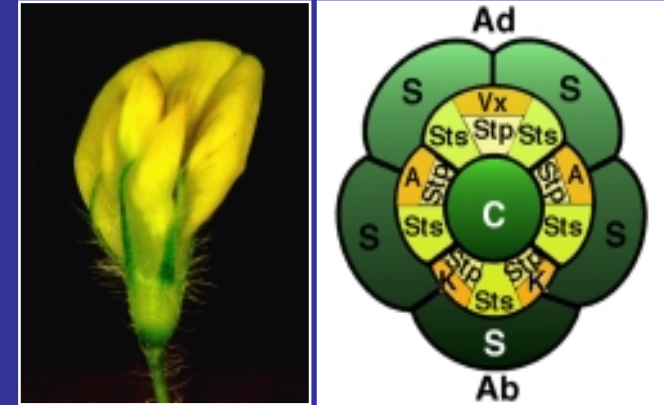


PLANTAS TRANSGÉNICAS: MITOS Y REALIDADES



José Pío Beltrán

**Departamento de Biología del Desarrollo.
Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas
(UPV-CSIC)**

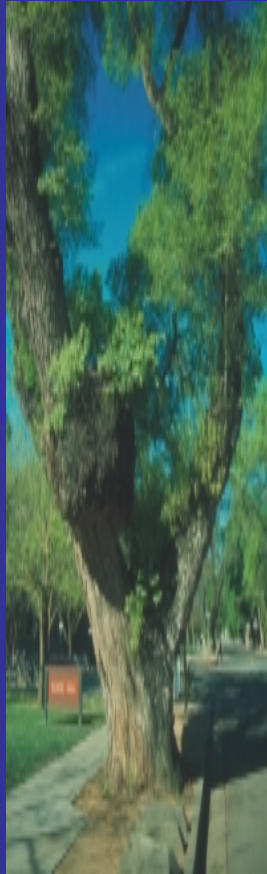


LOS COLOQUIOS DEL IFIC Abril, 2005



IBMCP

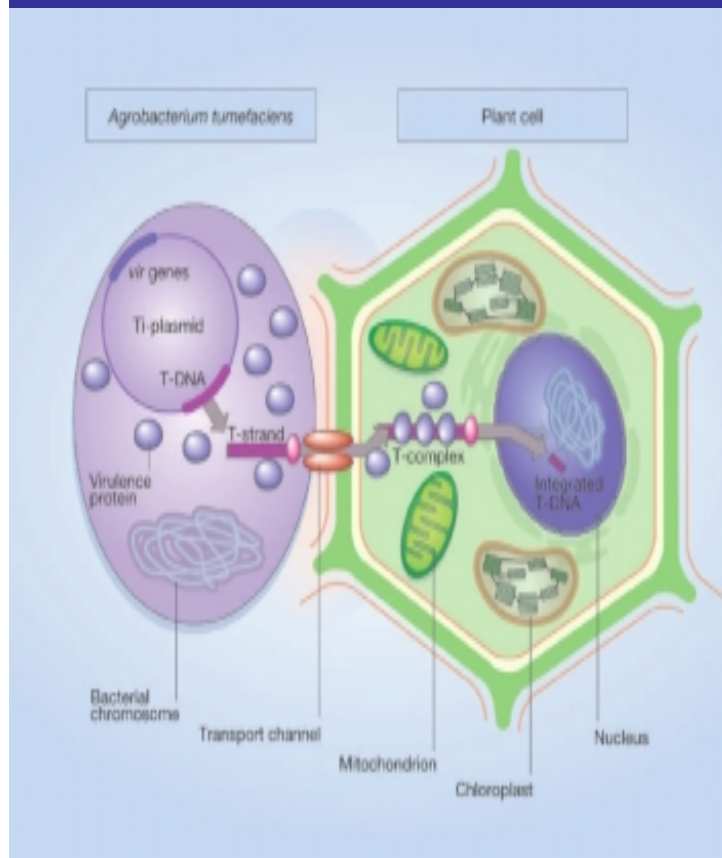
La ingeniería genética permite modificar en un solo gen el patrimonio genético de una variedad de cultivo obtenida por técnicas de mejora tradicionales. Las variedades así obtenidas se denominan **transgénicas**.



Crown gall tumour on an elm tree. Most crown gall tumours form at or below the surface of the soil, but aerial tumours can also occur, as here.

(Courtesy of Jer-Ming Hu, National Taiwan University, Taipei.)

How *Agrobacterium* genetically transforms plants.



Agrobacterium contains a Tumour inducing (Ti) plasmid, which includes virulence (*vir*) genes and a transferred-DNA (T-DNA) region.

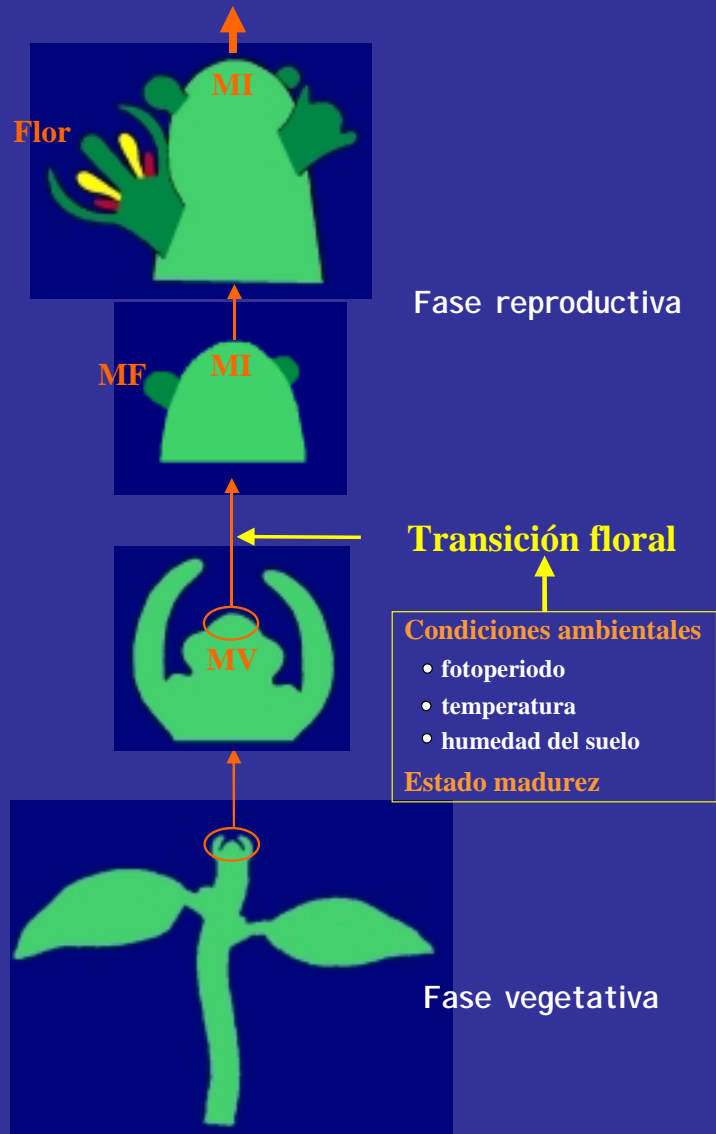
Genes of interest can be inserted into the T-DNA. Wounded plant cells produce phenolic defence compounds, which can trigger the expression of the *Agrobacterium vir* genes. The encoded virulence (*Vir*) proteins process the T-DNA region from the Ti-plasmid, producing a 'T-strand'.

After the bacterium attaches to a plant cell, the T-strand and several types of *Vir* proteins are transferred to the plant through a transport channel. Inside the plant cell, the *Vir* proteins interact with the T-strand, forming a T-complex. This complex targets the nucleus, allowing the T-DNA to integrate into the plant genome and express the encoded genes.

LA INGENIERÍA GENÉTICA COMO HERRAMIENTA :

- PARA PROGRESAR EN EL CONOCIMIENTO DE LA BIOLOGÍA**

- PARA PRODUCIR PLANTAS DE INTERÉS AGRONÓMICO**



DESARROLLO FLORAL



MERISTEMO INFLORESCENTE

- GENES DE IDENTIDAD DE MERISTEMO FLORAL



MERISTEMO FLORAL

- GENES DE IDENTIDAD DE ÓRGANO FLORAL (MODELO ABC)

- GENES DIANA DE LOS GENES DE IDENTIDAD DE ÓRGANO



FLOR (órganos florales)



El análisis genético y molecular de mutantes homeóticos de desarrollo floral ha permitido en los últimos años comprender las bases moleculares que controlan el tiempo de floración y las características morfológicas de las flores.

Se abre la posibilidad de diseñar y producir plantas con ayuda de la ingeniería genética que produzcan flores a “la carta” en el momento deseado por el agricultor



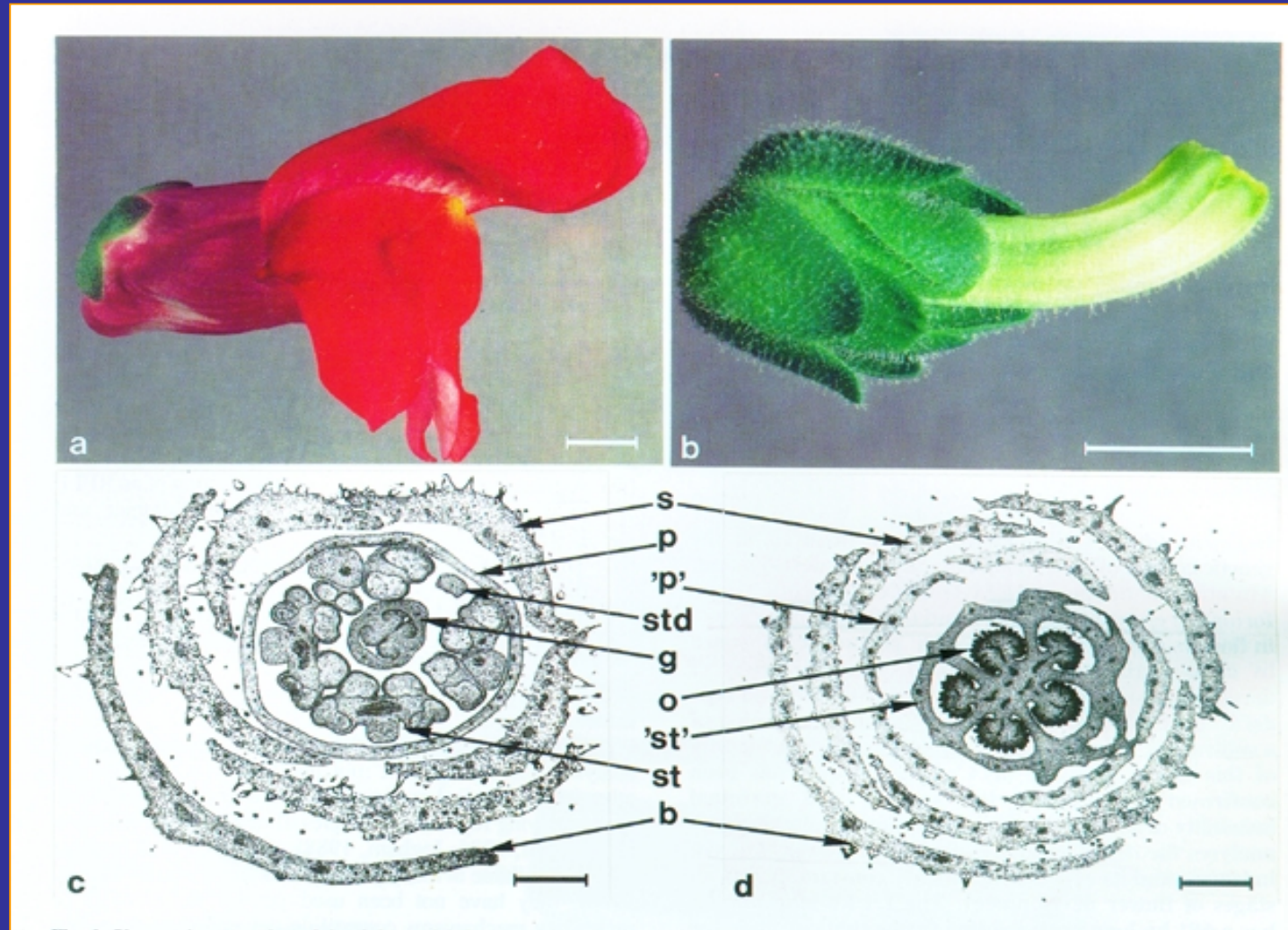
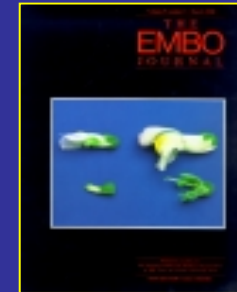
En *Antirrhinum majus* hay elementos transponibles activos

Es posible etiquetar genes con elementos transponibles

En el caso del gen *Deficiens* disponíamos de una serie de mutaciones alélicas para dicho *locus*



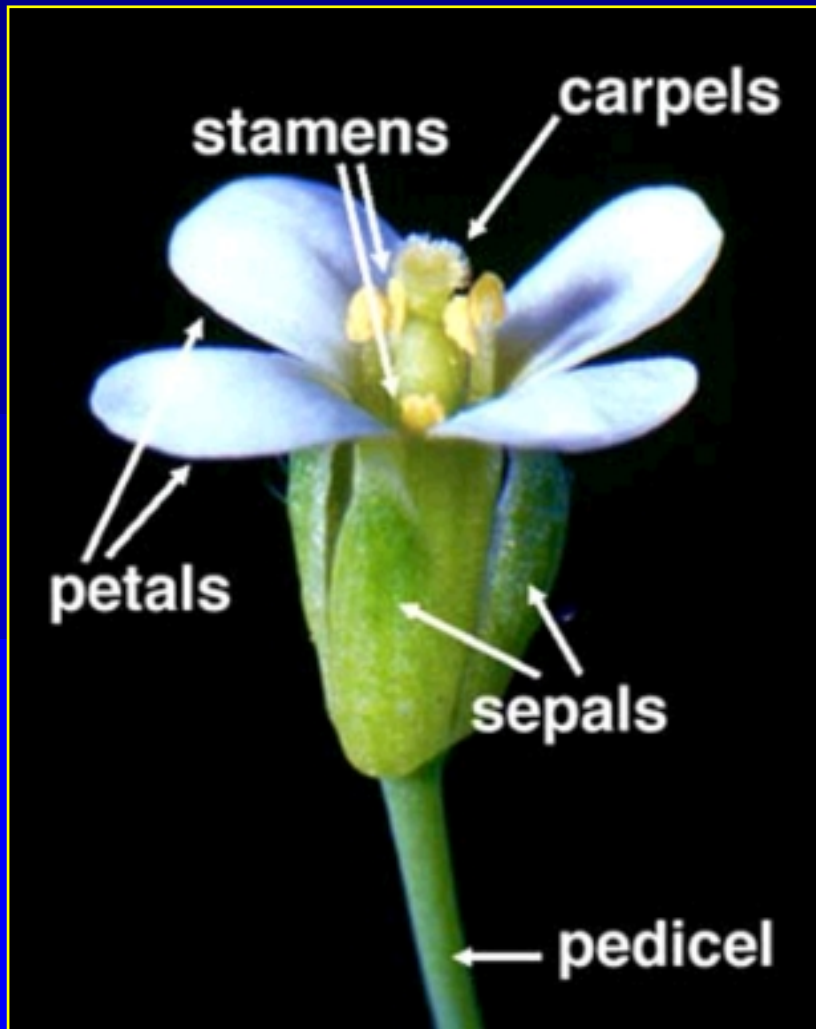
Deficiens : primer gen de la familia MADS caracterizado.



defA-1 (*globifera*)

EMBO Journal 9: 605-613 (1990)

Flower Patterning -- the pieces & parts



Detlef Weigel Lab

<http://biosun.salk.edu/LABS/pbio-w/>

Pérdida de función B (LOF-B) en *Arabidopsis*

*Transformaciones homeóticas en
verticilos 2 y 3*

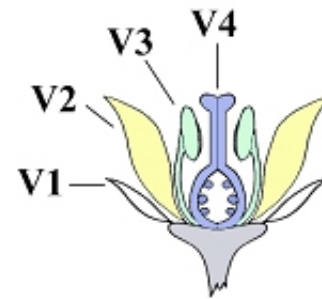
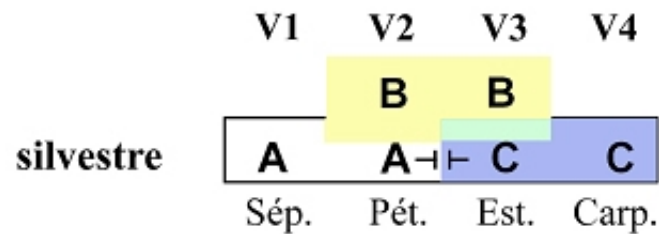
APETALA-3

PISTILLATA

pétalos>>>>sépalos
estambres>>>>carpelos



Desarrollo floral. Modelo ABC

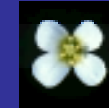


1. Tres clases de actividades A, B y C especifican la identidad de los órganos florales de manera combinatoria

2. Las funciones A y C se reprimen mutuamente

3. Las funciones de identidad de órganos son independientes de la posición que ocupan en el meristemo floral

Genes de identidad de órgano floral



Clase A *AP1, AP2* *LIP1, LIP2*

Clase B *AP3, PI* *DEF, GLO*

Clase C *AG* *PLE, FAR*

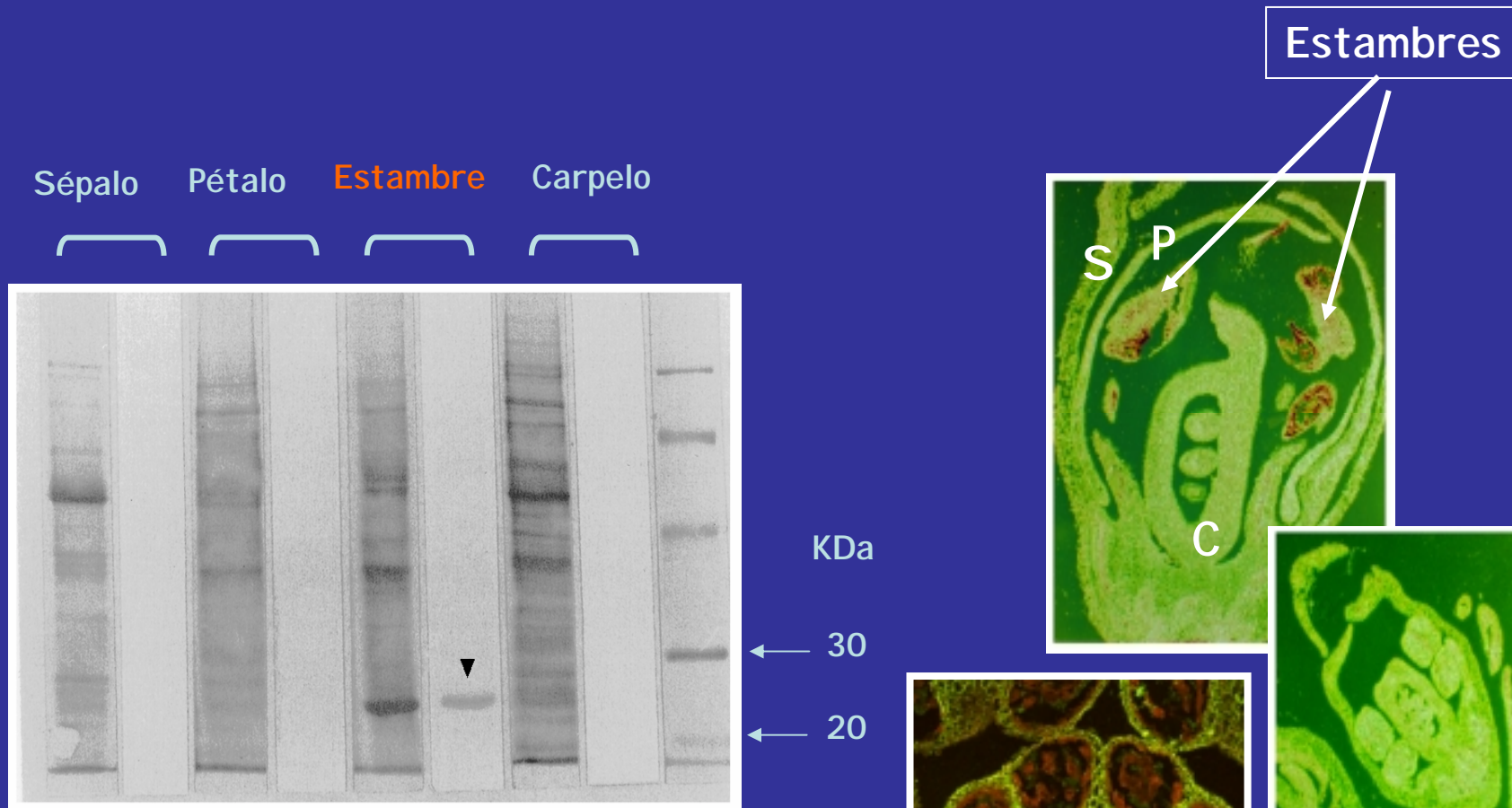
Clase D *STK, SPH 1,2*

Clase E *SEP 1, 2, 3*

Nos planteamos la necesidad de disponer de marcadores moleculares para identificar órganos y tejidos florales durante el desarrollo inicial de las flores.

Diseñamos una estrategia para producir anticuerpos monoclonales que reconozcan a proteínas que se expresan específicamente en un órgano o tejido

Patrón de expresión de la proteína (26kDa) que reconoce el anticuerpo monoclonal A1

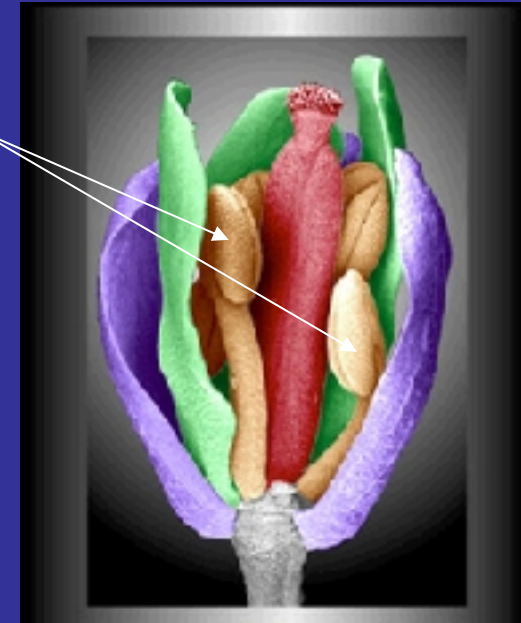


ESTRUCTURA DEL ESTAMBRE



Meristemo floral

Primordios de estambres



Flor adulta

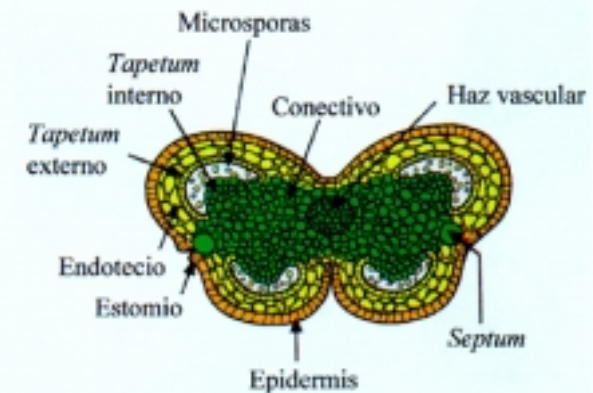
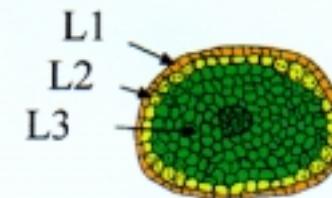
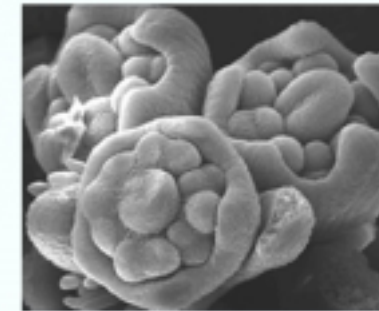
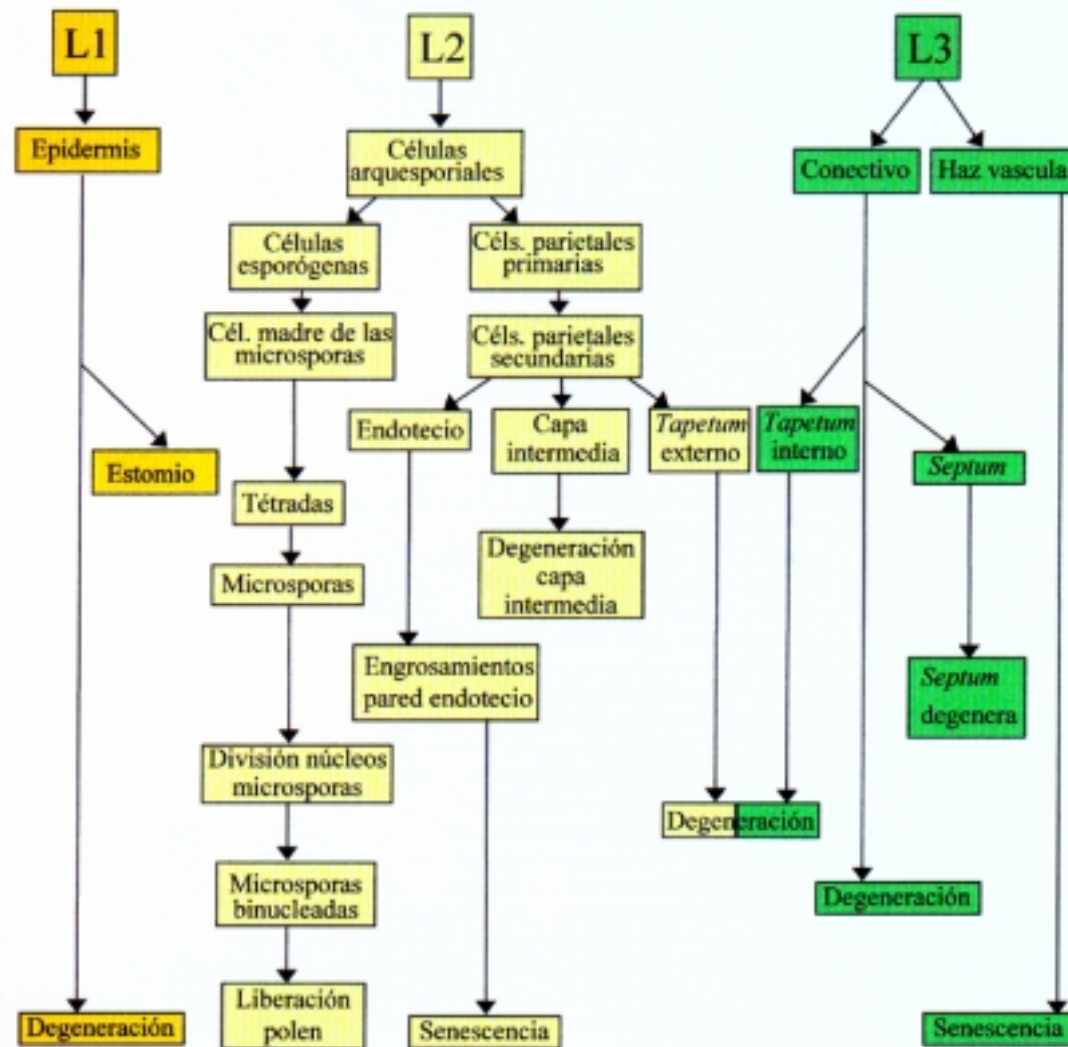


Estambre

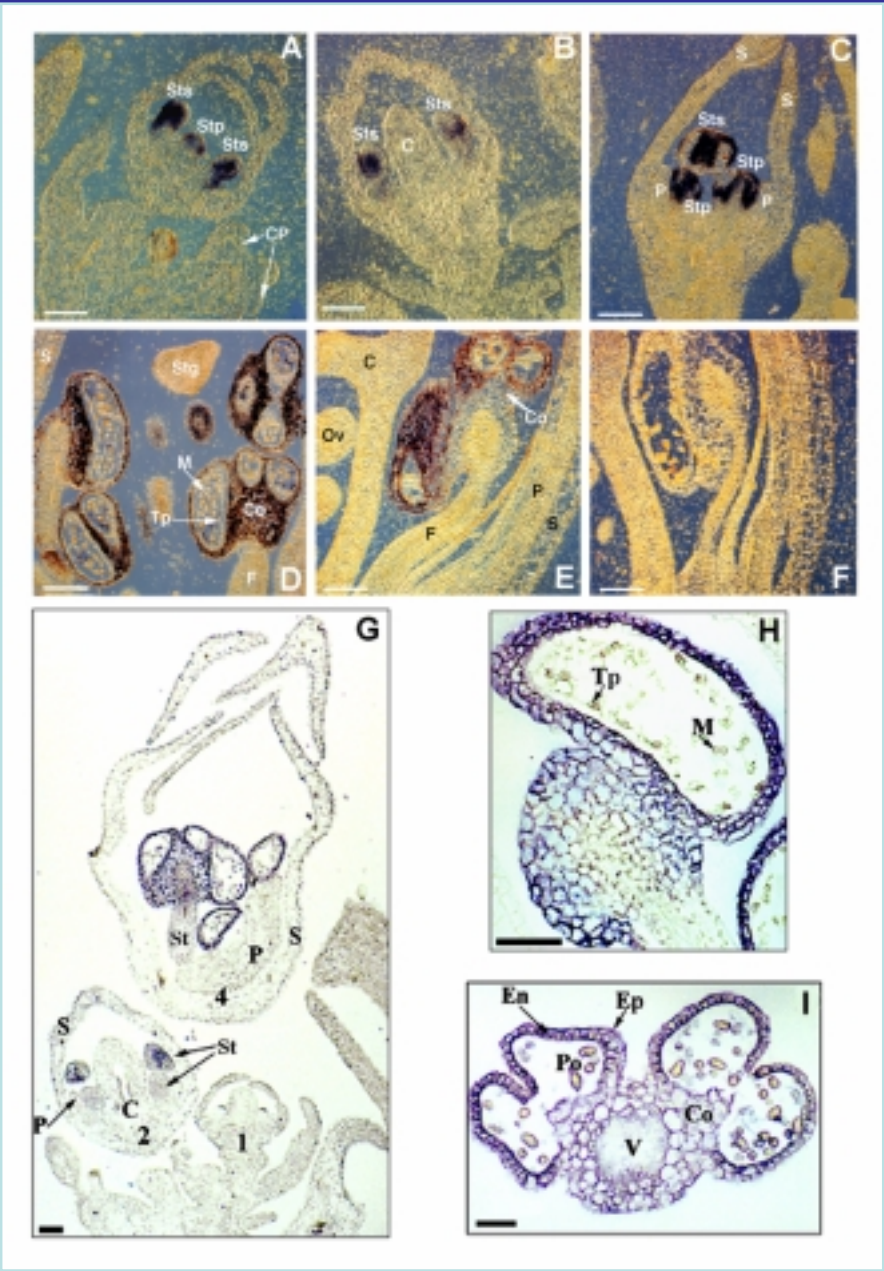
Antera

Filamento

Origen de los distintos tejidos de la antera

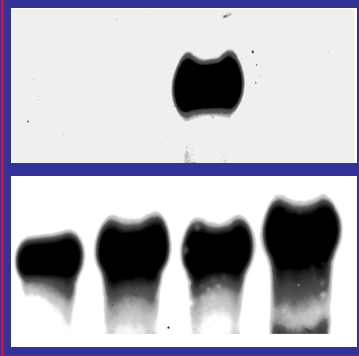


Expresión específica en anteras de *END1*

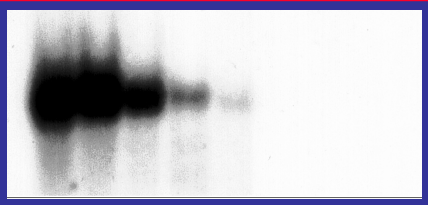


RNA

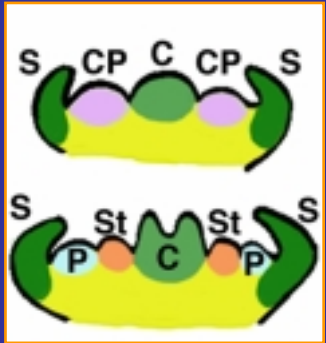
S-2 P-2 E-2 C-2



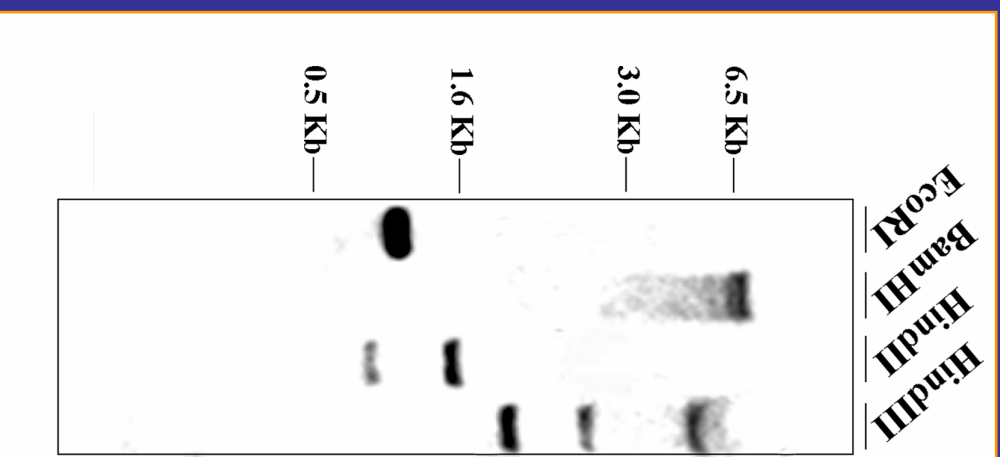
F-8 F-6 E-4 E-2 E-1 EO TE Po



Proteína



El gen END1 se encuentra como copia única en el genoma del guisante



La dificultad de transformar genéticamente el guisante nos llevó a realizar estudios de funcionalidad del promotor en otras especies.

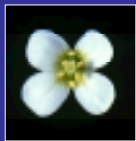
Inicialmente seleccionamos *Arabidopsis* como planta modelo y tabaco y tomate como plantas de cultivo.

Se pretendió comprobar si la región promotora del gen *END1* de guisante es capaz de dirigir la expresión de genes de forma específica a las anteras de dichas plantas y en caso positivo determinar la región promotora mínima necesaria.

El promotor END1 de guisante es también funcional en *Arabidopsis*, tabaco y tomate



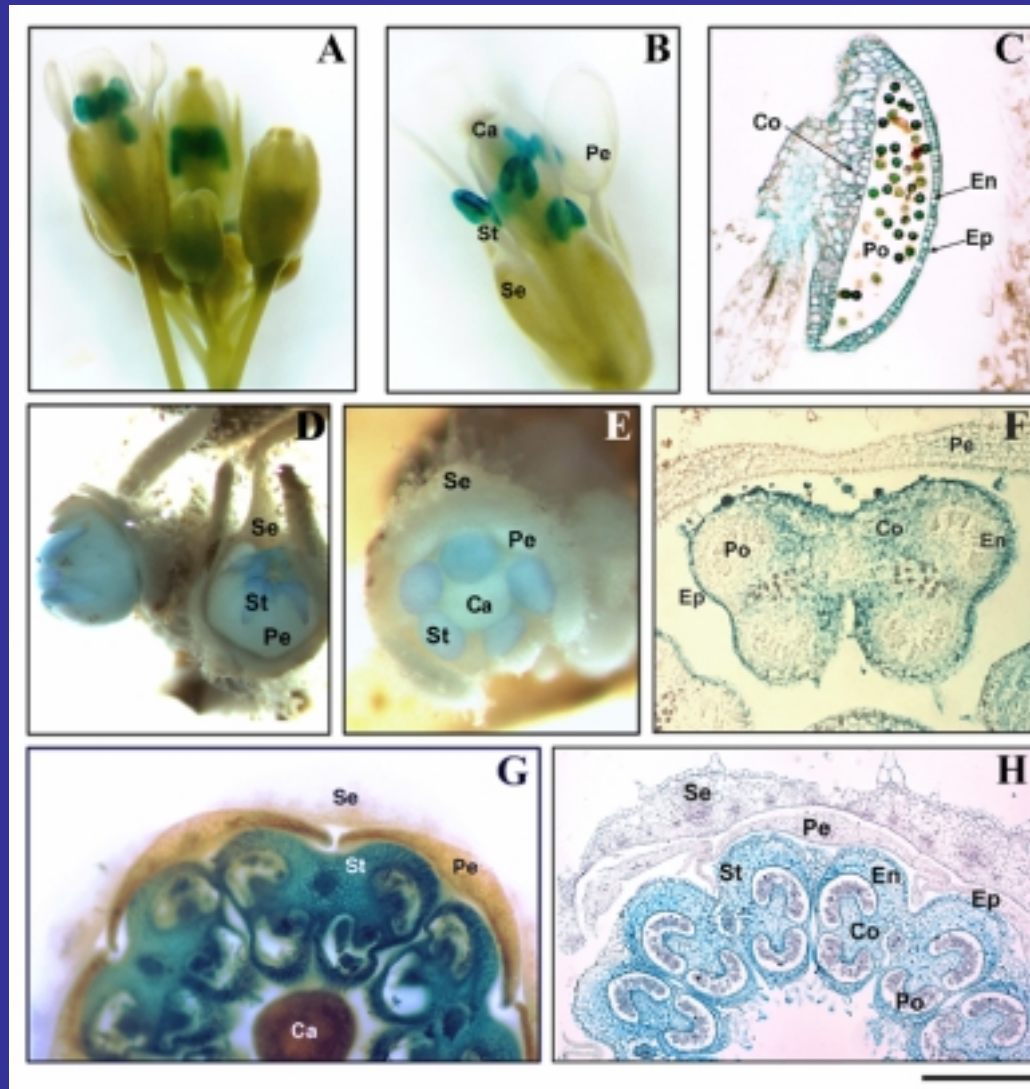
Arabidopsis



Nicotiana



Lycopersicon



GUS+
Epidermis
Endotecio
Conectivo
Capa intermedia

GUS-
Tapetum
Polen
Semilla
Tallo
Hoja
Raíz

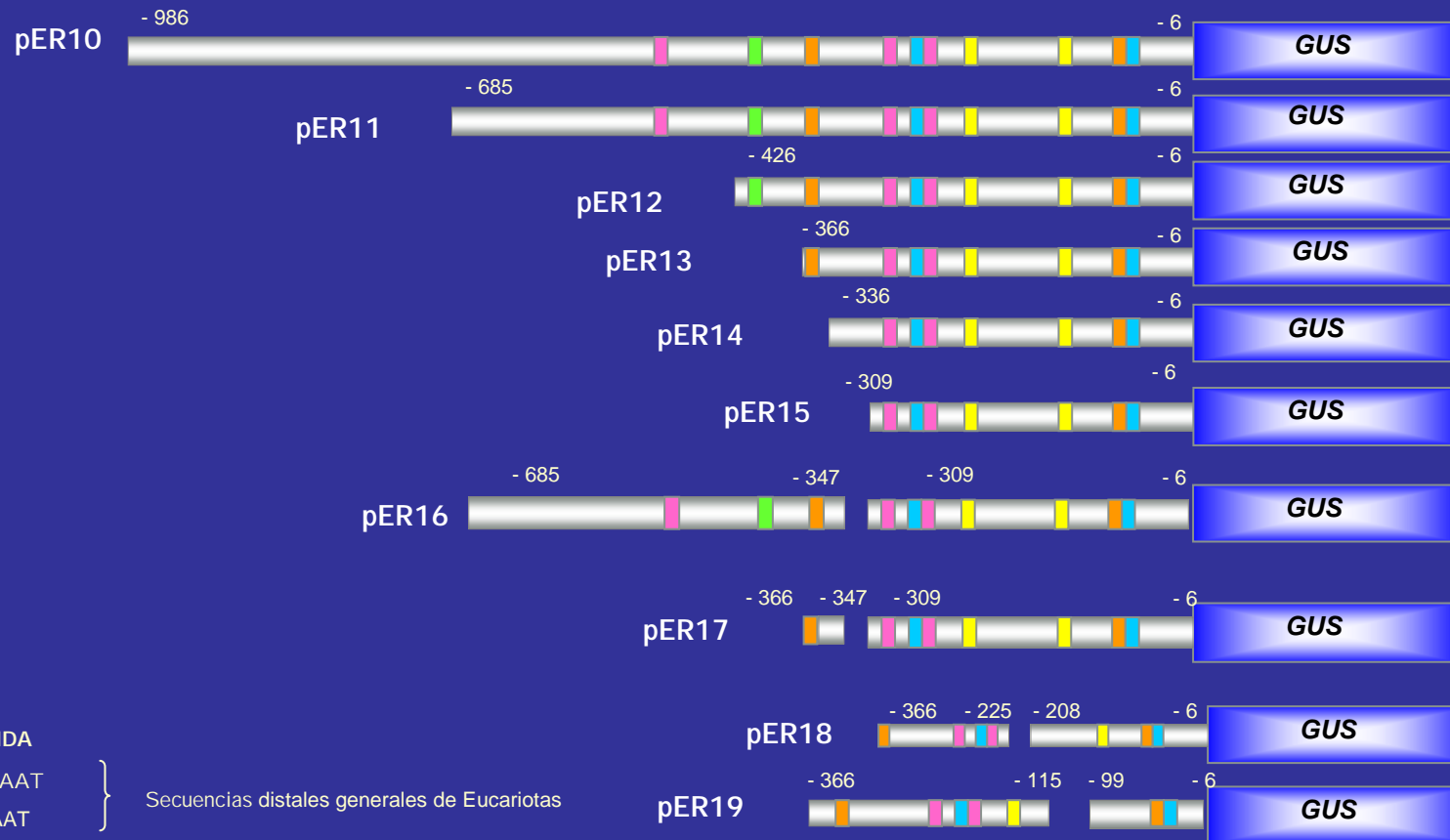
Análisis informático de la región 5' de *END1*

-536 ttttttaaaa atatattacc gtaatttttc **aaaaaa**taaa atttaaatat
-486 attttataaa aaaattatth aataatttat ttacattaat gcataaatat
-436 aaataaatac tgtcatttaa tatttaacct tttaa**caat**a aattatattt
-386 atttaattca actaatataa gctaagttat ctcatccaac **caat**taaaaa
-336 gatcatttga aaataccttt ttatttagtt tgtggcggtt tcaact**gtca**
-286 **aaaaaa**agga atttttacga cgat**tataat** ttaaaccagc **aaaaaa**ttga
-236 agcagttaag cgaac**ccaact** **catgg**tatgt ggatatattt atctttgtcg
-186 tttatatcgg attcgaatct ctataatgat gaaaaattaa tatcaaactt
-136 taaataagaa **cg**tcaatttat agag**ccattt** **tggg**aaacac atatttcatg
-86 tacacgtgat tcgcaaattt **ccaataactc** **tatatata**gc cctcctcagt
-36 ttcatgcatt tgcacacaac ataaccttcc ttgaat⁺¹TCGA TATCTACCTA
AGATG

LEYENDA

- █ C(A)_{6/8}, "GTCAAAA", "ACGTCA" Elementos presentes en promotores de anteras
- █ Posibles cajas CArG

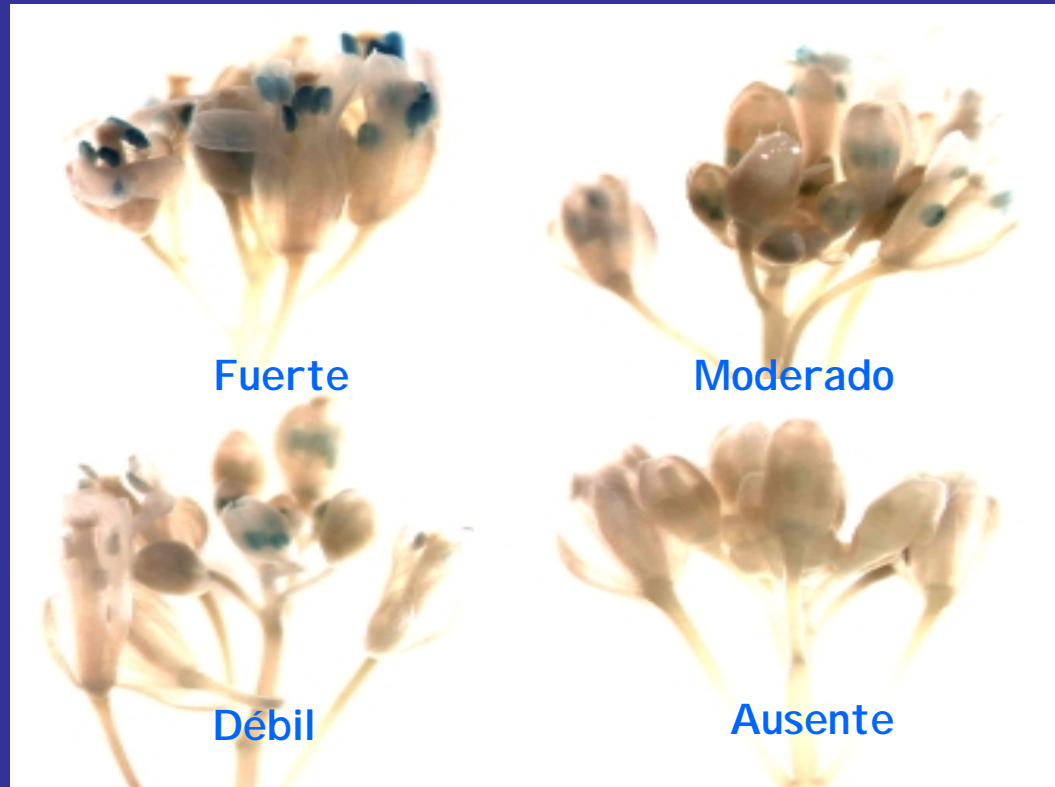
ANÁLISIS FUNCIONAL DEL PROMOTOR DEL GEN *END1* DE GUISANTE



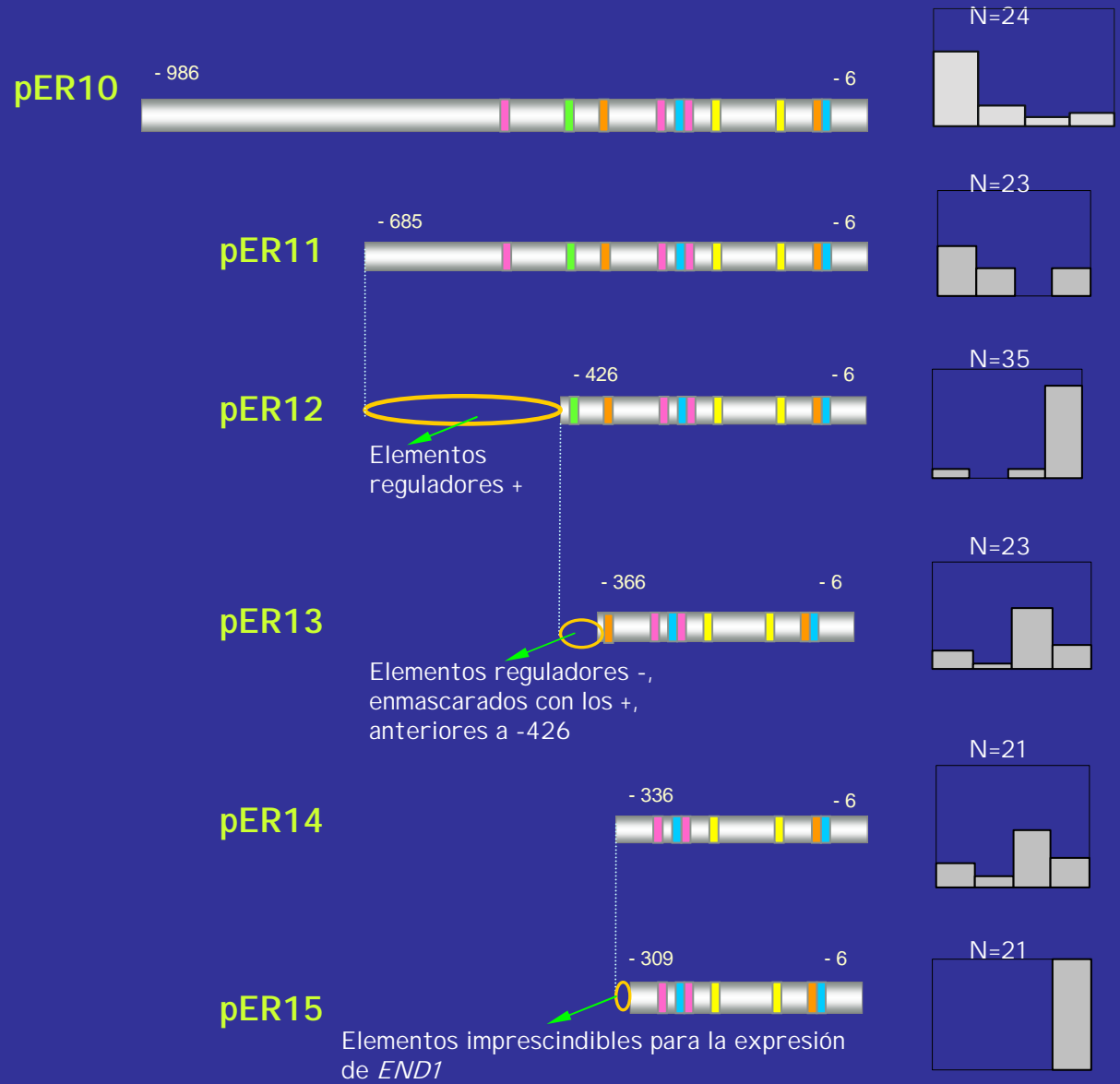
LEYENDA

- █ CCAAT
 - █ CAAT
 - █ TATA Posibles cajas TATA
 - █ C(A)_{6/8}, "GTCAAAA", "ACGTCA" Elementos presentes en promotores de anteras
 - █ Posibles cajas CARG
- } Secuencias distales generales de Eucariotas

Ensayo histoquímico de la actividad de la β -glucuronidasa en apices inflorescentes.
Niveles de expresión de GUS.

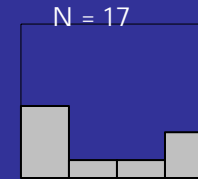


Construcciones con deleciones sucesivas del promotor de *END1*

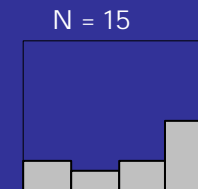


Los datos muestran que -336/-6 es la región definida de la secuencia 5' con capacidad para funcionar como un promotor mínimo para la correcta expresión espacial y temporal del gen

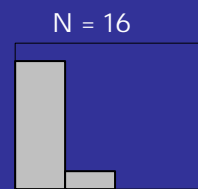
Construcciones con fragmentos de la región promotora de *END1* con deleciones internas de posibles elementos reguladores



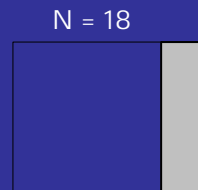
Secuencias adyacentes que contienen elementos con funciones redundantes para la expresión del gen



Elemento represor. Acercamiento de dos elementos reguladores cercanos. Efecto + expresión.



Elemento con un papel clave en la regulación de la expresión de *END1*



Posibles cajas CArG

La pérdida de la expresión de GUS en las anteras de las plantas transformadas con la construcción pER19, apoyan la hipótesis de que *END1* podría ser un gen diana de los genes de identidad de órgano floral que especifican el estambre.

El patrón de expresión espacio temporal del gen *END1* y las distintas plantas en las que su promotor es funcional nos sugieren la posibilidad de aplicar su uso a la obtención de **plantas de cultivo androestériles**

ANDROESTERILIDAD

Requerimientos para la ablación celular

PROMOTOR ESPECÍFICO

GEN CITOTÓXICO

Tabaco: *TA29, TA56*

Arabidopsis: *A9, APG*

Tomate: *LAT51, LAT56*

Guisante: *END1*

Proteasas

Lipasas

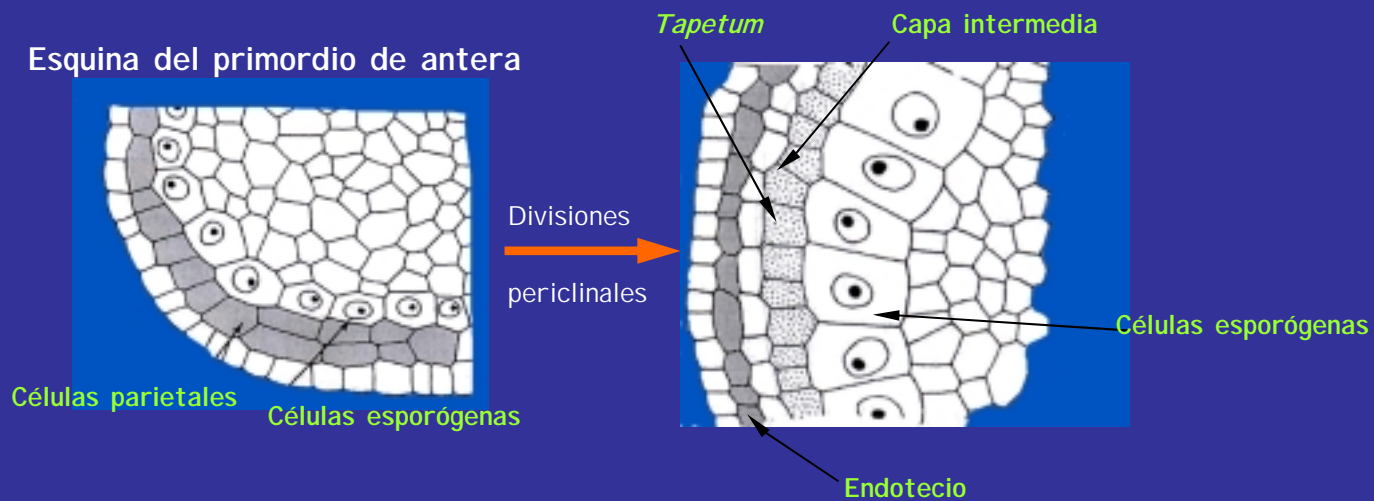
RNasas: barnasa y RNasa T1

Toxinas: DTA y exotoxina A

RNAs antisentido/interferencia

Genes *rol A, B y C*

Si el promotor *END1* dirigiese la expresión del gen barnasa de la misma manera que lo hace con el gen *END1* en guisante, el gen citotóxico comenzaría a expresarse en las células parietales primarias.

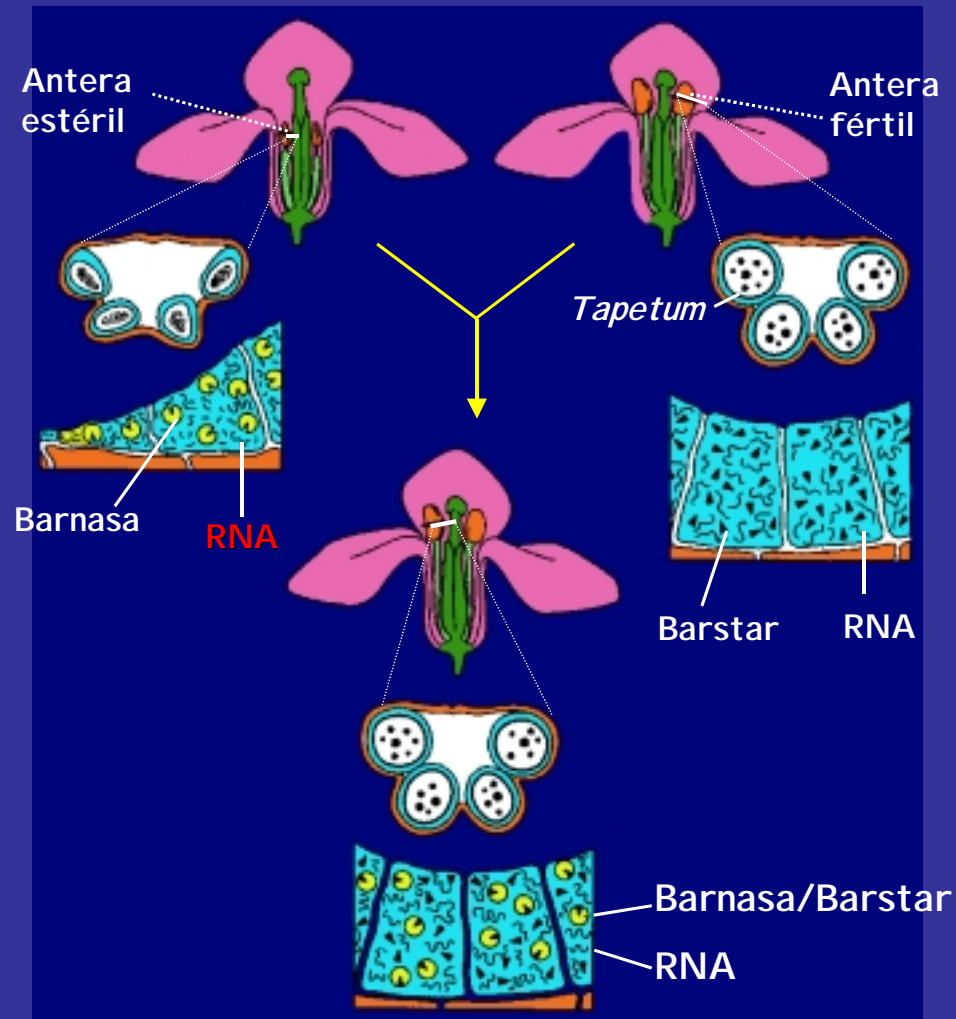


La expresión del gen citotóxico en las células parietales primarias, afectaría la diferenciación de las células esporógenas, contiguas en el territorio del futuro microsporangio.

Sistema TA29-Barnasa/Barstar

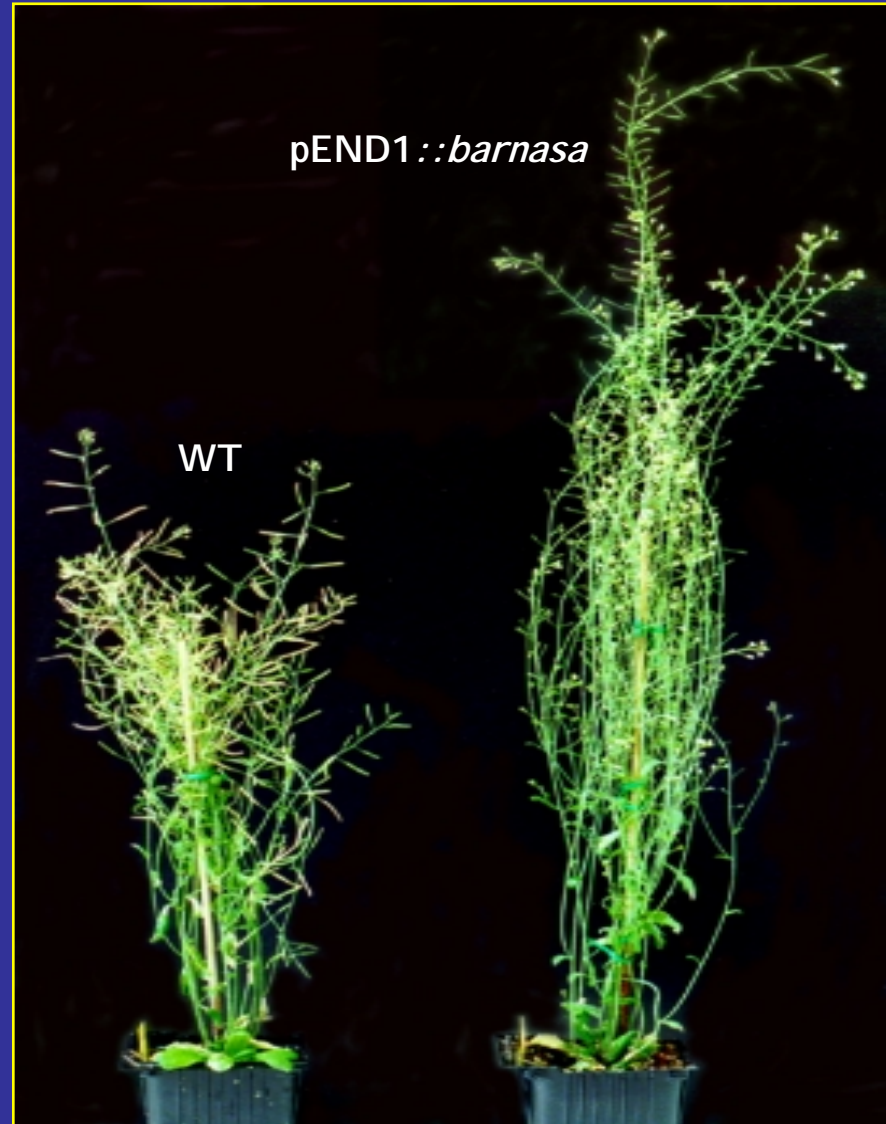
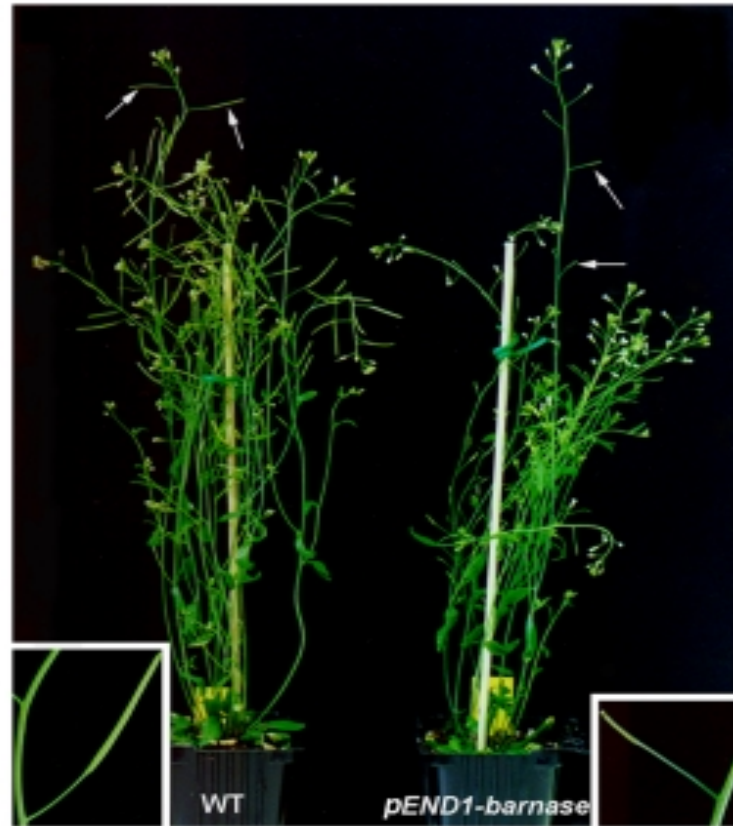
Parental androestéril

Parental fértil



F1 híbrida

Incremento de la floración y del tamaño de la planta en plantas androestériles de *Arabidopsis*

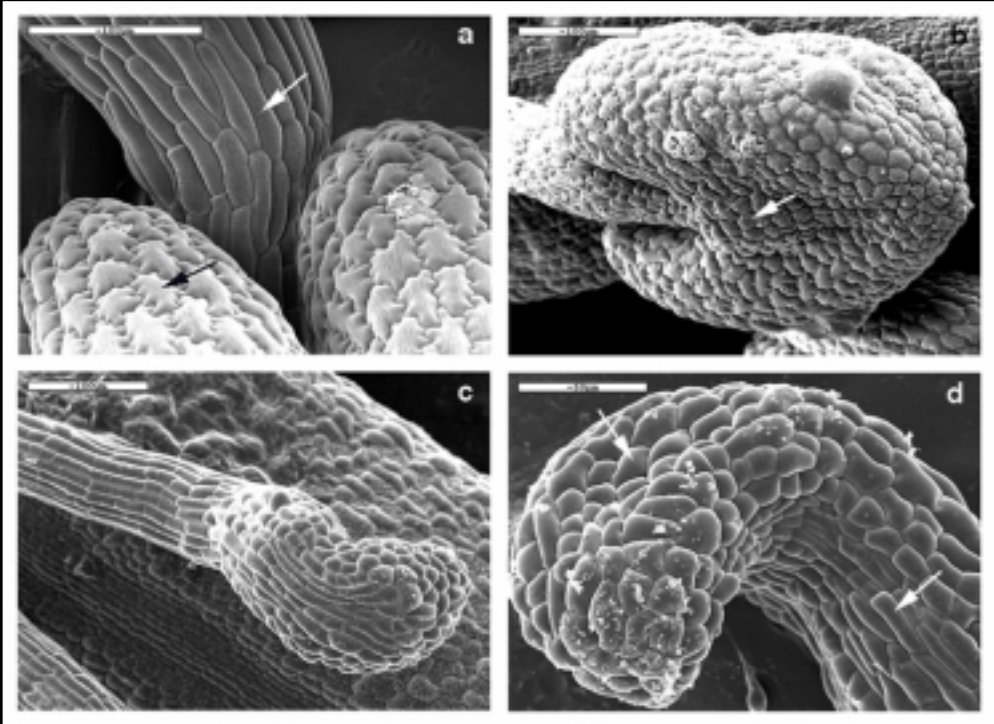
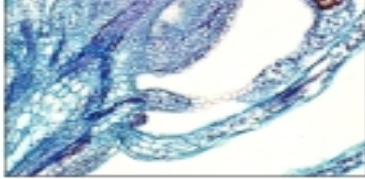
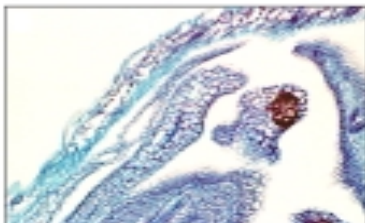




pEND1::*barnasa* en *Arabidopsis thaliana*

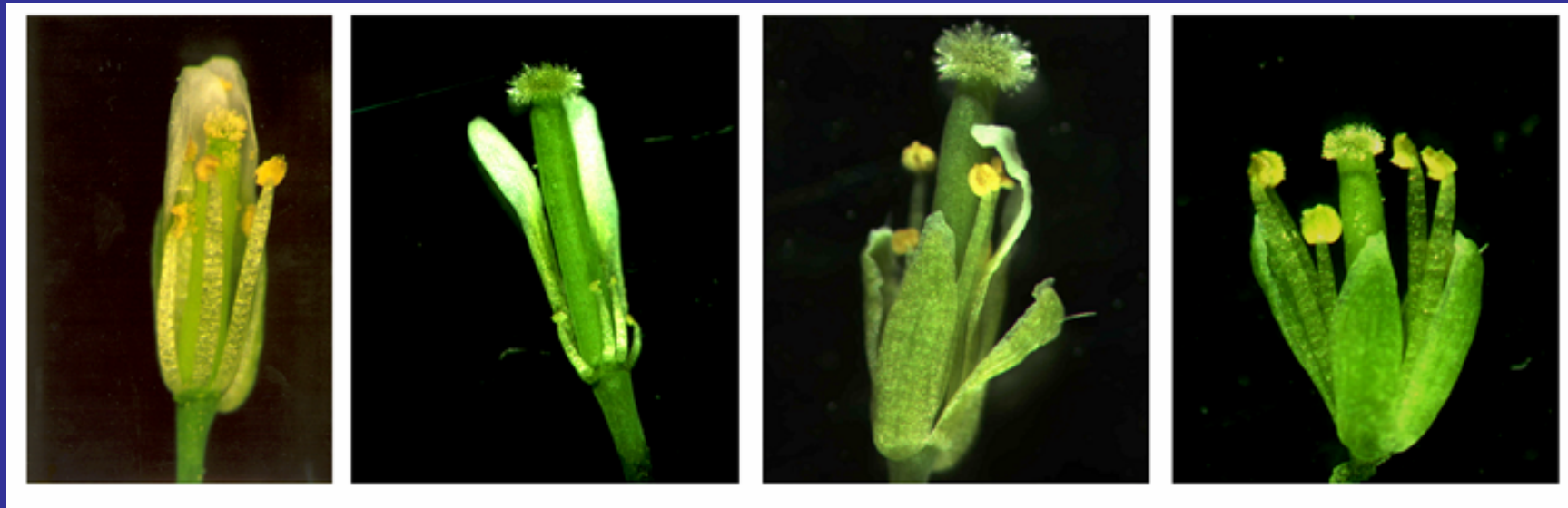


WT



pEND1::*barnasa*

Restauración de la fertilidad mediante cruzamiento con plantas transgénicas pEND1::*barstar*



WT

pEND1::*barnasa*

pEND1:: *barnasa* / pEND1::*barstar*

Patente internacional P200000814 CSIC-NewBiotechnic
PCT/ESO/1/00127

pEND1::*barnasa* en *Nicotiana tabacum*

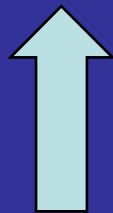


pEND1::*barnasa* en *Nicotiana tabacum*



WT

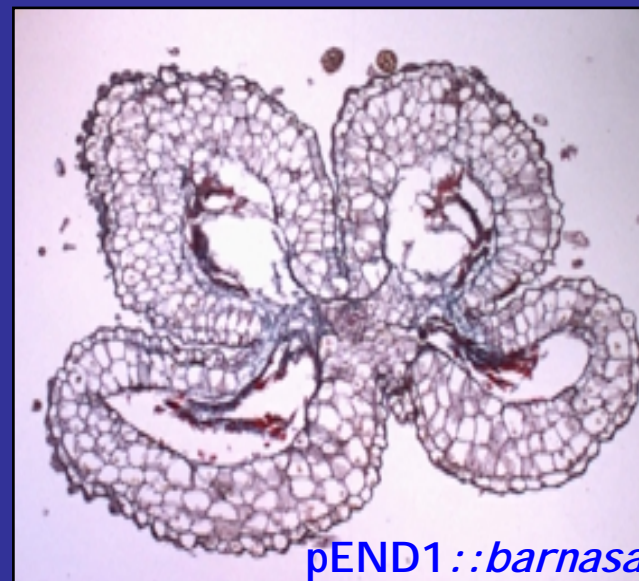
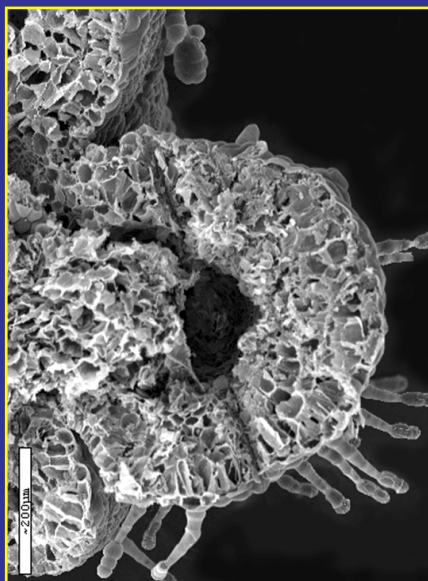
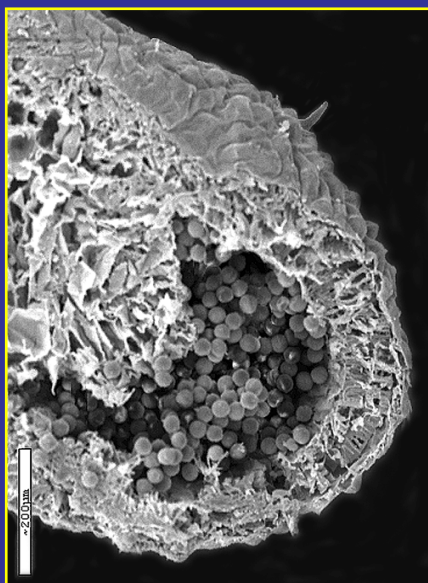
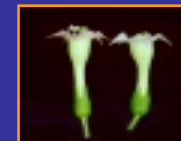
Fenotipos de anteras



pEND1::*barnasa*



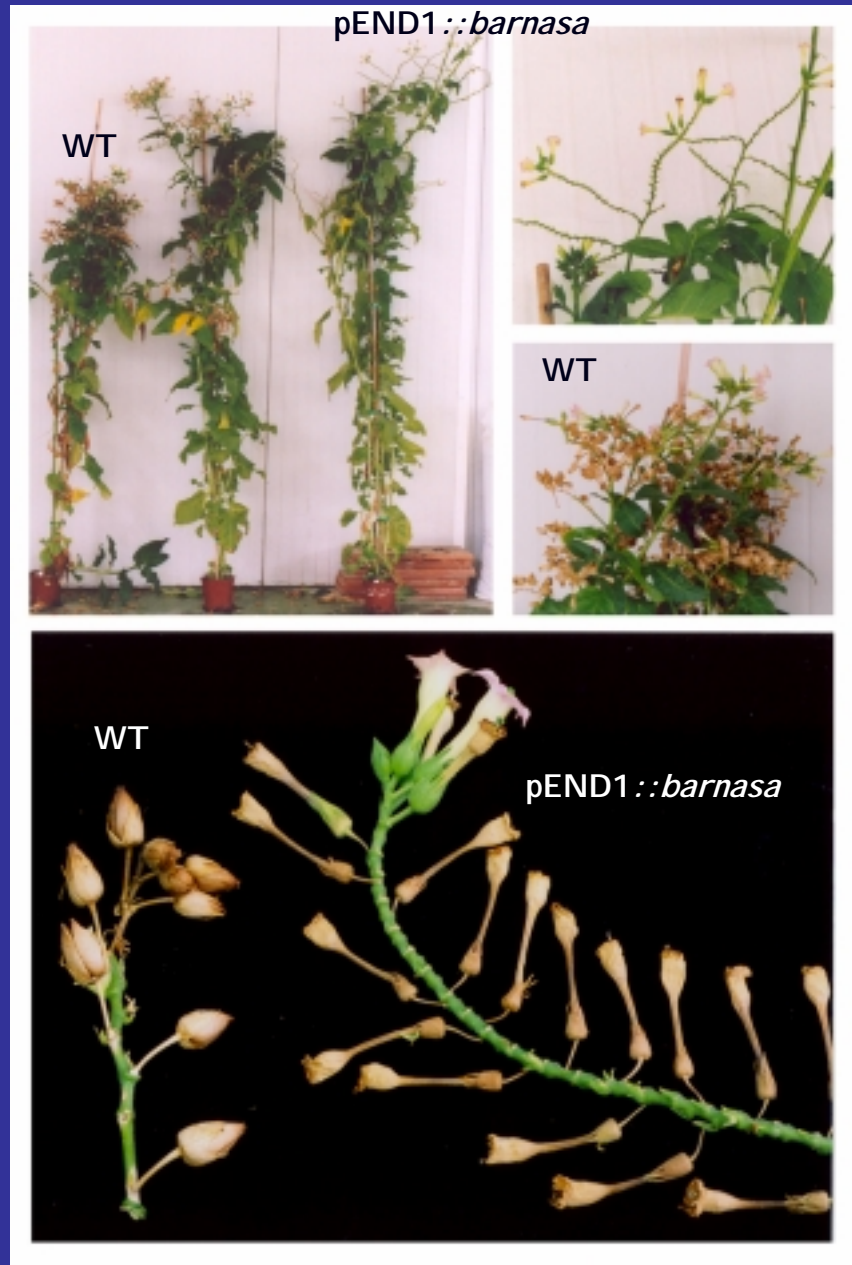
pEND1::*barnasa* en *Nicotiana tabacum*



Las plantas transgénicas pEND1::*barnasa* continúan floreciendo al no fructificar

Hipótesis:

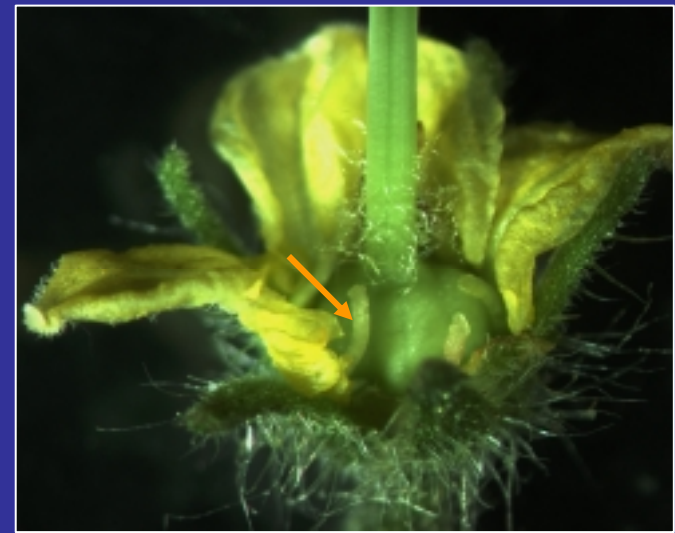
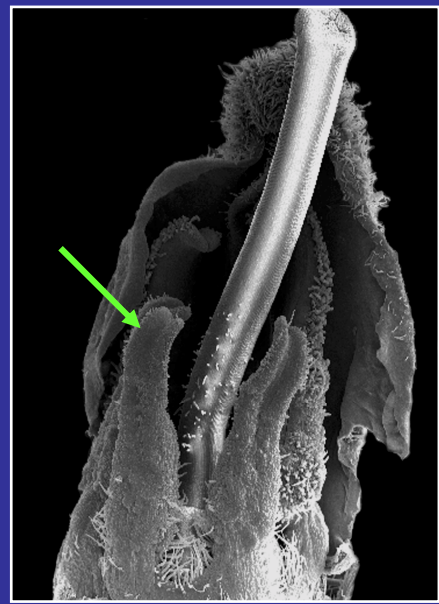
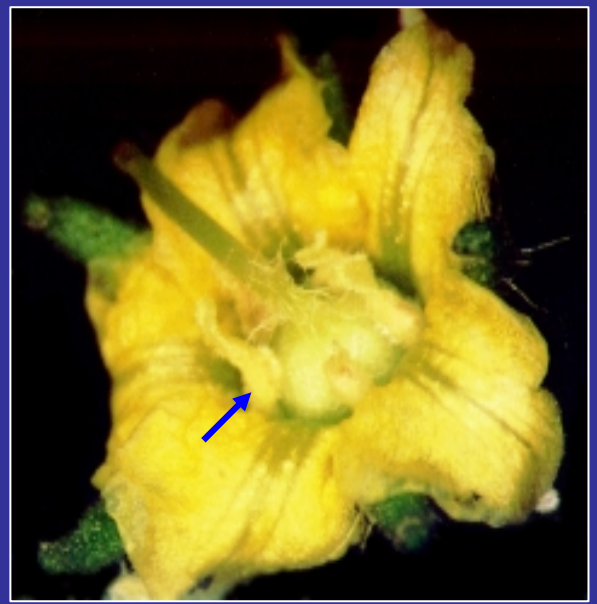
Al no desviarse el consumo de sacarosa hacia la formación de frutos, continúa su aporte a los meristemas inflorescentes, los cuales siguen produciendo flores de forma continuada



pEND1::*barnasa* en tomate

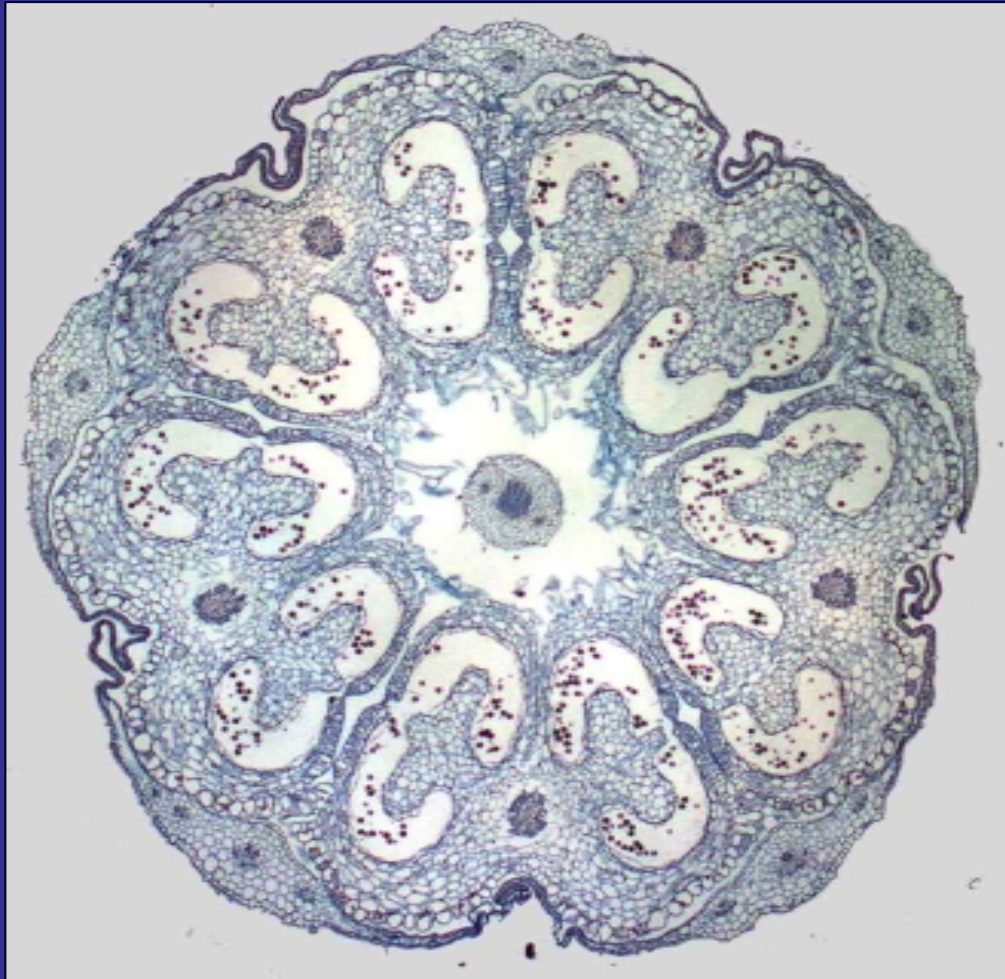


Microton

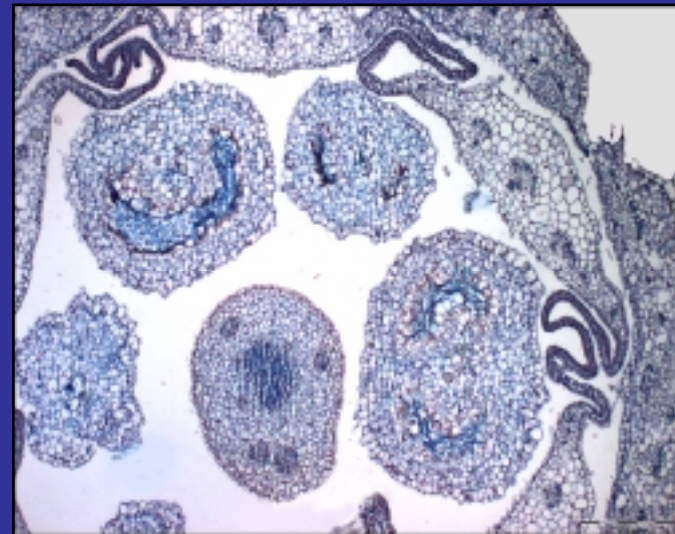


pEND1::*barnasa*

pEND1::*barnasa* en tomate (**Microton**)
Estudios histológicos

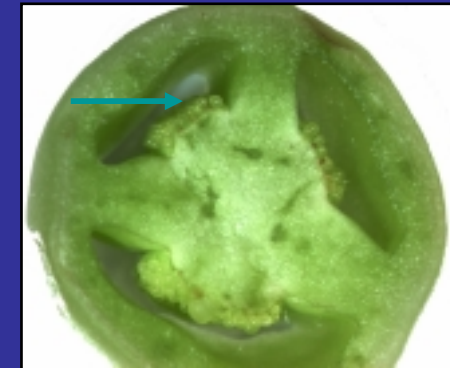
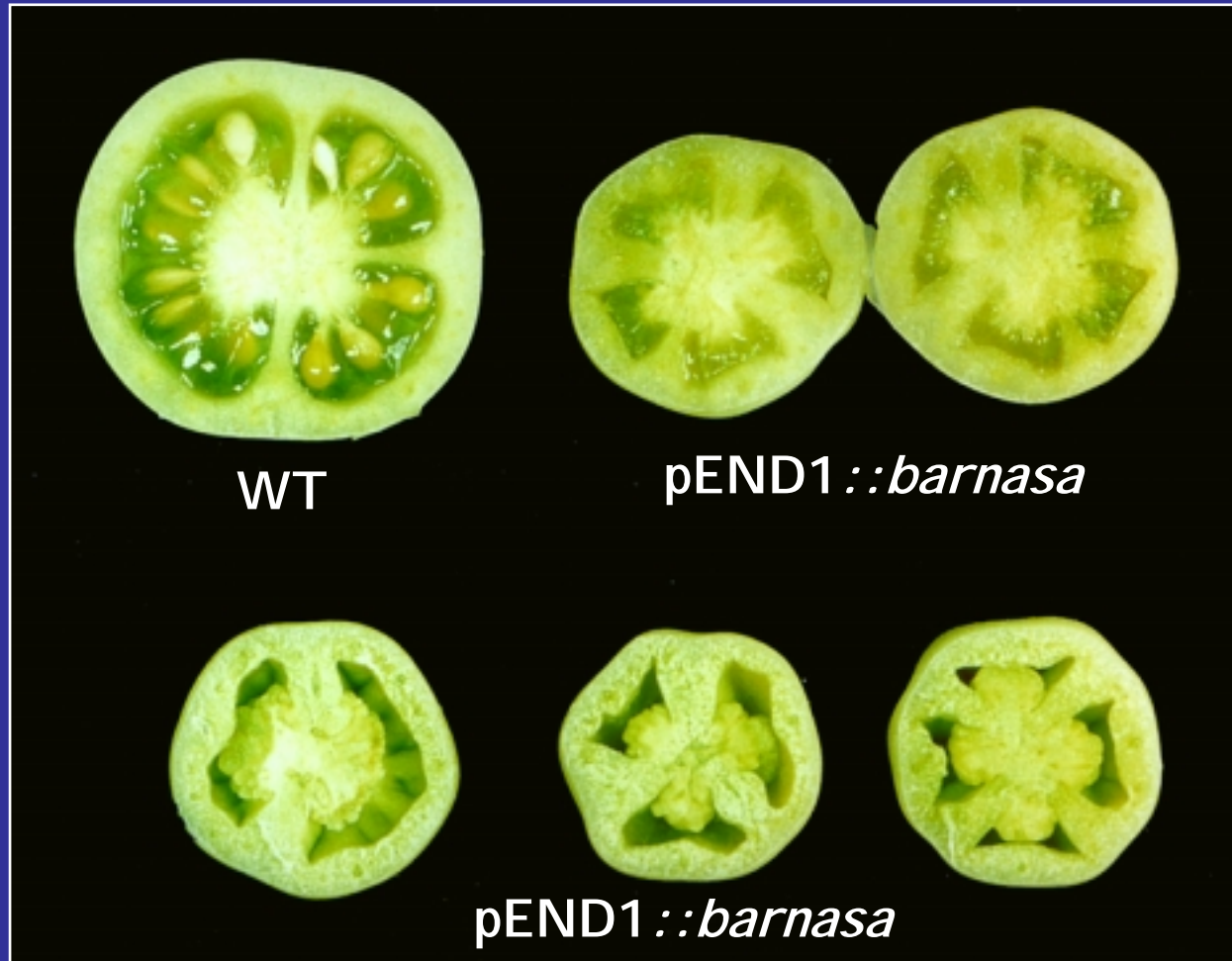


WT



pEND1::*barnasa*

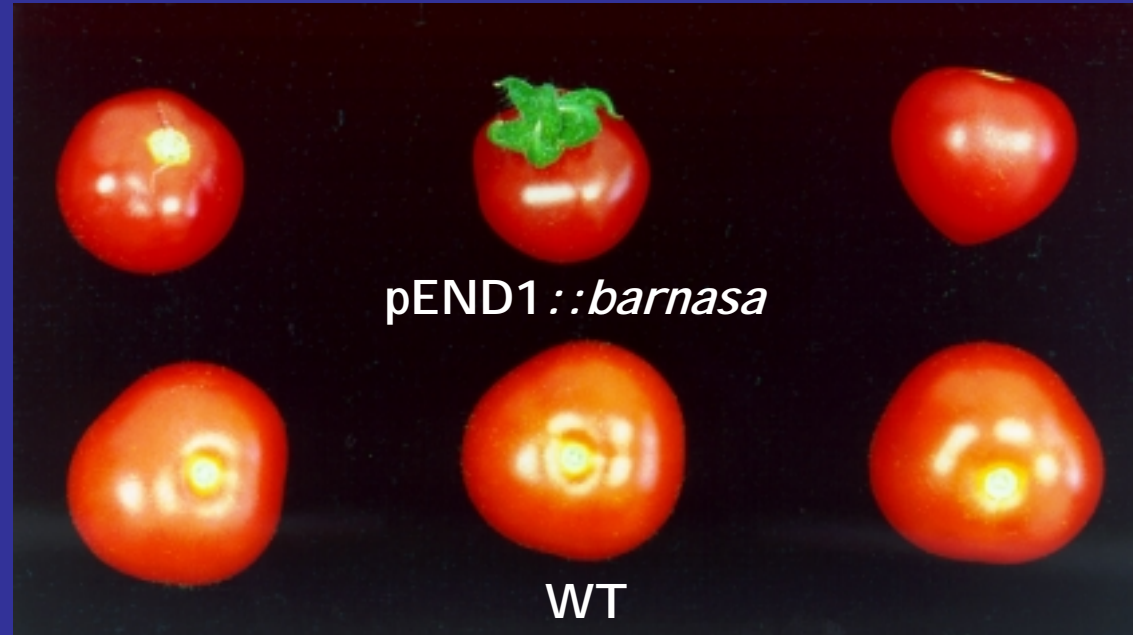
La ausencia del tercer verticilo produce la inducción de frutos partenocárpicos (sin semillas) en tomates *pEND1::barnasa*



La maduración de los tomates partenocárpicos es normal y al final muestran pulpa en su interior pero no semillas



Patente P200401761
CSIC-NewBiotechnic
PCT trámite.





Transgénicas de colza androestéril con pEND1::*barnasa*

WT

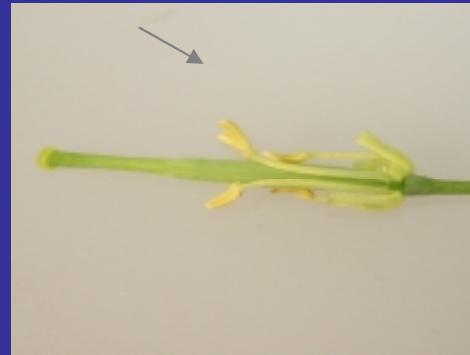
F1

F2

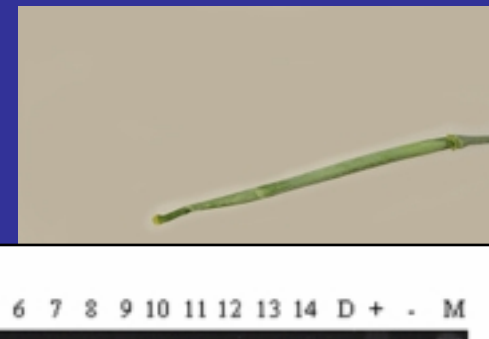
Flores



Anteras



Frutos



Centrum Grüne Gentechnik DLR Germany

WT: anteras desarrolladas, producción de polen viable. Fruto normal con semillas.

F1: anteras desarrolladas, estambres reducidos, no se produce polen viable. Sin fruto.

F2: anteras con desarrollo incompleto, estambres muy reducidos, no se produce polen viable. Sin fruto.

ESTUDIOS DE FUNCIONALIDAD DEL PROMOTOR DE
END1 EN OTRAS ESPECIES DE INTERES AGRONOMICO

El promotor END1 parece ser funcional tanto en especies dicotiledóneas como en monocotiledóneas

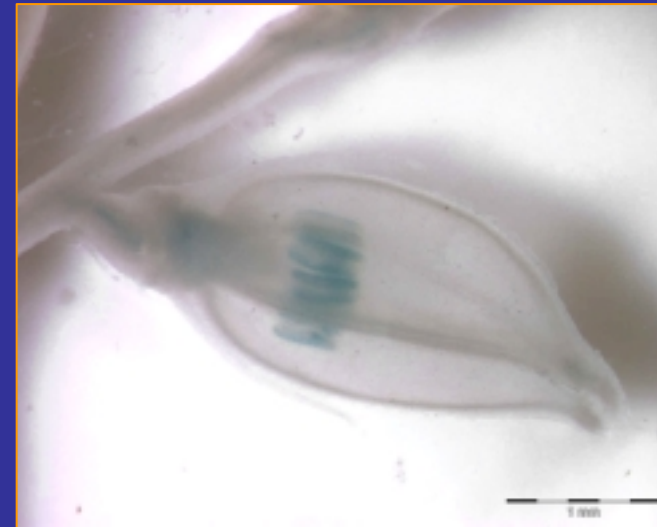
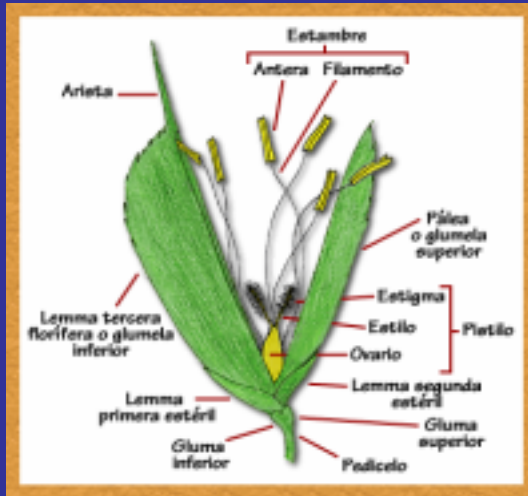
Ensayos de funcionalidad en arroz (*Oryza sativa*)

pCAMBIA (pEND1::uidA)

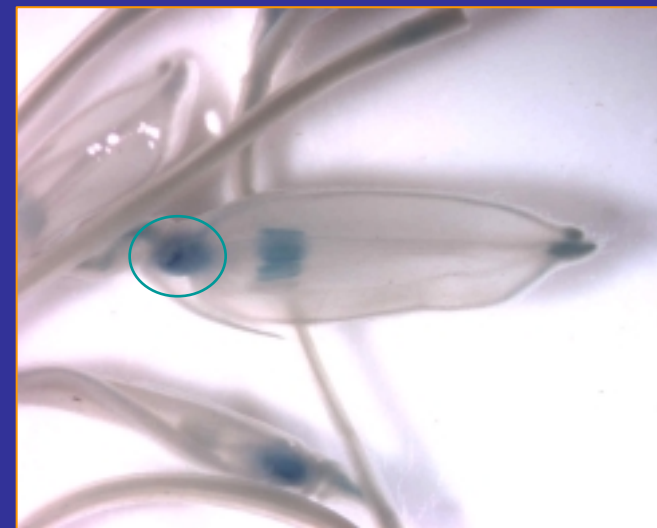
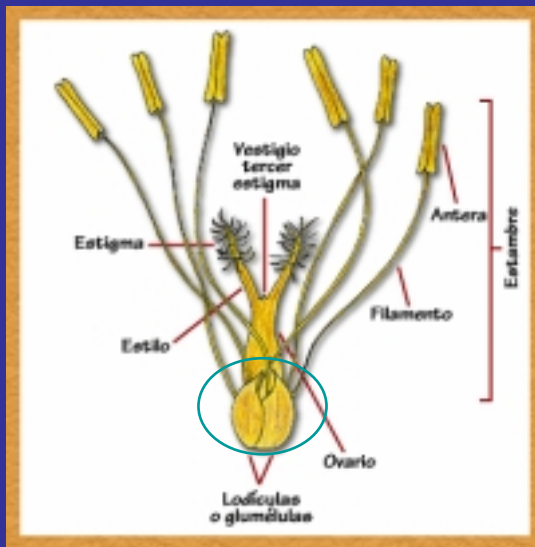


Colaboración IBMCP/NBT/IRTA (Quima Messeguer)

pEND1::*uidA* es también funcional en **Arroz (*Oryza sativa*)**



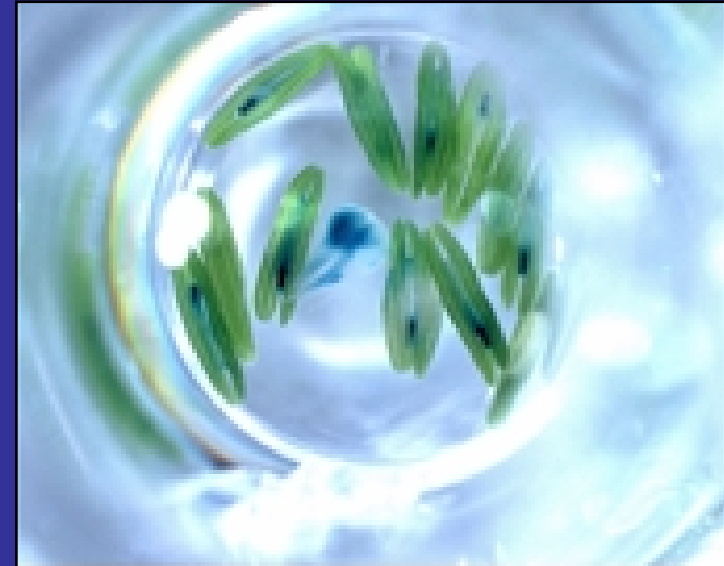
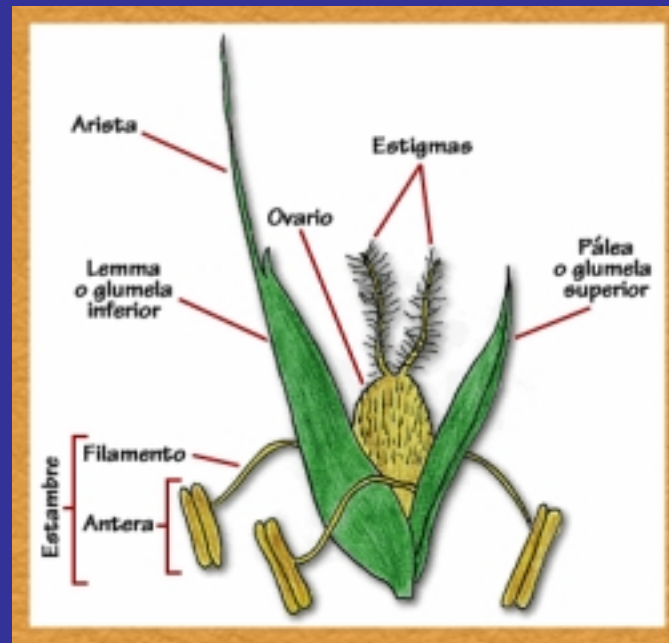
GUS



El pEND1 es también funcional en **trigo** (*Triticum aestivum*)

Resultados preliminares indican que se expresa en las anteras de la flor

Sólo se han analizado anteras en estadios tardíos de desarrollo, localizándose la expresión en el tejido conectivo como era esperable



pEND1::GUS

Colaboración Francisco Barros del IAS de Córdoba - NBT

POSIBLES APLICACIONES DEL PROMOTOR DEL GEN *END1*

- Producción de plantas androestériles para la obtención de híbridos de interés agronómico en cultivos derivados de mono y dicotiledóneas.
- Para dirigir la expresión de sustancias protectoras del polen frente a estrés hídrico o térmico.
- Para evitar la transferencia horizontal de genes no deseada.
- Para producir frutos partenocárpicos en cvs. de tomate.
- Para aumentar la producción de flores.
- Para dirigir el desarrollo de las plantas a la producción de partes vegetativas

VENTAJAS DE LA BIOTECNOLOGIA VEGETAL



-Modificación puntual y específica de un determinado caracter, sin barreras sexuales y usando genes de distinta procedencia.

- Dianas de mejora: hacia una agricultura más limpia y eficiente

Tolerancia o resistencia a estreses bióticos y abióticos

Productividad

Composición nutricional, conservación y procesado

Producción de compuestos de interés industrial, farmacológico o médico.

ASPECTOS CONTROVERTIDOS

- Actualmente se dispone de pocos genes con interés agronómico real: sistemas modelo

- Genes marcadores: resistencias a antibióticos, herbicidas, etc.: moratoria

- Impacto medioambiental: contaminación polen, biodiversidad,

- Aceptación social: ¿ventajas para el consumidor?

- Patentes en poder de grandes empresas multinacionales de semillas



GENES MARCADORES : ¿ GUS o GFP ?

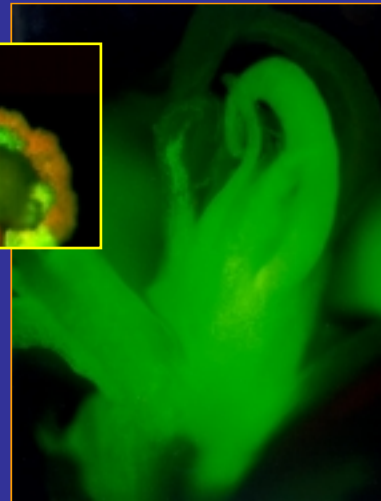
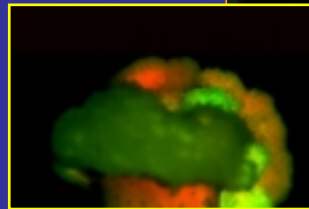
GUS



Método **invasivo**

Necesidad de reactivos para visualizar

Necesario uso del GUS-intrón (*uidA*) para evitar artefactos



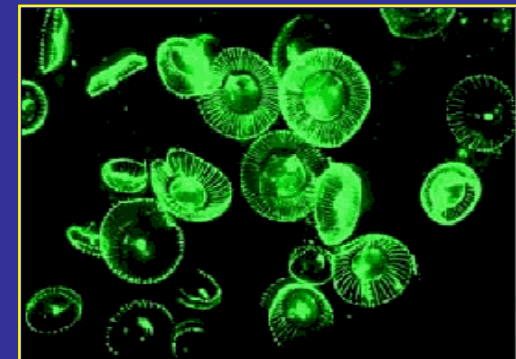
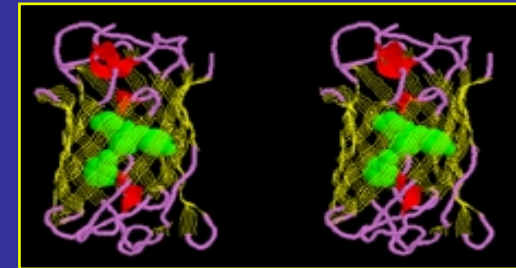
GFP

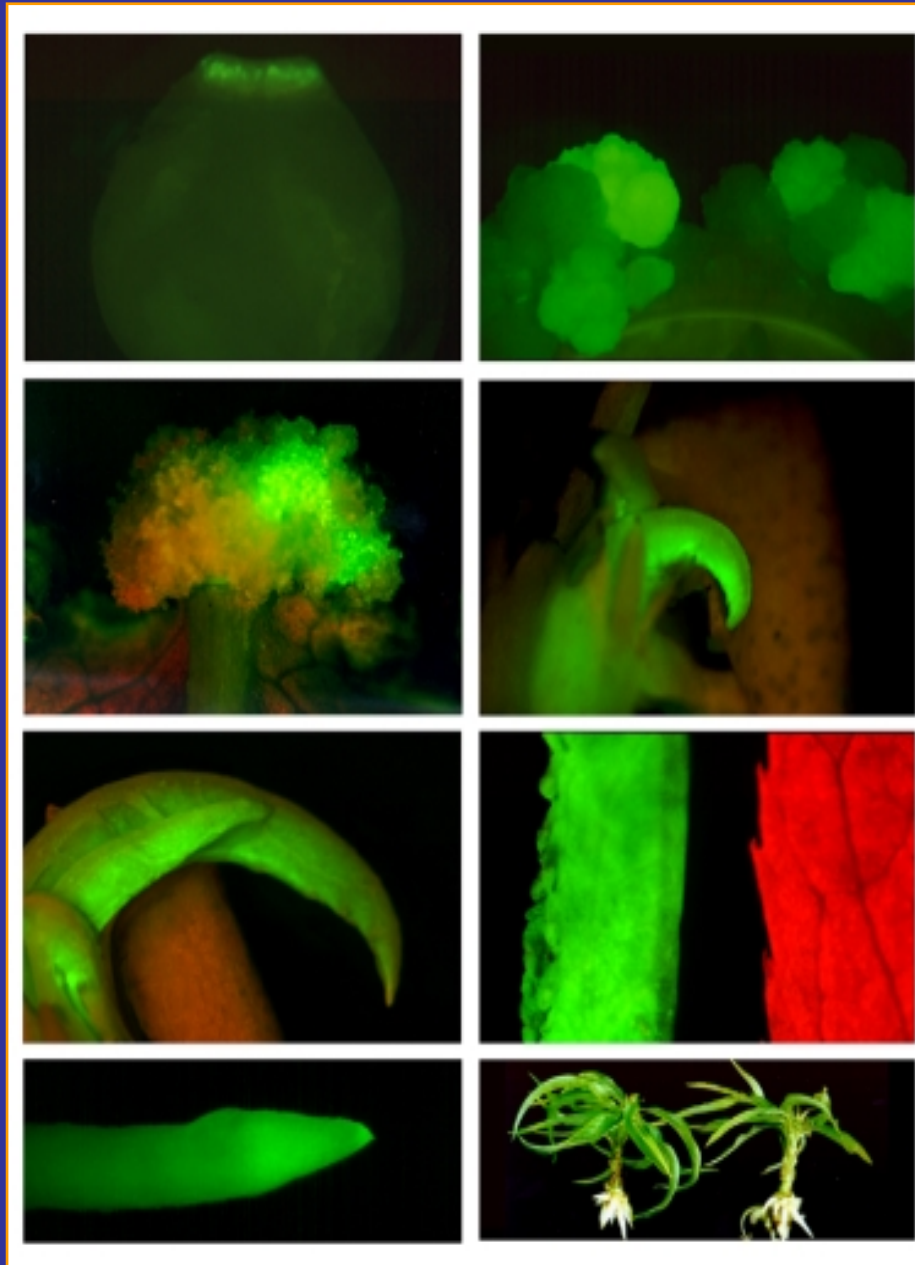
Proteína de 238 aas aislada de la medusa bioluminiscente *Aequorea victoria*

Se puede expresar sin cofactores adicionales en cualquier organismo

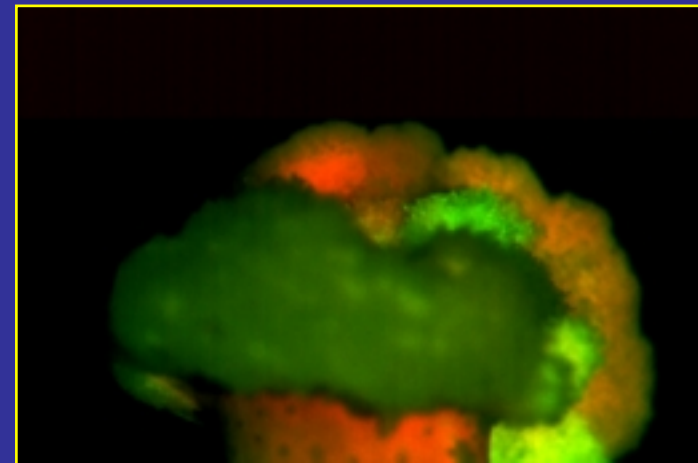
Su expresión en plantas transgénicas permite seleccionar los transformantes directamente en el cultivo *in vitro* (método **no invasivo**)

Alternativa al uso de resistencias a antibióticos





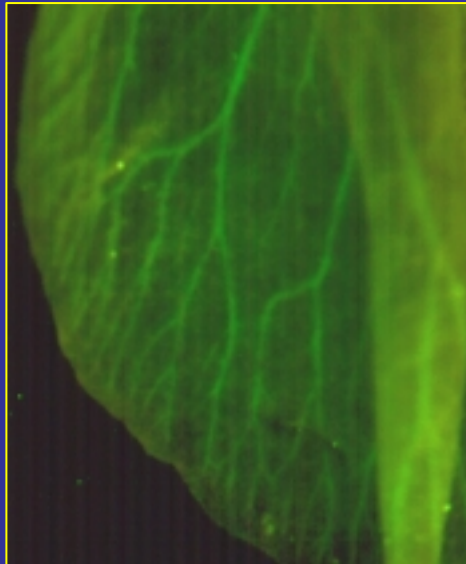
CaMV35S :: *sgfp*



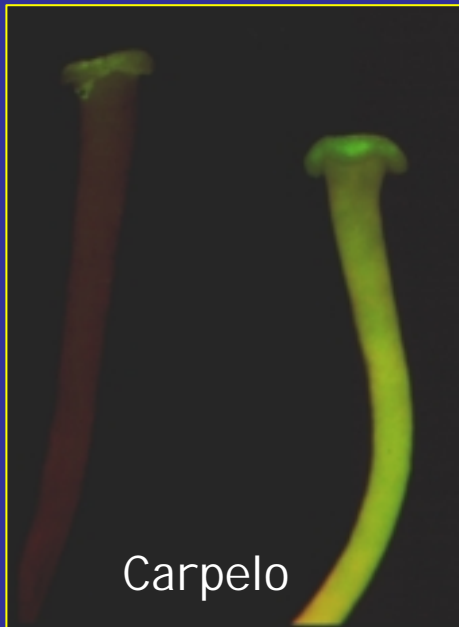
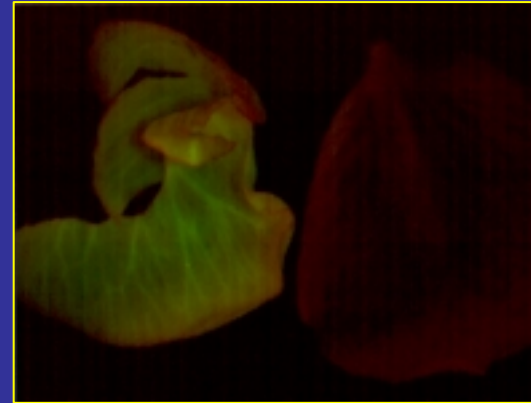
Molecular Breeding 14: 419-427 (2004)

Trabajo financiado por COTEVISA

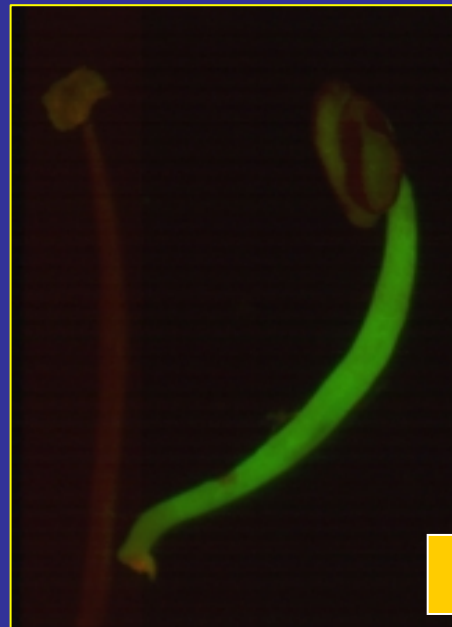
Organos florales de plantas de
melocotonero *35S::sgfp*



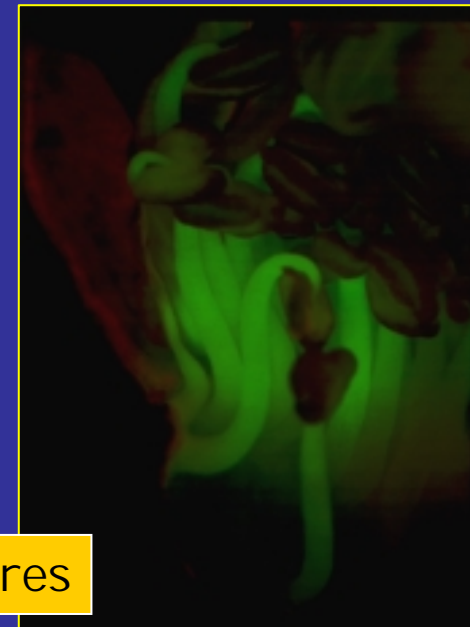
Pétalos



Carpelo



Estambres



- La historia de la **mejora genética** de las plantas cultivadas es la historia de la **agricultura**.

- La historia de la **agricultura** es la historia de la **modificación genética** de las plantas cultivadas.

- Toda planta cultivada es un organismo modificado genéticamente (**OMG**).

- La ingeniería genética permite modificar en un solo gen el patrimonio genético de una variedad de cultivo obtenida por técnicas de mejora tradicionales. Las variedades así obtenidas se denominan **transgénicas**.

BIOTECNOLOGIA

Ingeniería genética de plantas



Posibilidad de modificar puntualmente caracteres de interés agronómico sin afectar a otros

Es necesario:

1. Desarrollar métodos para la identificación y aislamiento de los genes que afectan al carácter a manipular
2. Disponer de tecnologías para modificar e introducir dichos genes en la planta (transformación genética, cultivo *in vitro*)
3. Deseables conocimientos previos a nivel genético, bioquímico y fisiológico de la planta

2004: 800 millones de personas pasan hambre o sufren malnutrición mientras más de 800 millones son obesas y sufren diabetes o enfermedades cardiovasculares derivadas de un exceso o de una incorrecta alimentación.

Población mundial en el año 2000: 6000 millones

Población mundial estimada para el 2050: 9000 millones

El 90% residirá en Asia, Africa y Sudamérica

Agricultura sostenible

¿Agricultura industrializada?

¿Agricultura ecológica?

*Cultivos transgénicos
81 millones Has. 2004
8 millones agricultores
17 países*

¿Agricultura de subsistencia?



IBMCP