

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) .

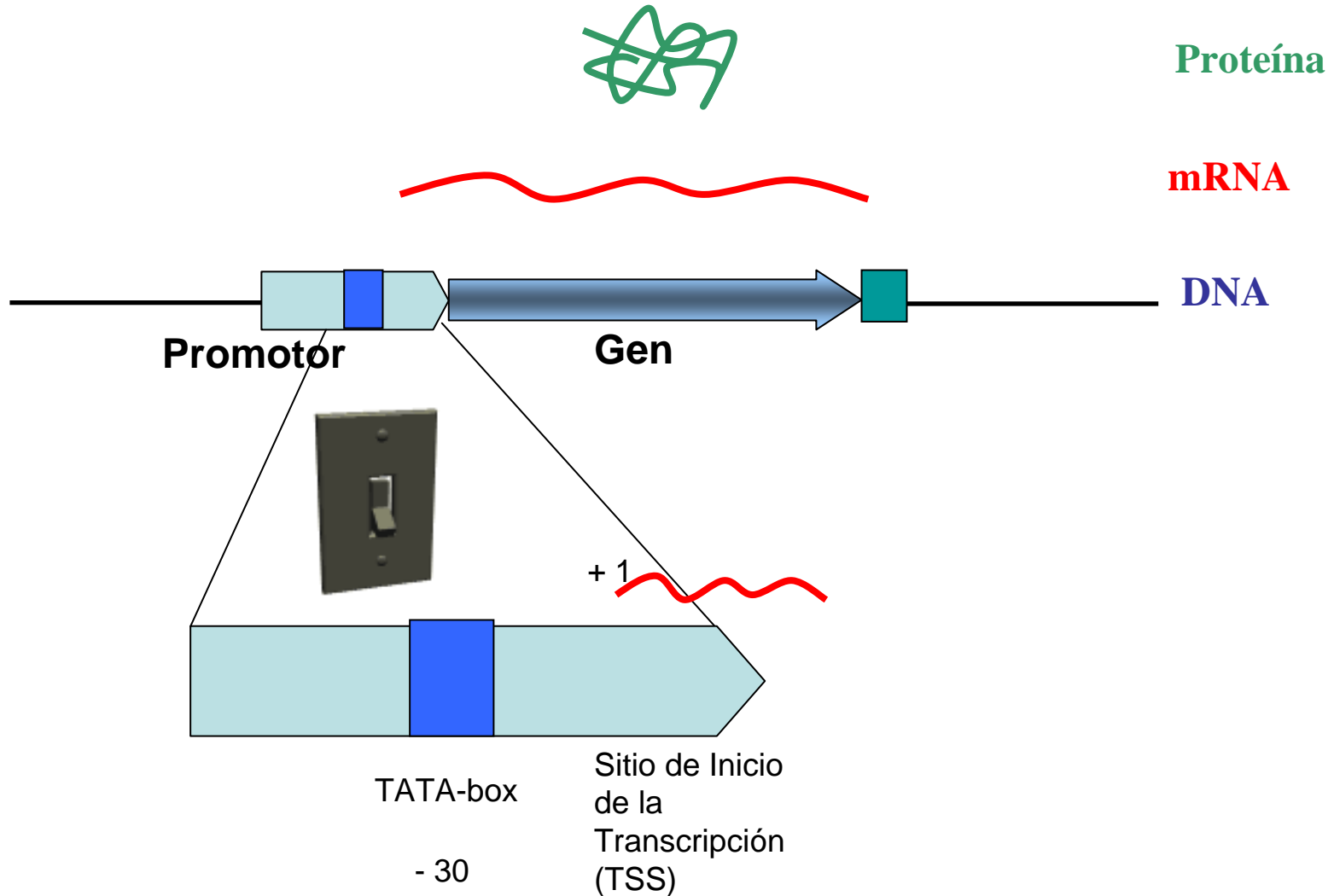
Genómica en Banano

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, ...

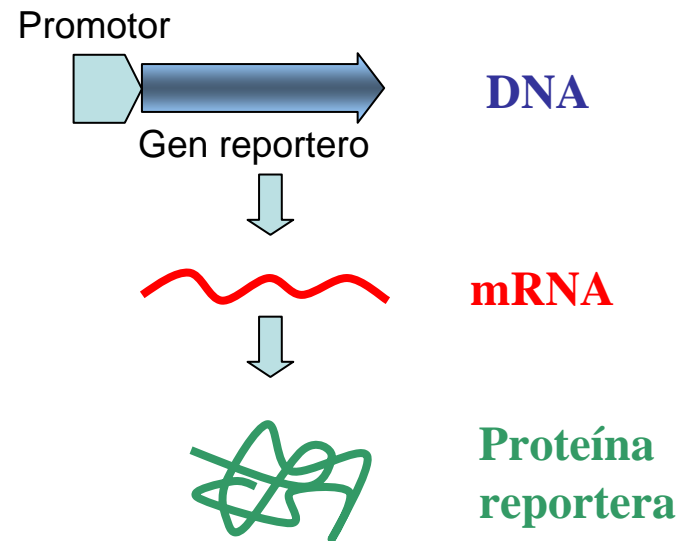
“Revolución verde” a la **“revolución de los genes”**
(transformación genética)

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:
 - β -glucuronidase (GUS)
 - Proteína Fluorescente Verde (GFP)
 - **Luciferasa (LUC)**

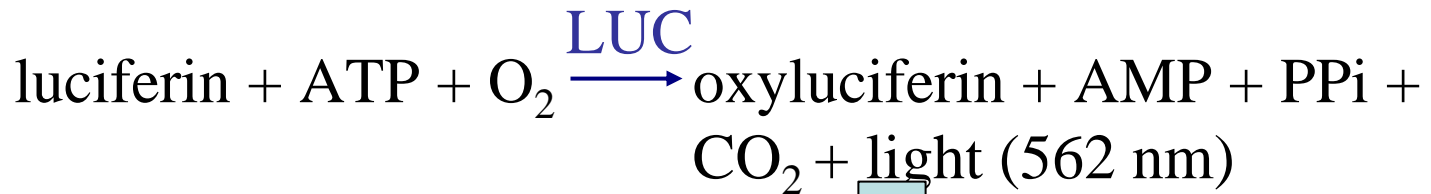
Sistema del gen reportero Luciferasa



luc

- Tiempo real
- Sensibilidad ↑

luc⁺

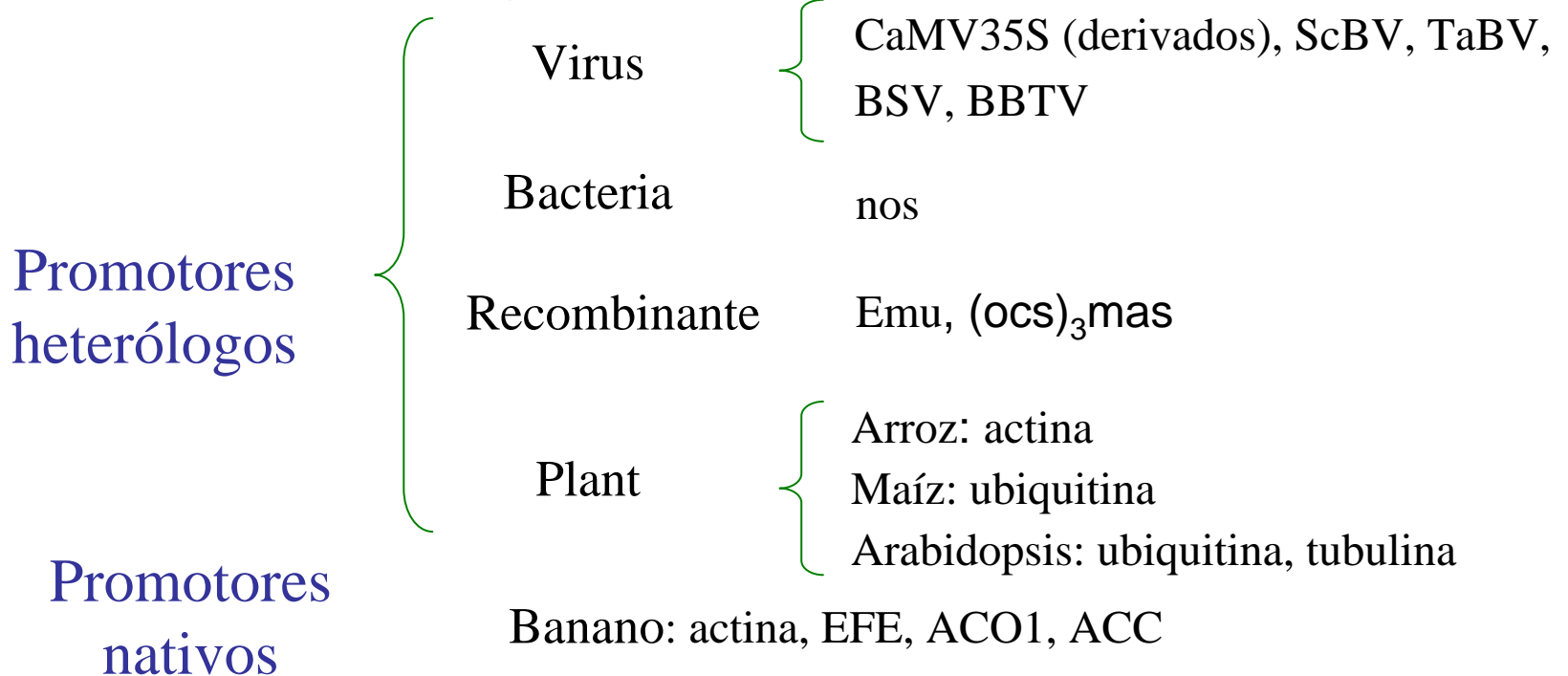


Sistema de cámara CCD digital ultrasensible



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

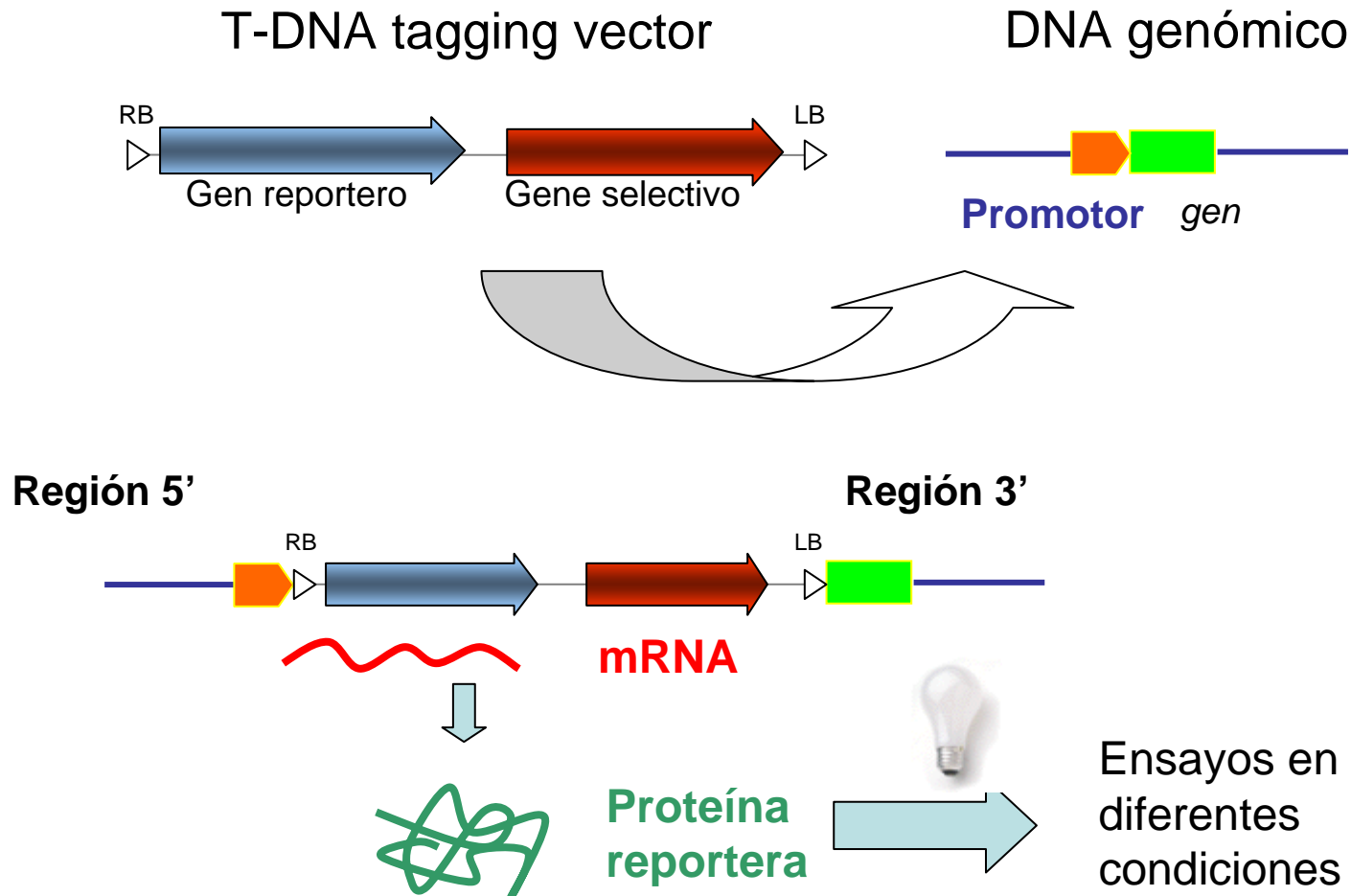
Trampeo de promotores “Promoter tagging”

- 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

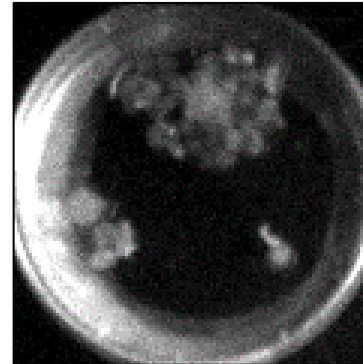
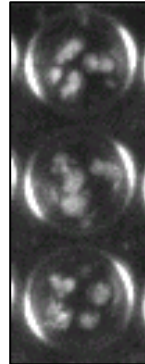
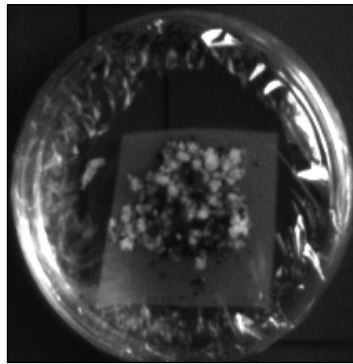
Colonias
celulares

Inducción de
embrión

Inducción para
regeneración

Vitroplantas

Cultivo



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

Análisis

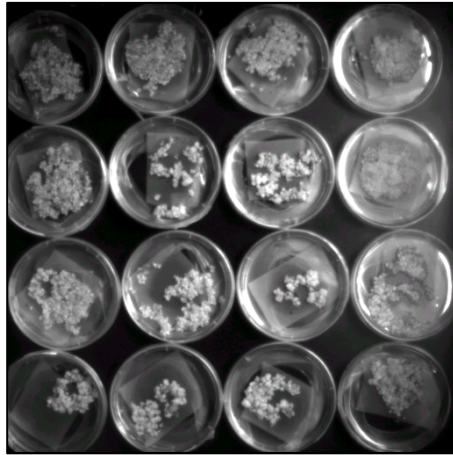


Detección de luciferasa en banano

Colonias celulares

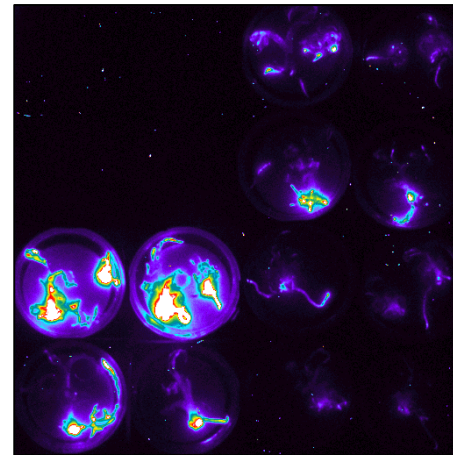
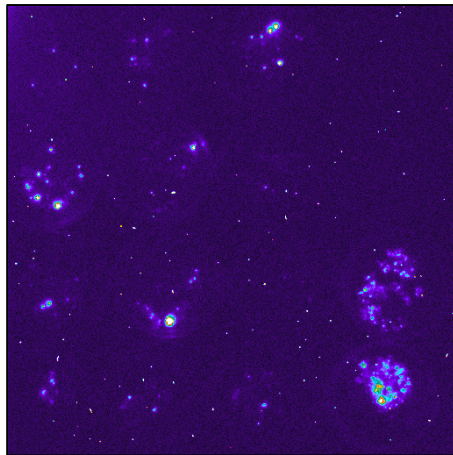
Vitroplantas

Live



~42,000

LUC



346

Detección de luciferasa en banano

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

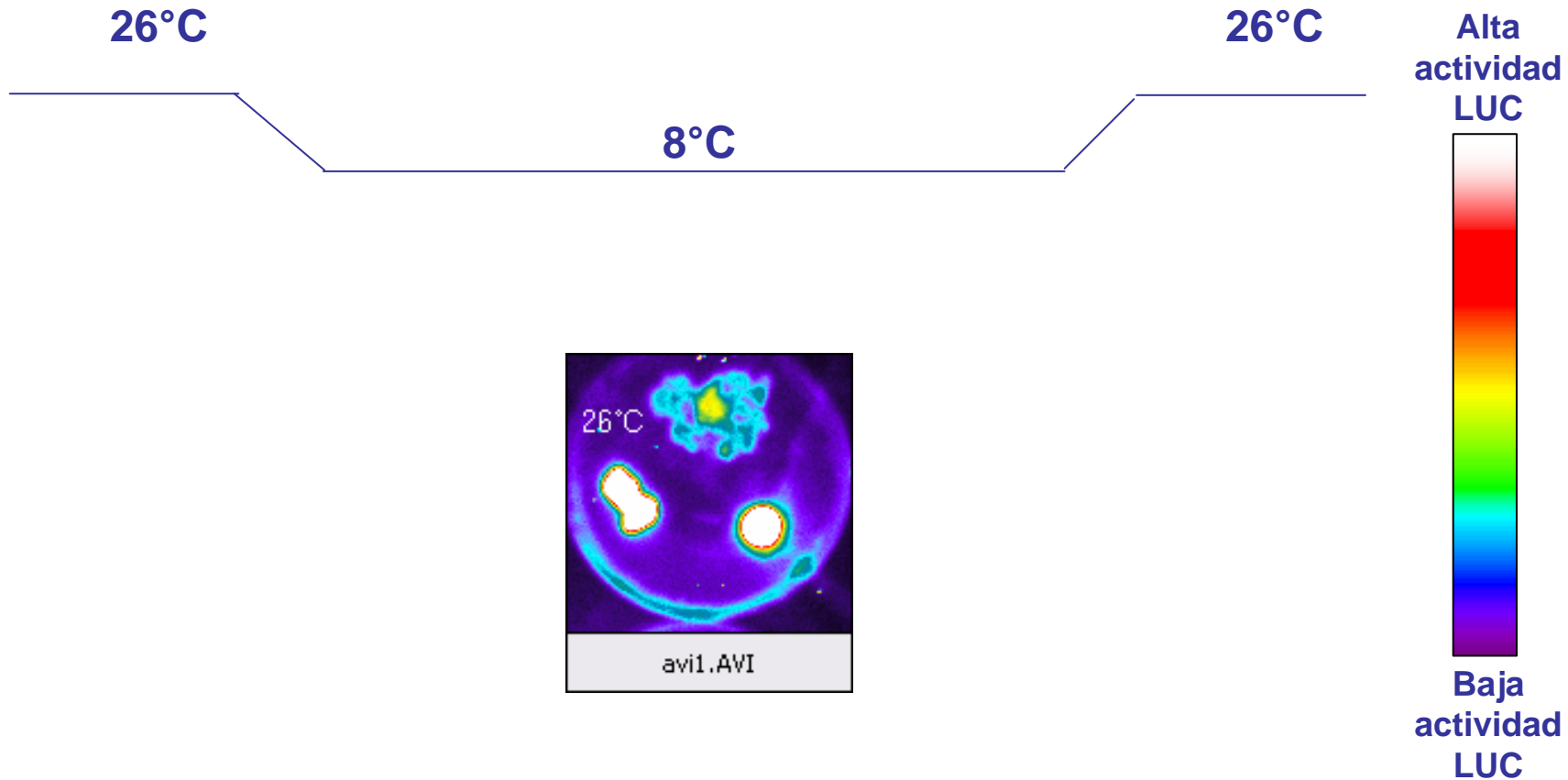
Experiment	Cultivar	Total No. of cell colonies screened^a	Number and frequency (%)^b of cell colonies showing LA
A	<u>THP^c</u>	15,887	155 (0.98)
B	THP	11,973	84 (0.70)
C	THP	11,375	101 (0.89)
D	THP	3570	6 (0.17)
	TOTAL	42,805	346 (0.80)

^aBased on the average number of independent cell colonies calculated from at least three samples per construct and per cultivar.

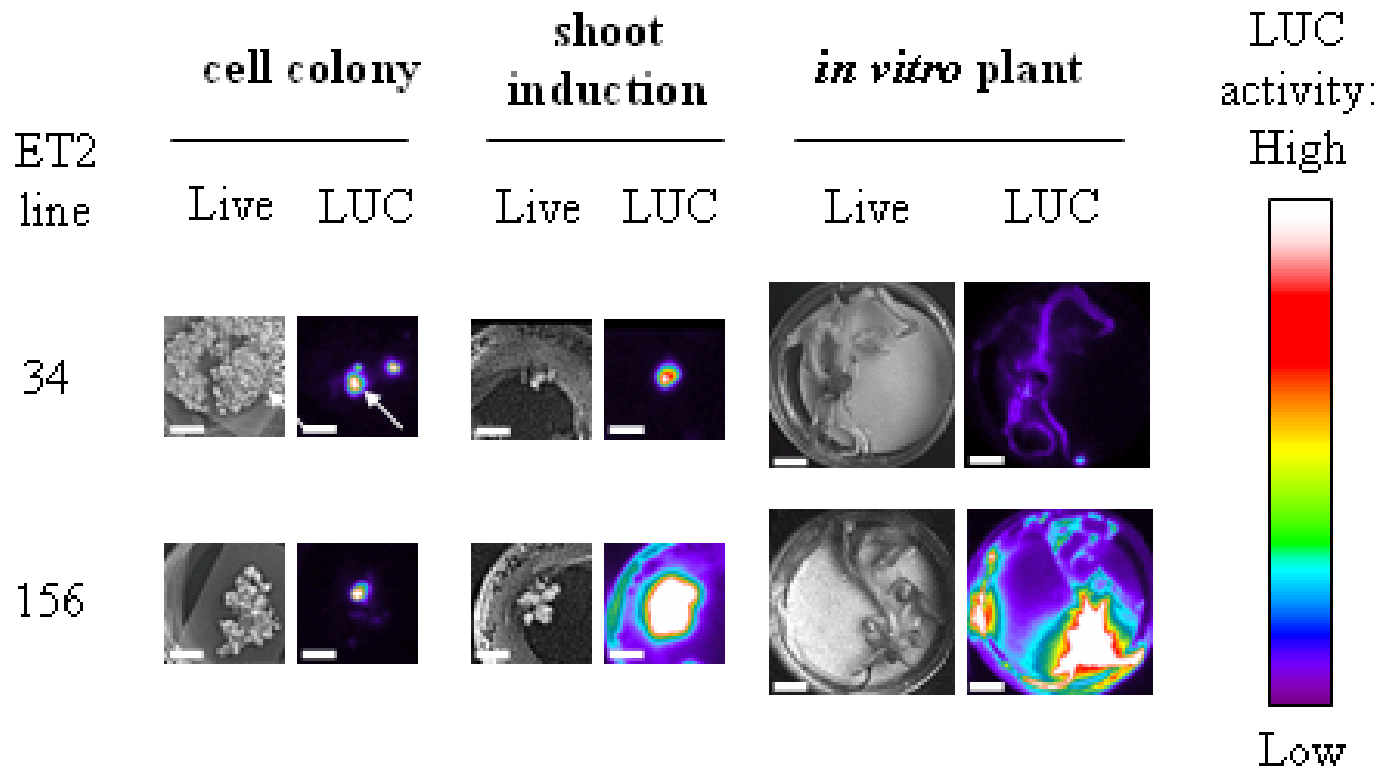
^bThe number of independent candidate promoter-tagged cell colonies showing LA expressed in percentage of the total number of independent transgenic cell colonies screened.

^cPlantain cultivar 'Three Hand Planty' (genotype AAB).

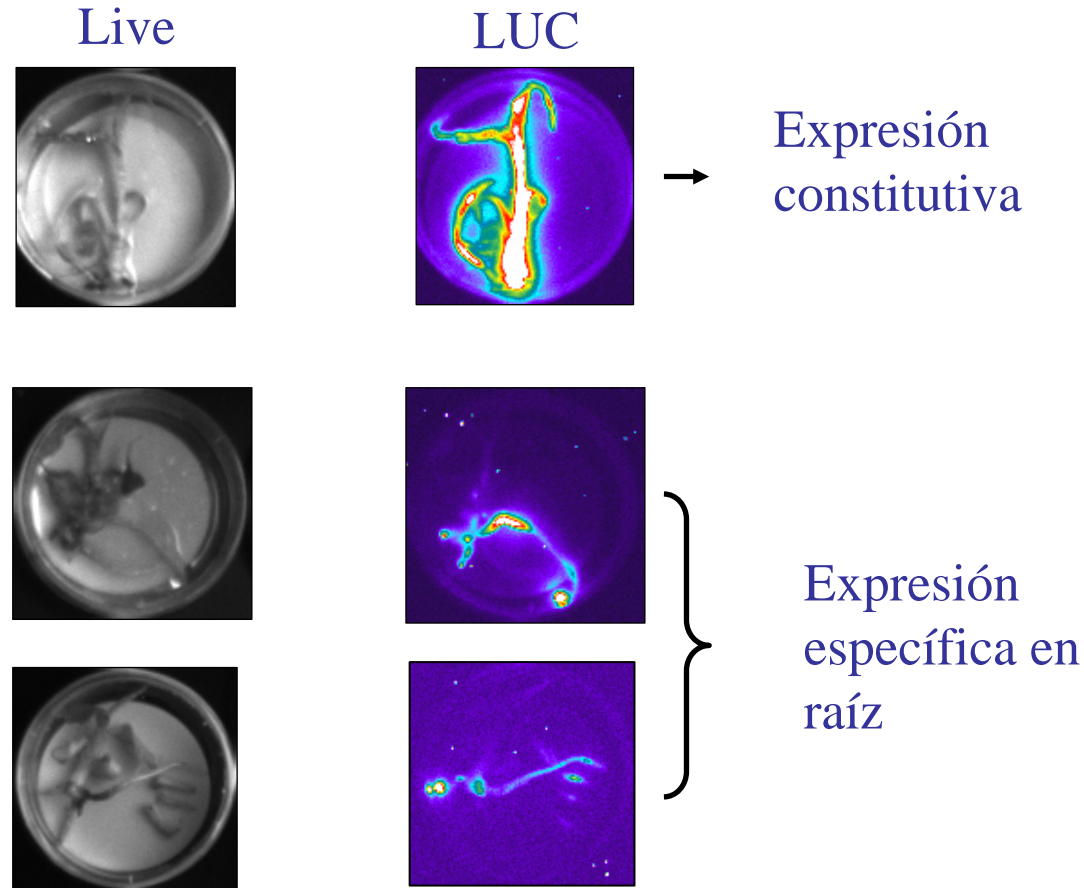
Detección de luciferasa en condiciones de baja temperatura en tiempo real



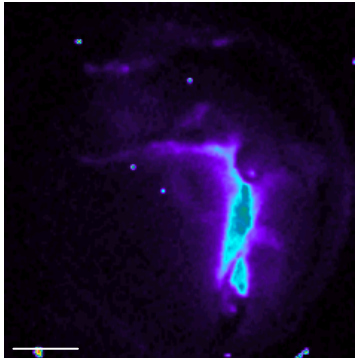
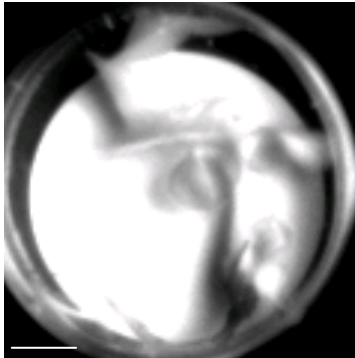
Análisis de la actividad de LUC durante regeneración



Actividad de promotores

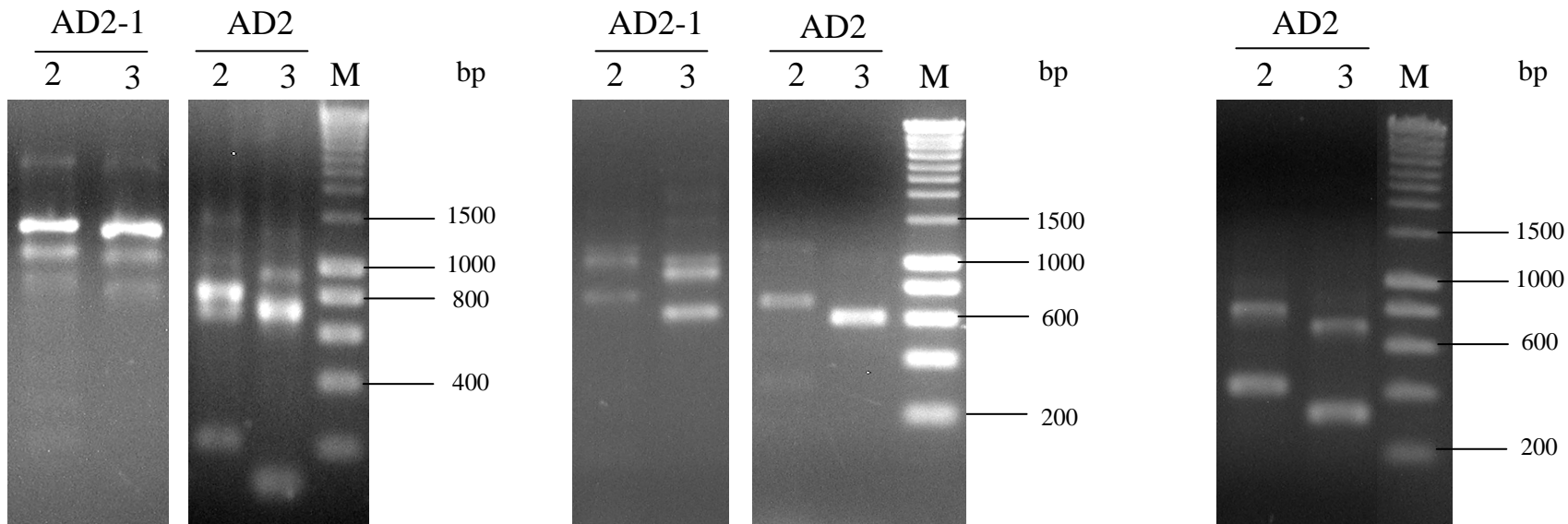
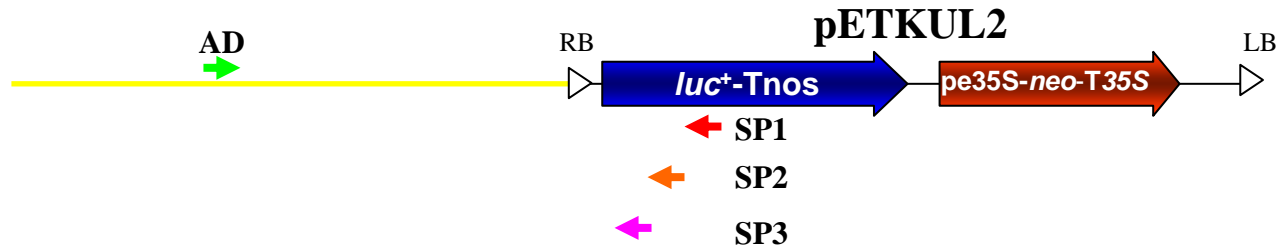


Actividad de promotores

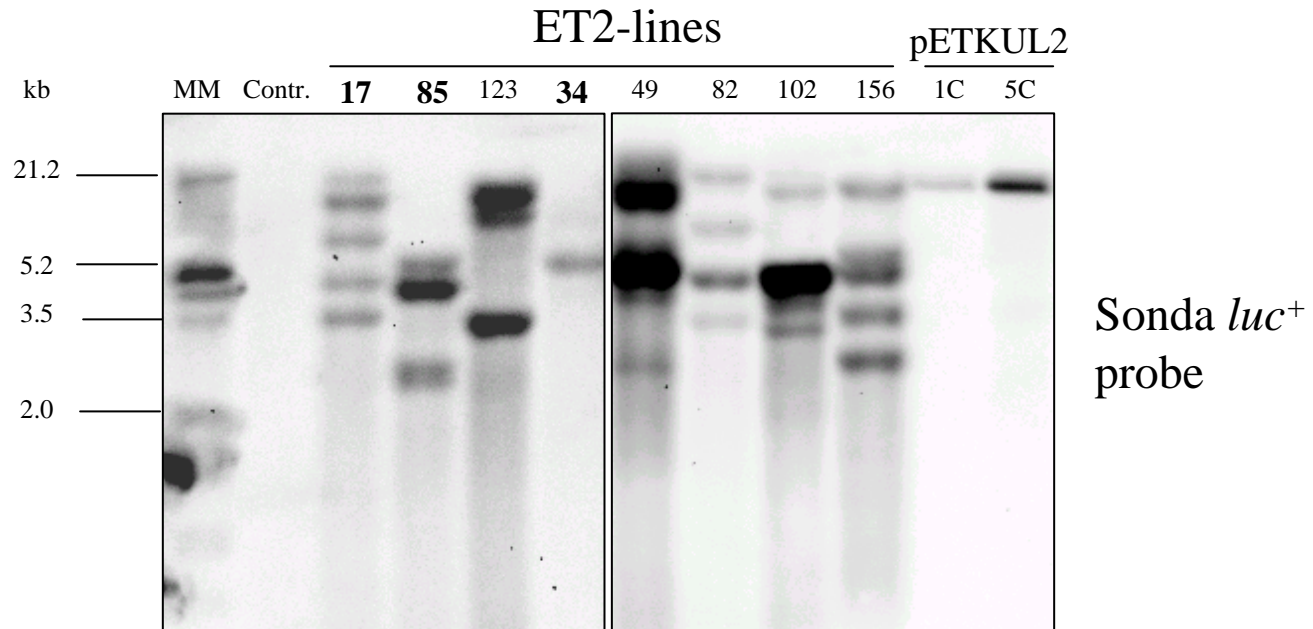
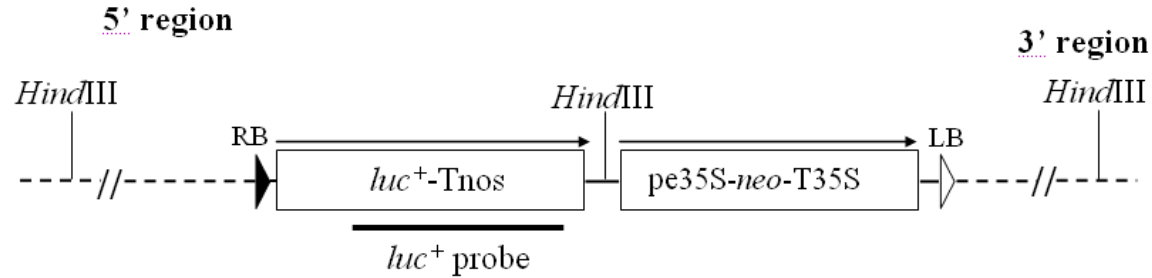


Expresión
específica en el
pseudotallo

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



Southern blot

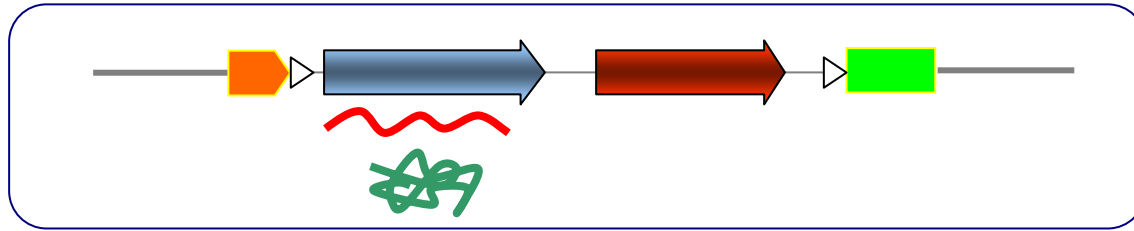


Min.# copias T-DNA: 5 3 3 1 4 4 4 5

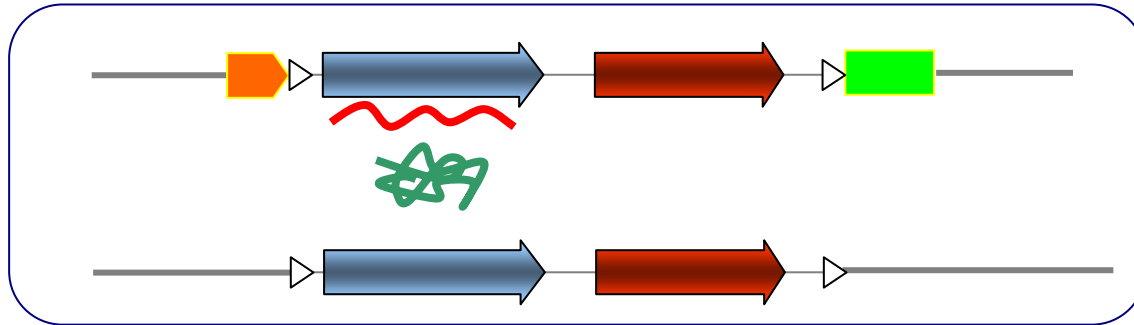
Promedio: **3.6**

V. Caracterización y aislamiento de promotores y genes de banano

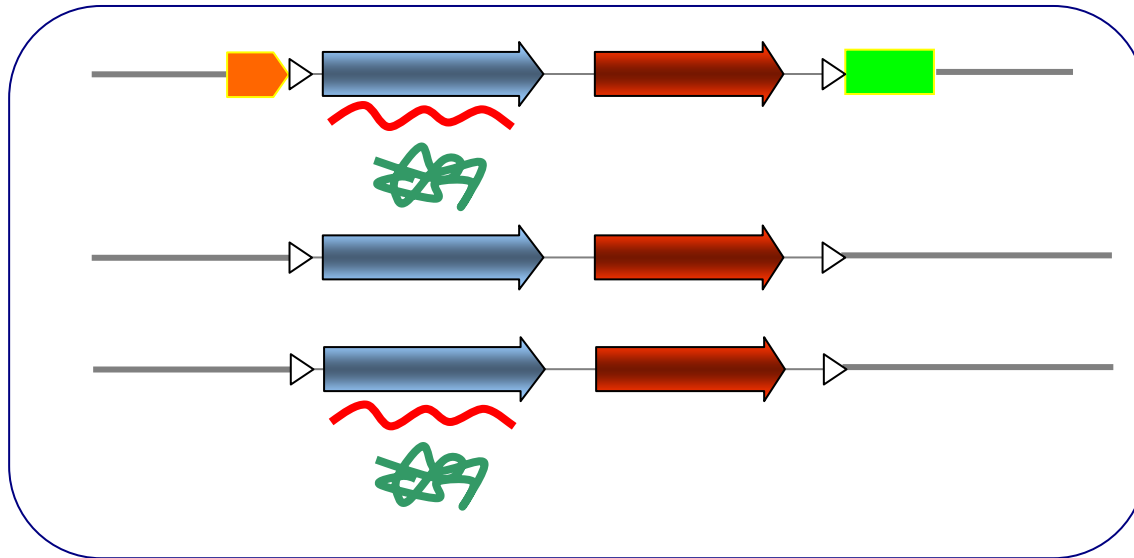
1 T-DNA



2 T-DNAs



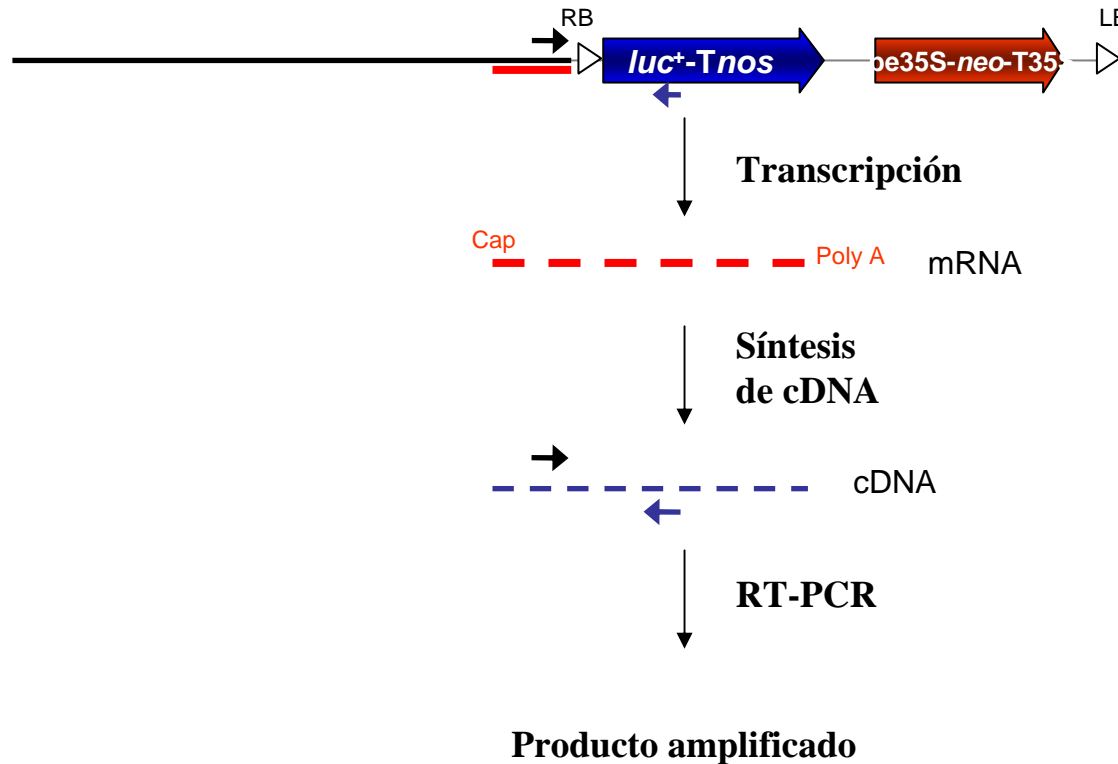
3 T-DNAs



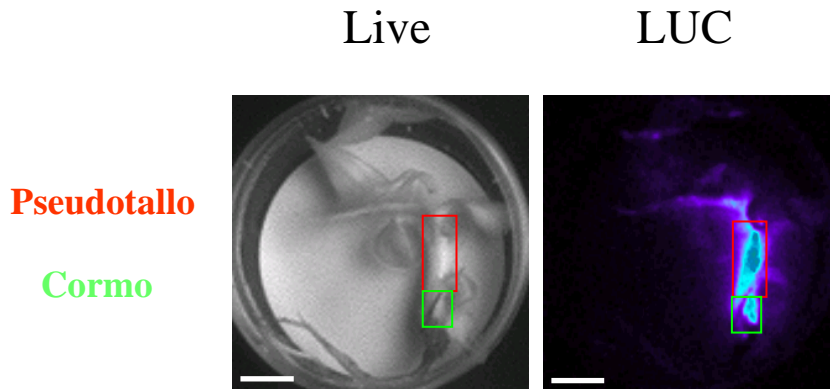
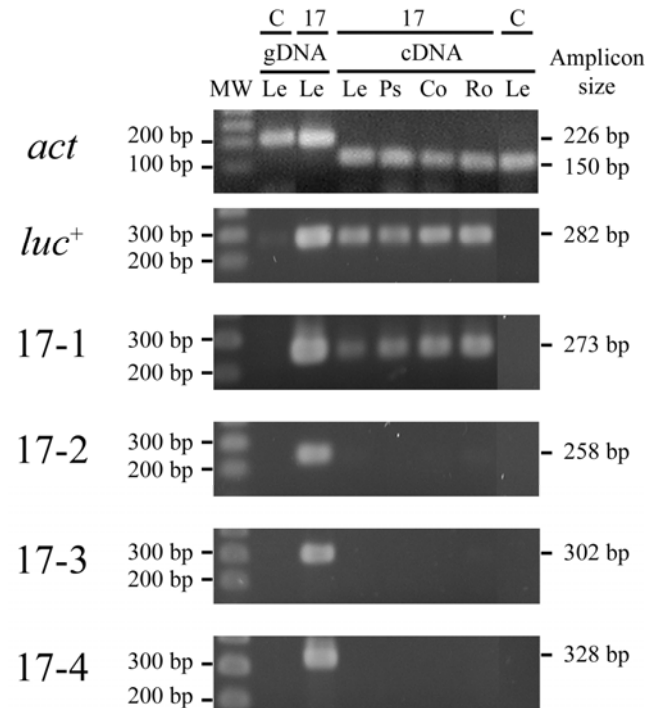
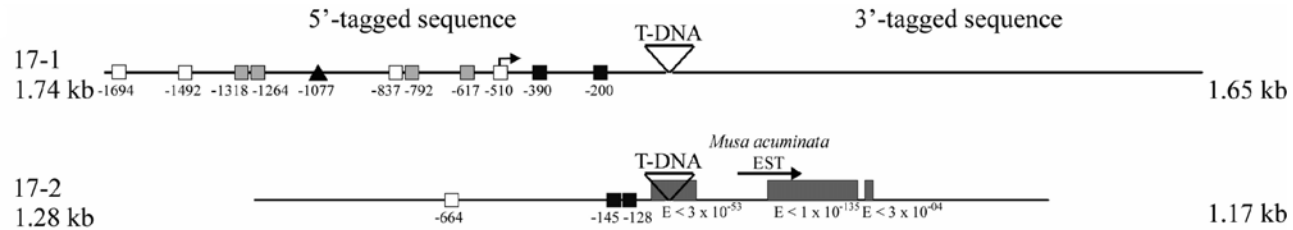
Críptico

Cuál es la secuencia con actividad promotora?

RT-PCR



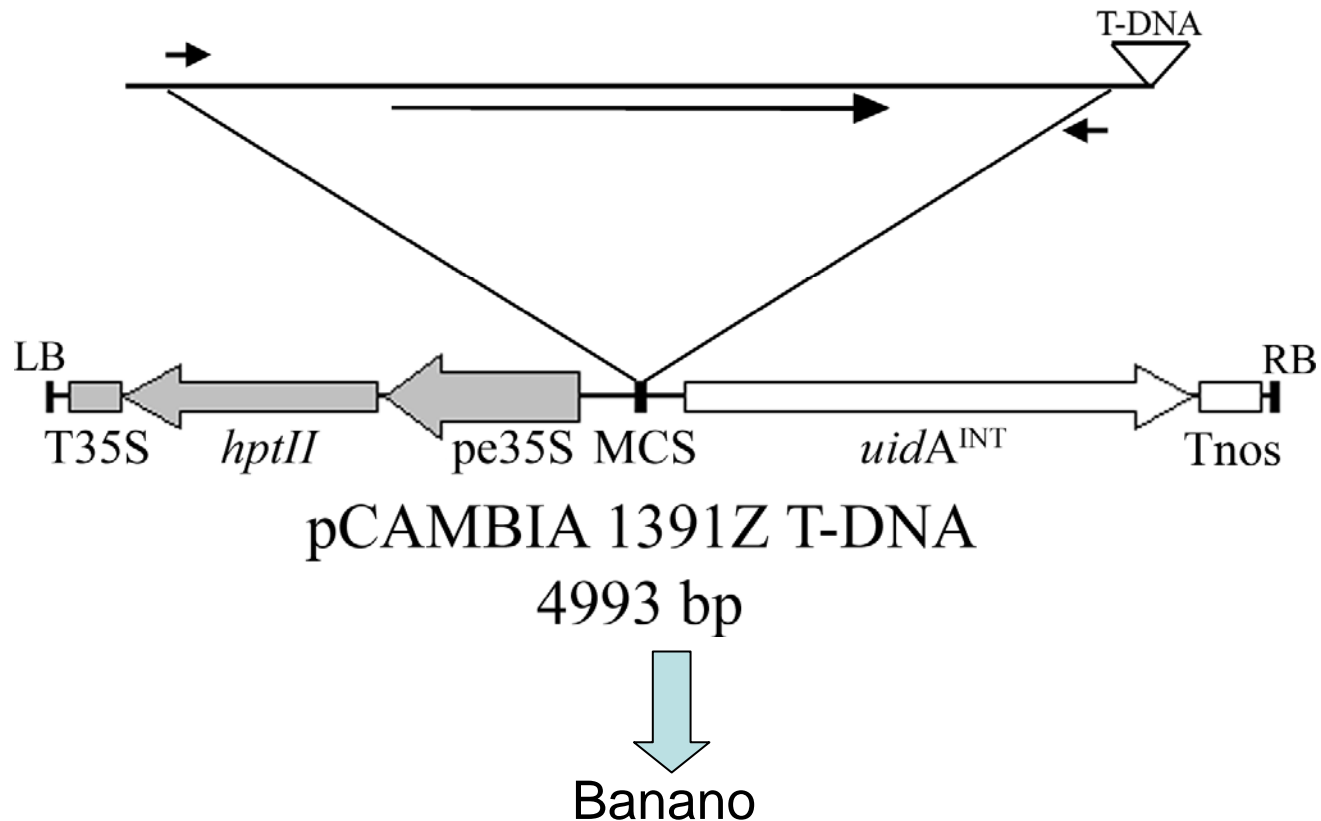
Análisis de la fusión transcripcional, RT-PCR



Son los promotores identificados activos?

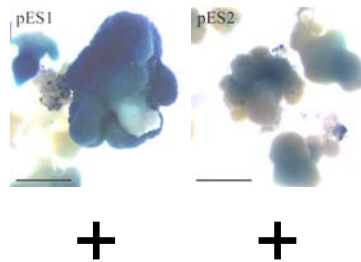
Clonación de promotores en el vector pCAMBIA 1391Z

5'-tagged sequence

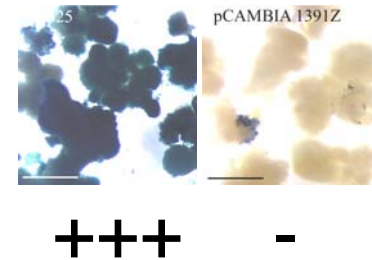


Validación de promotores identificados

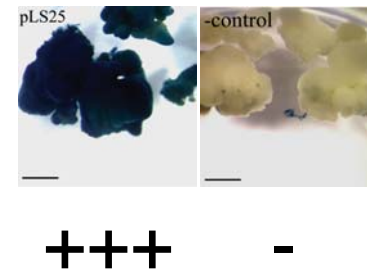
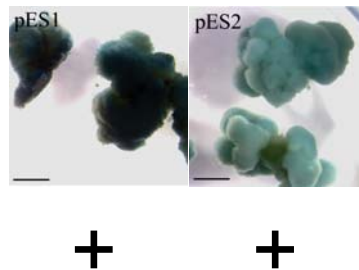
Colonia celular



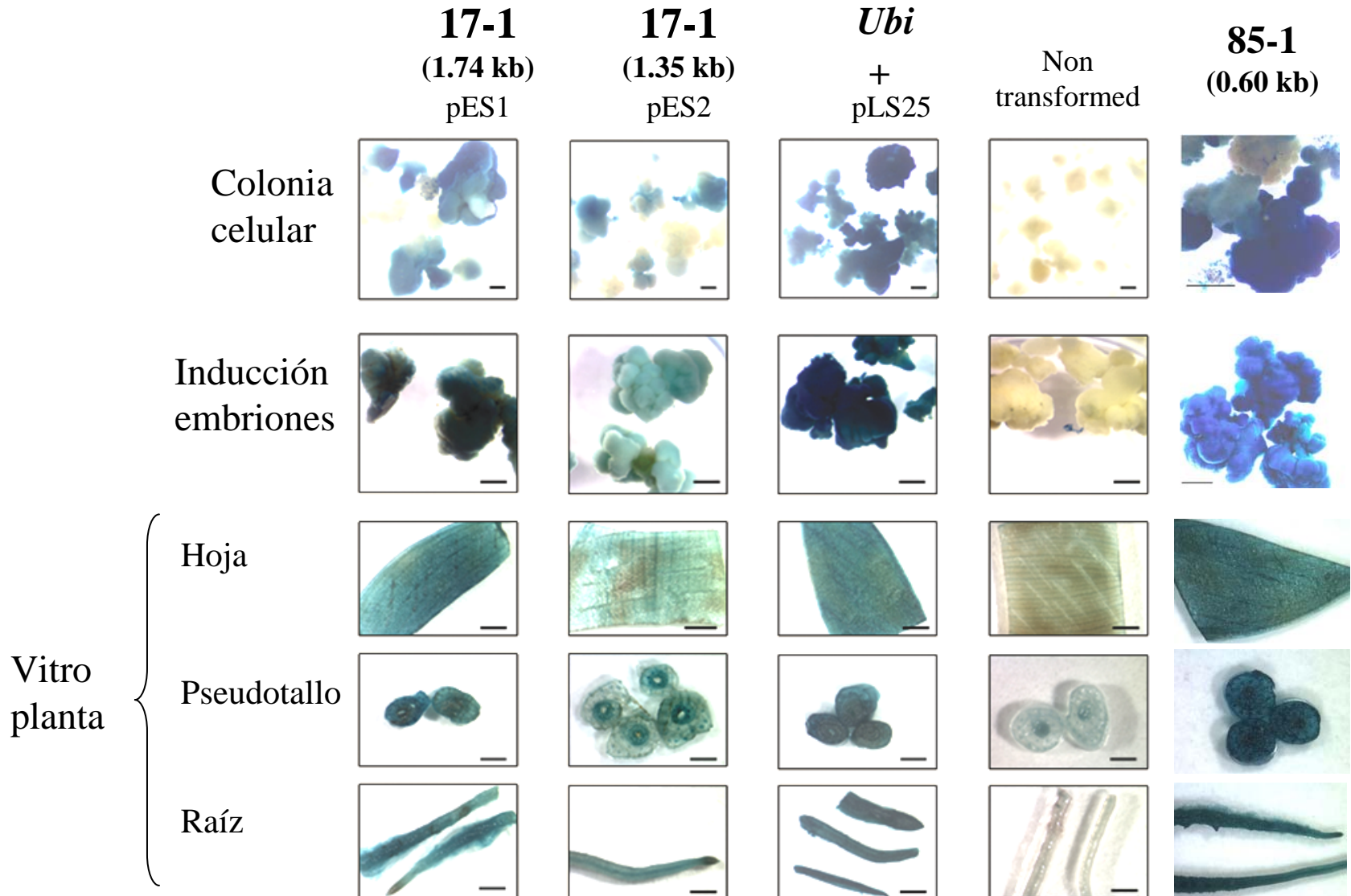
Ubi
+
pLS25 -



Inducción de embriones

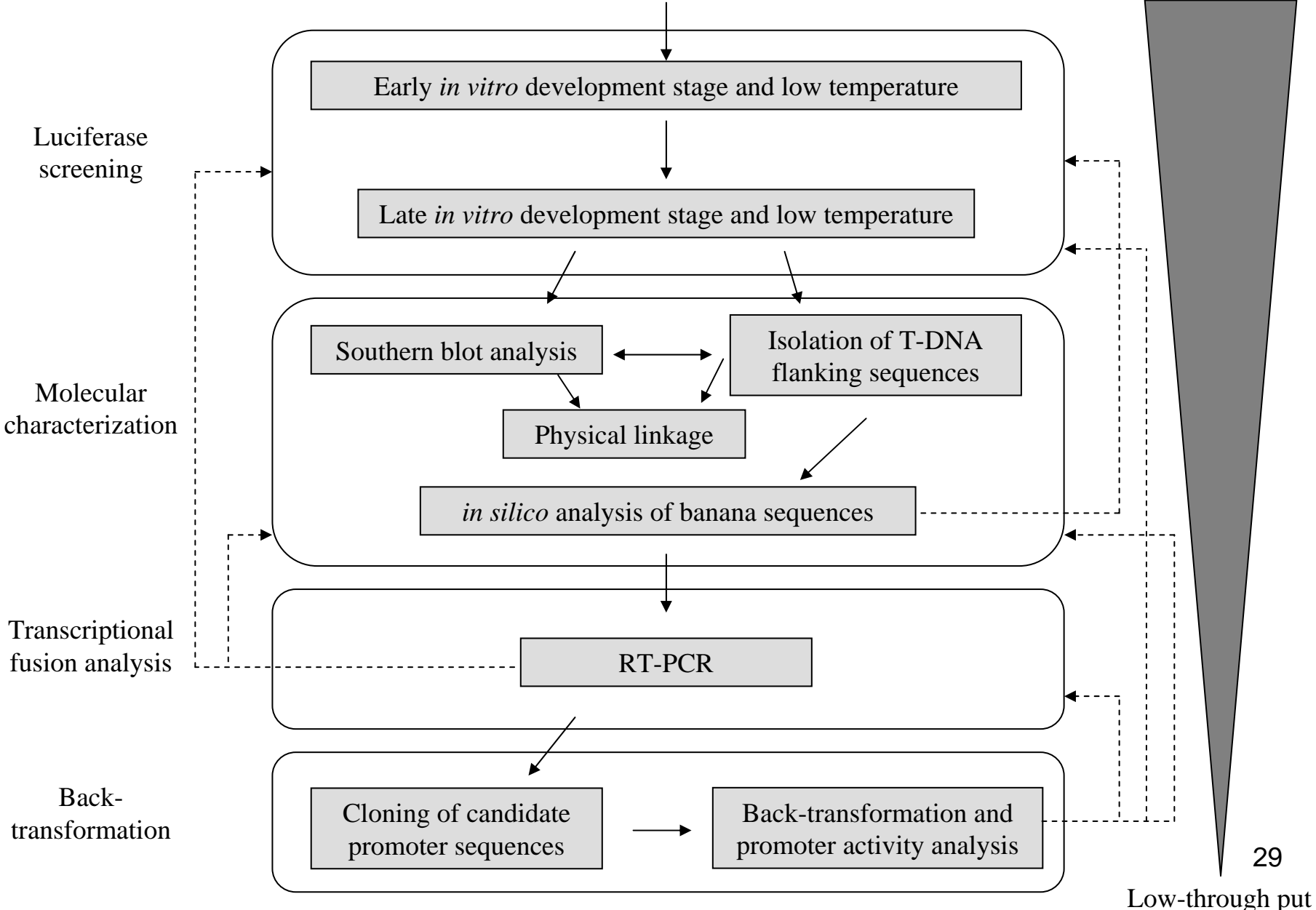


Actividad de promotores



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

