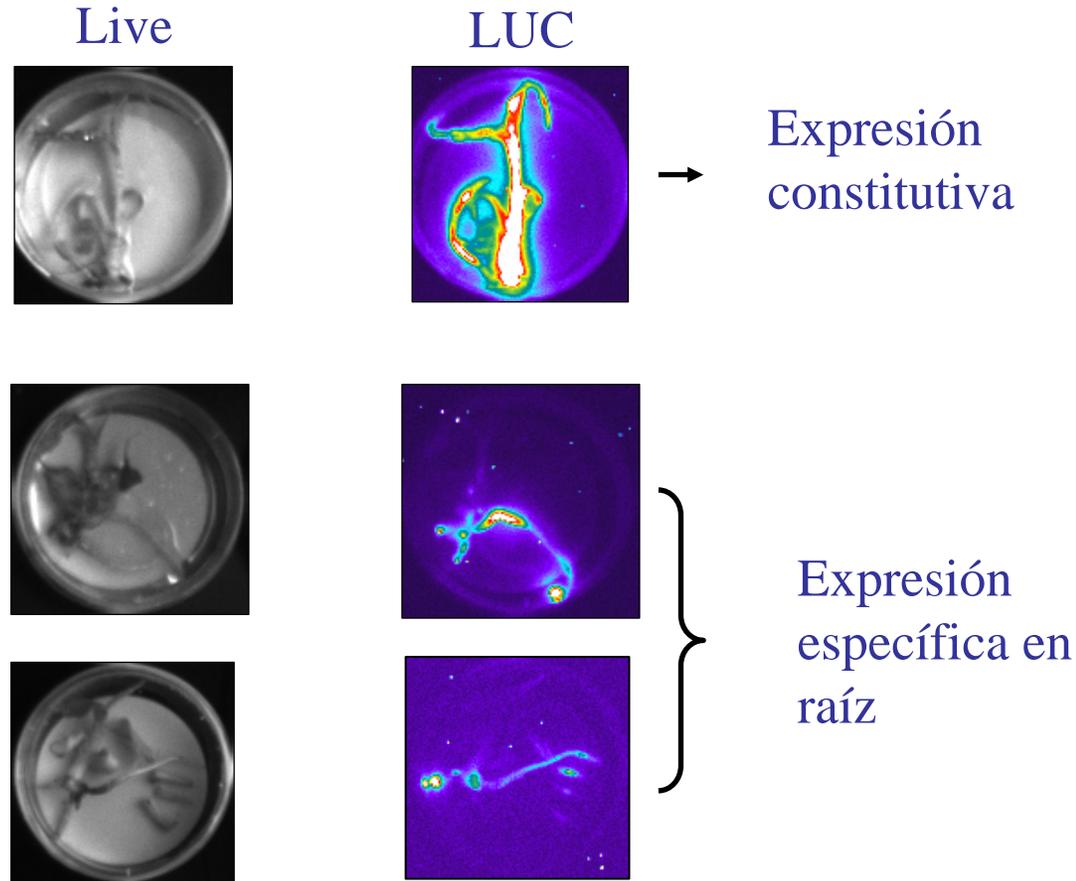
# Detección de luciferasa en condiciones de baja temperatura en tiempo real



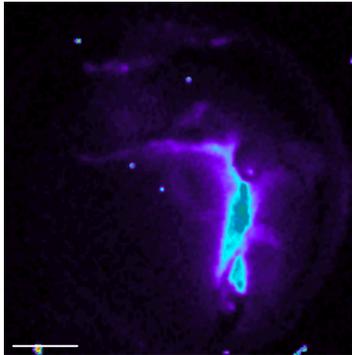
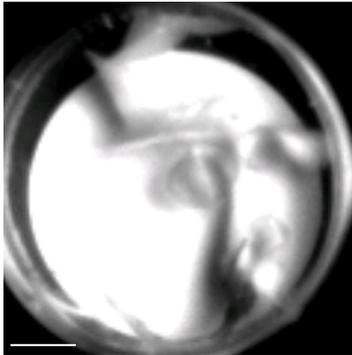
# Análisis de la actividad de LUC durante regeneración



# Actividad de promotores

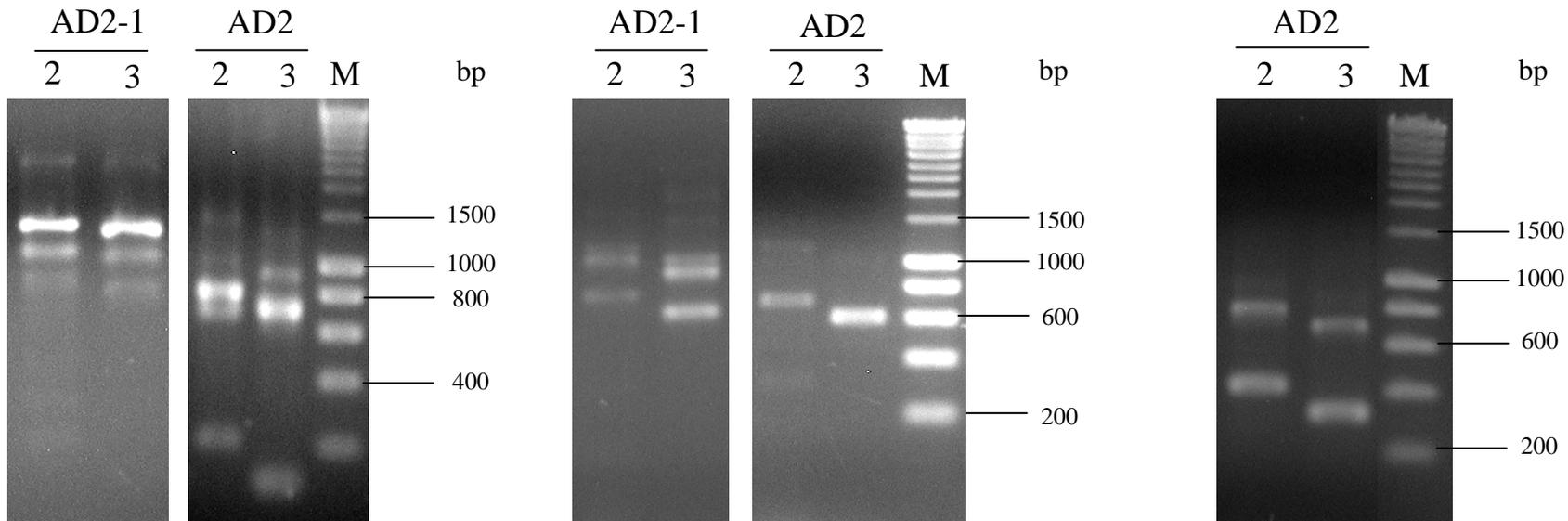
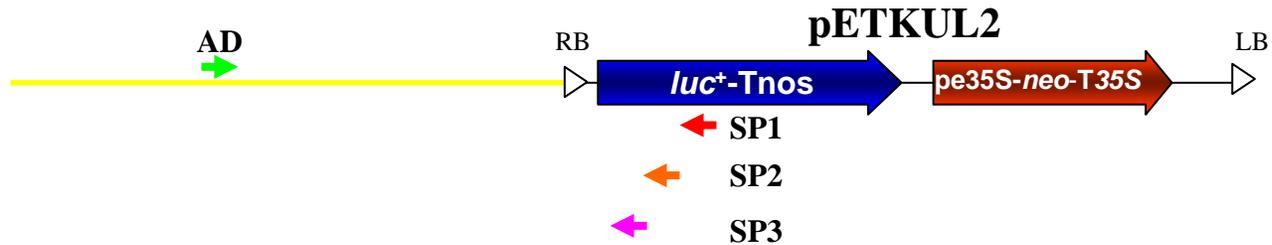


# Actividad de promotores

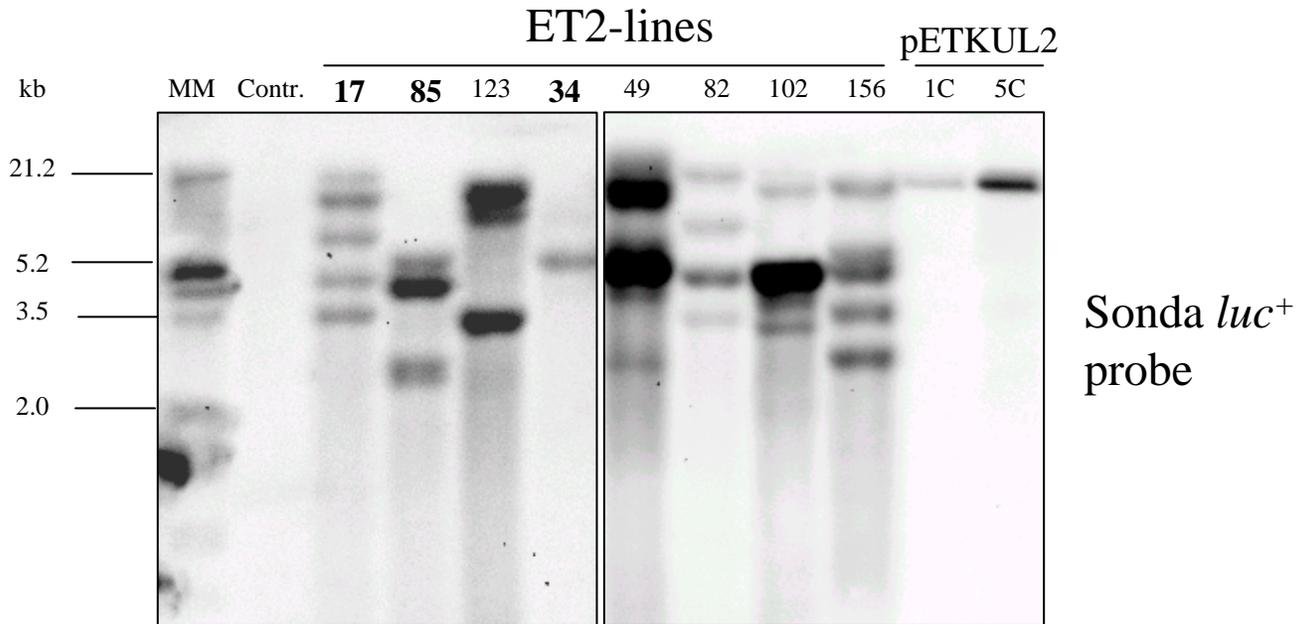
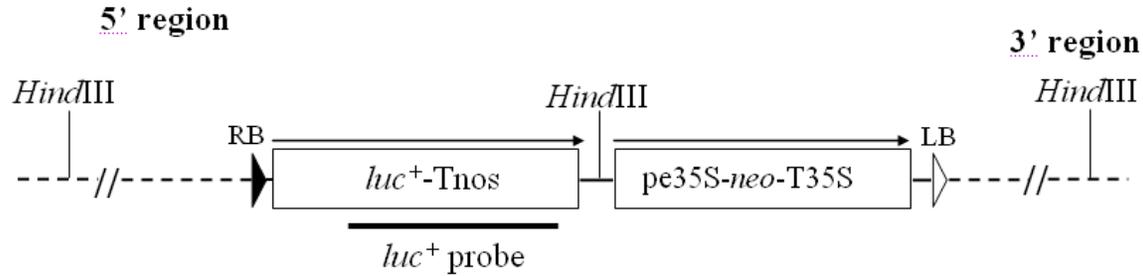


Expresión  
específica en el  
pseudotallo

# TAIL-PCR para el aislamiento de secuencias en la región 5'



# Southern blot

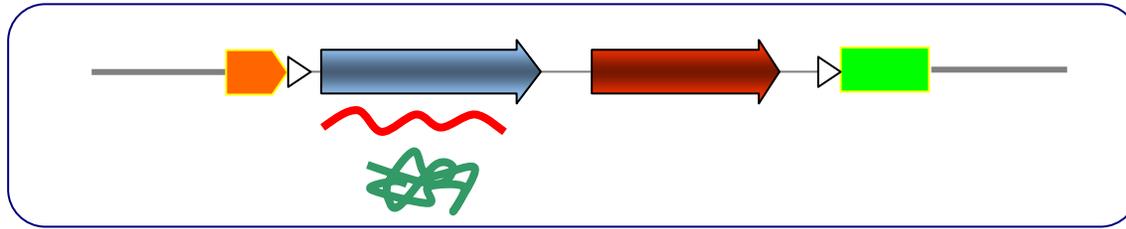


Min.# copias T-DNA: 5 3 3 1 4 4 4 5

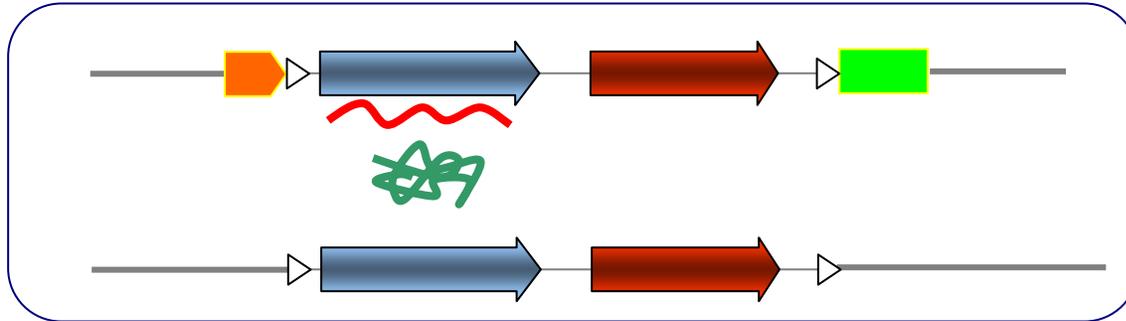
Promedio: **3.6**

# V. Caracterización y aislamiento de promotores y genes de banano

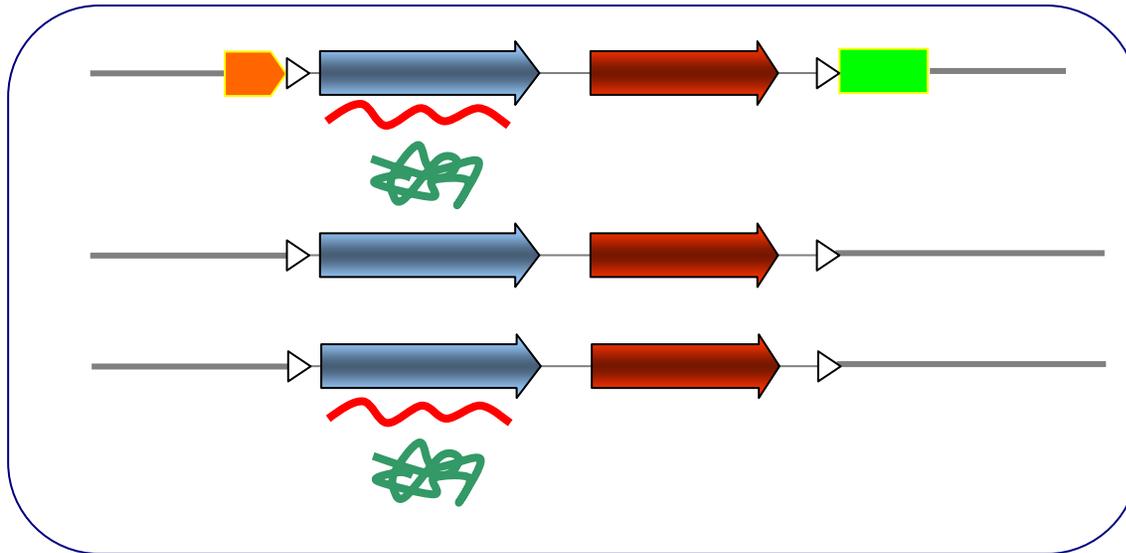
1 T-DNA



2 T-DNAs



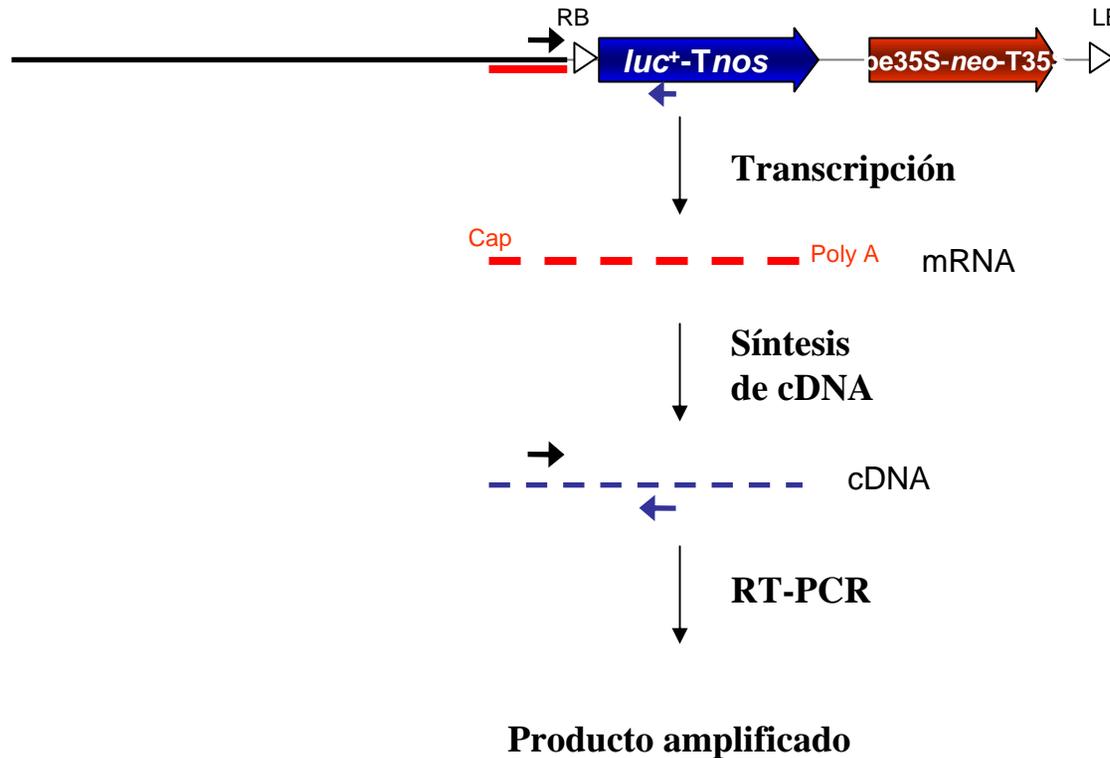
3 T-DNAs



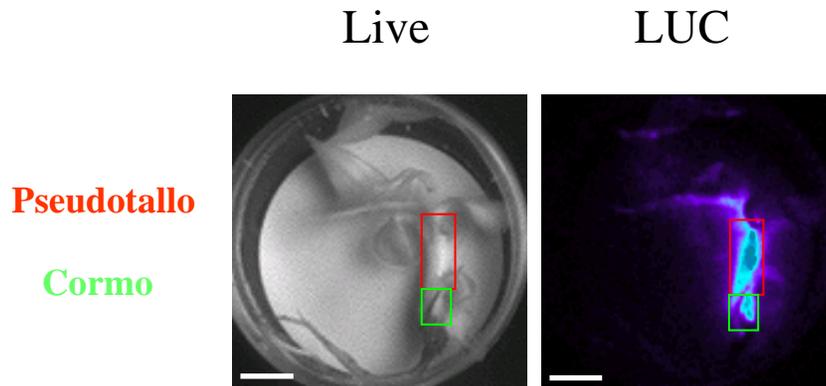
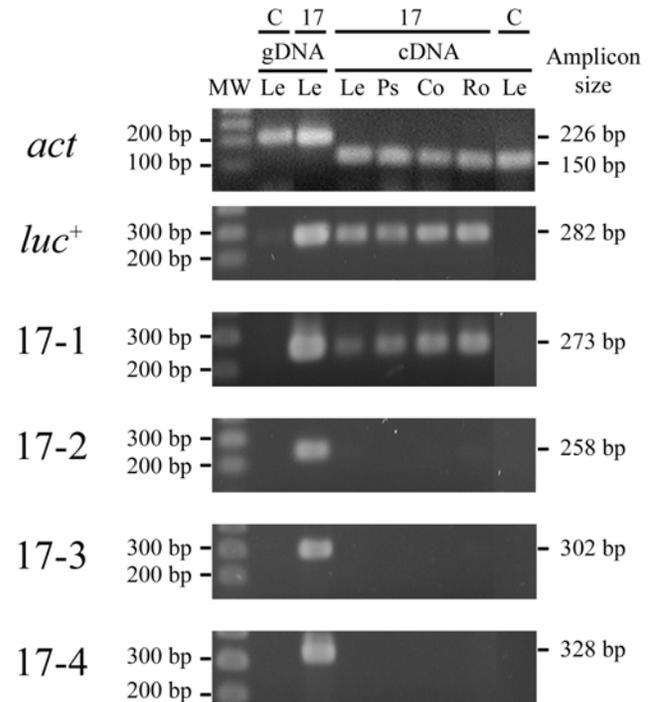
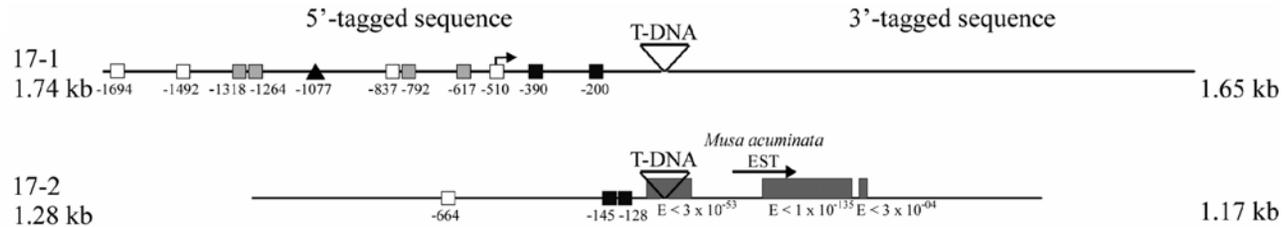
Críptico

# Cuál es la secuencia con actividad promotora?

RT-PCR



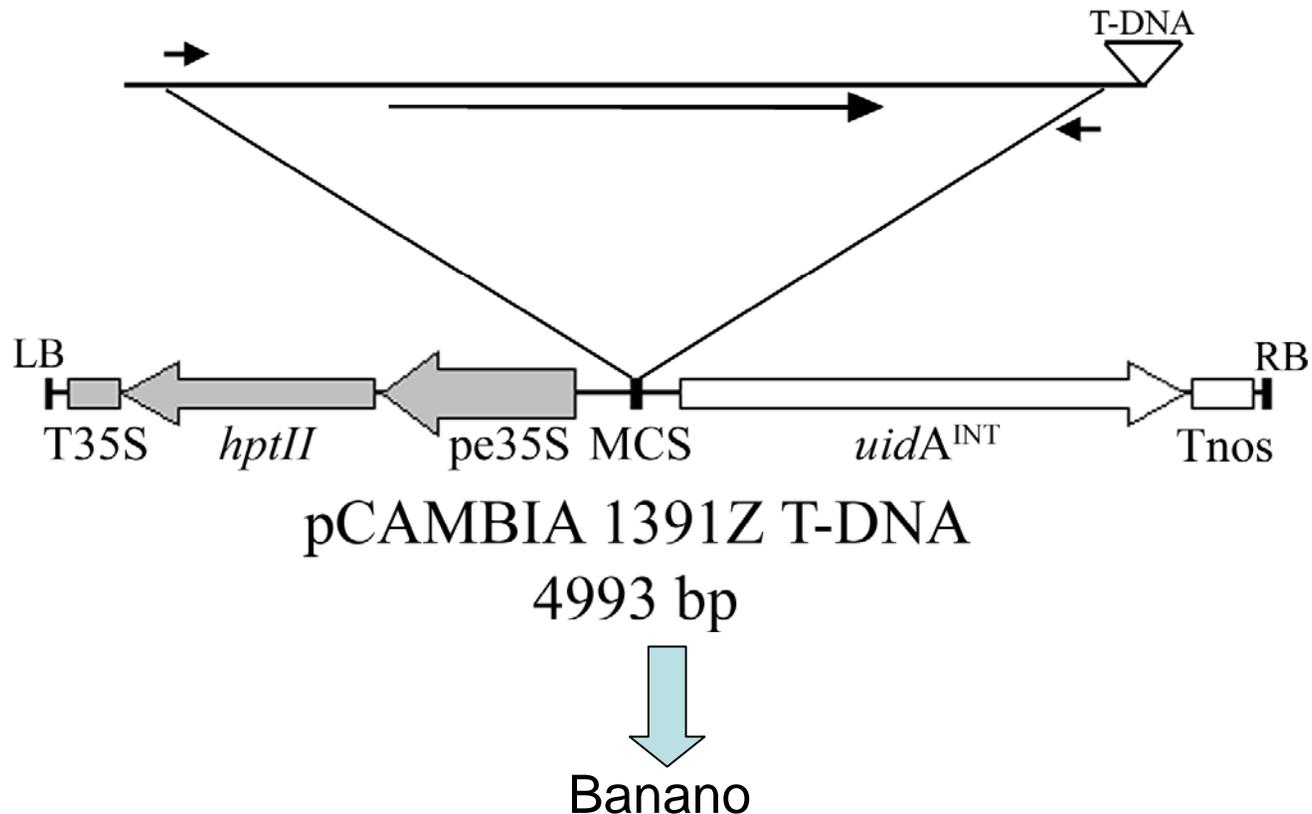
# Análisis de la fusión transcripcional, RT-PCR



## Son los promotores identificados activos?

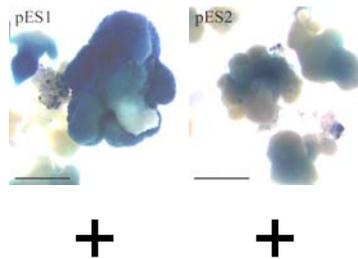
Clonación de promotores en el vector pCAMBIA 1391Z

5'-tagged sequence

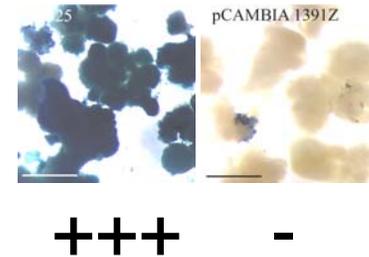


# Validación de promotores identificados

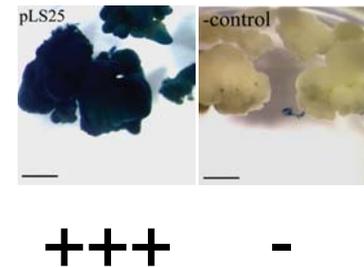
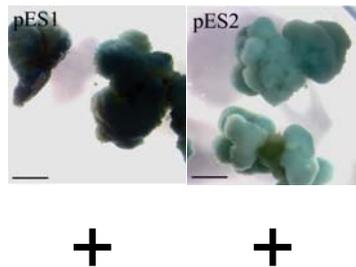
Colonia celular



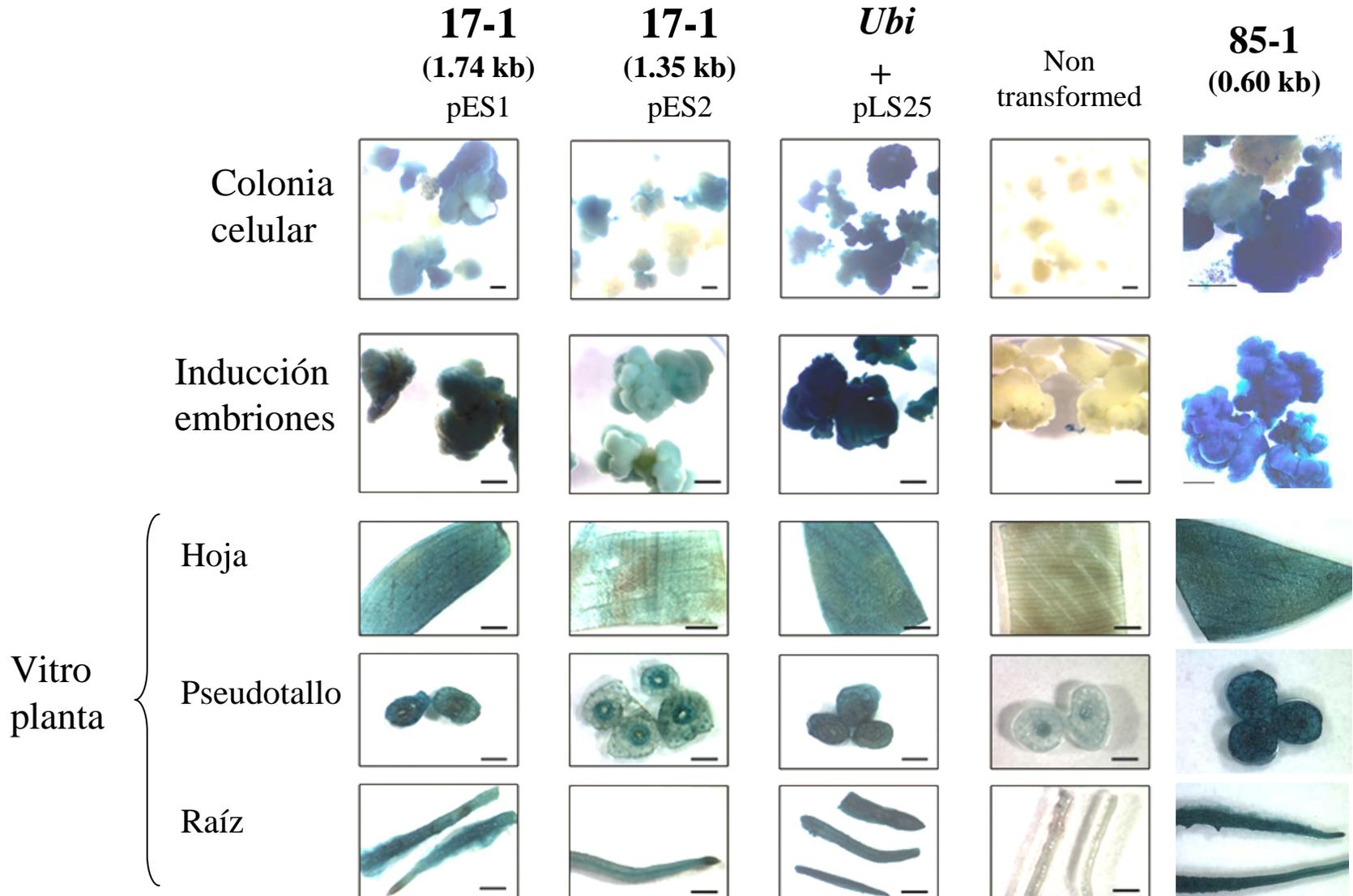
*Ubi*  
+  
pLS25      -



Inducción de embriones

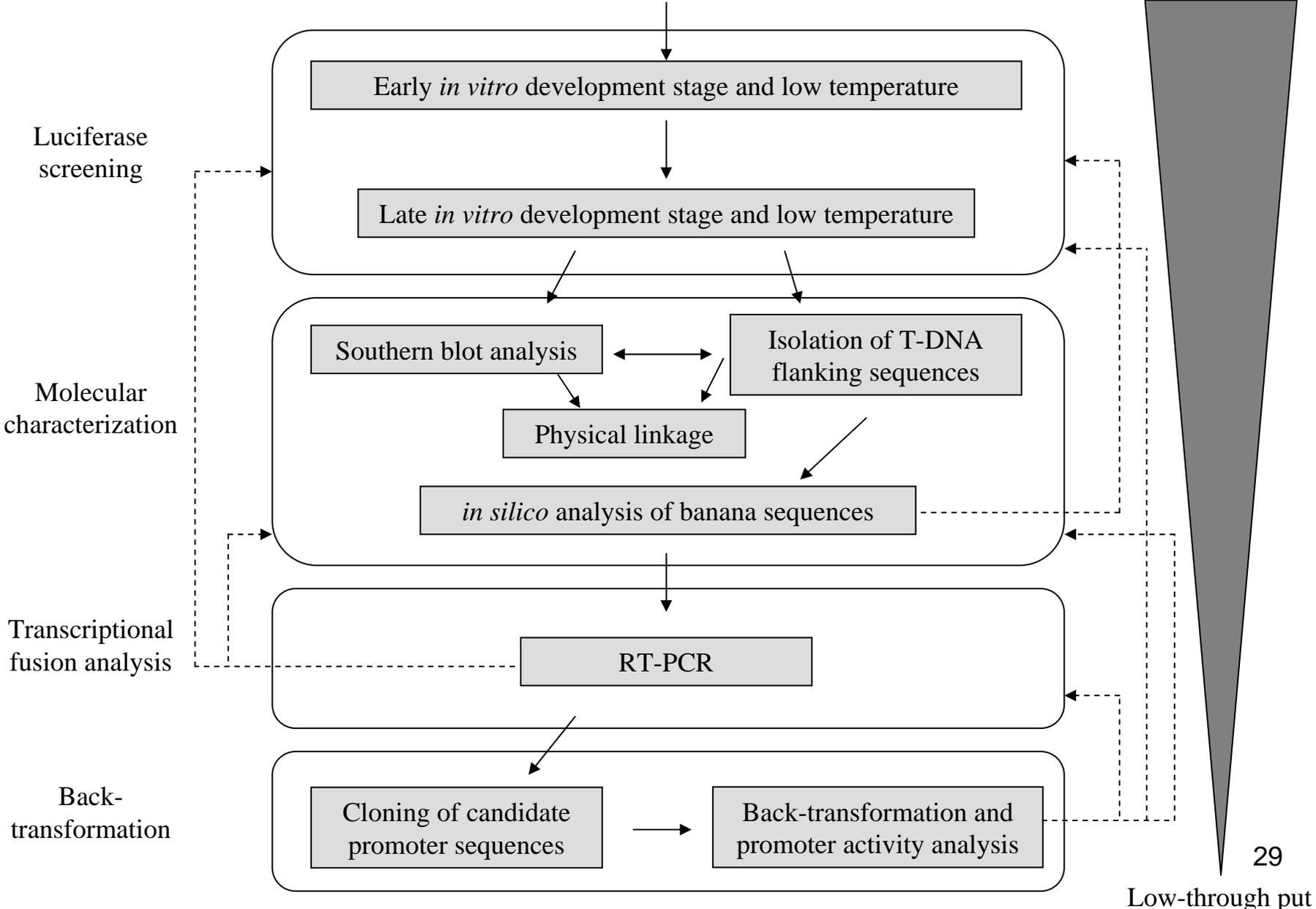


# Actividad de promotores



*Agrobacterium*-mediated transformation of banana ECS

High-through put



# Conclusiones

- Un sistema para la identificación de promotores en banano ha sido desarrollado.
- El trampeo de promotores a través del T-DNA es confiable y reproducible en la caracterización y aislamiento de nuevos promotores en banano.

# Perspectivas

- Confirmación de expresión en diferentes estadios de desarrollo de la planta y cultivares de banano (y plátano).
- Utilización en generación de plantas de banano genéticamente modificados (bananos cisgénicos).

# Agradecimientos

- VLIR-ESPOL
- Centro de Investigaciones Biotecnológicas del Ecuador (CIBE) -ESPOL

# Laboratory of Tropical Crop Improvement KU Leuven

