

Transformación genética de cedro rojo



Seminario CIBIOGEM
Febrero de 2014

Yuri Peña
Ecosur Campeche
Departamento de Ciencias de la sustentabilidad

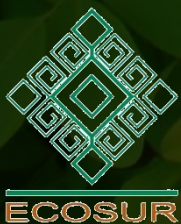
Créditos

Investigadores:

Dra. Luisa López Ochoa (CICY)
Dr. José Antonio González (ITSA)
Dr. Manuel Robert (CICY)
Dr Yuri Peña (ITSA / ECOSUR)

Estudiantes:

M en C Max Apolinar	M en C Juan Juárez
IBQ Ángel Hernández	IBQ Lucero Gómez
IBQ Alfredo Domínguez	IBQ René López
IBQ. Oscar Gómez	IBQ Israel García



Contenido

- El modelo de estudio
 - Problemática
- El contexto de un OGM en un ambiente forestal tropical
- Diseño de una estrategia adecuada
- Requisitos previos
 - El sistema de regeneración
 - El sistema de transferencia de genes
 - El constructo
- En donde estamos y hacia donde vamos

I El modelo de estudio

ECOSUR



ECOSUR

Cedro rojo

Cedro español, cedro
amargo

Cedrela odorata L.

Eudicotyledons;
Gunneridae; Pentapetales;
rosids; malvids;
Sapindales; Meliaceae.



Distribución natural de *Cedrela odorata*



Importancia de *Cedrela odorata*

- Ecológica
- Producto forestal maderable

ECOSUR



ECOSUR

- Especie ícono de la forestería tropical
- “Madera preciosa” con valor 10 veces superior a madera de *Pinus sp.* (1000-1200 US\$ m³) (Madera en rollo).
- Uso en la construcción y en la fabricación de muebles, instrumentos musicales, balsas.
- Madera resistente a la pudrición
- Mercado potencial: > US\$ 6000 MD / año (ITTO, 2013)



ECOSUR



Especie amenazada (Lista roja IUCN), pérdida del recurso genético, cambio de uso de suelo, impacto social.



ECOSUR

Regeneración: Plantaciones comerciales

(Bosques plantados)



ECCO

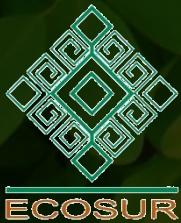


ECOSUR

Bosques naturales vs plantaciones forestales



ECOSUR



Problemática

ECOSUR



ECOSUR

Problemas fitosanitarios: Plagas



ECOSUR

Problemática: Fitosanidad.

Hypsipyla grandella (Lepidoptera : Pyralidae)



La larva se alimenta del meristemo apical rompiendo la dominancia

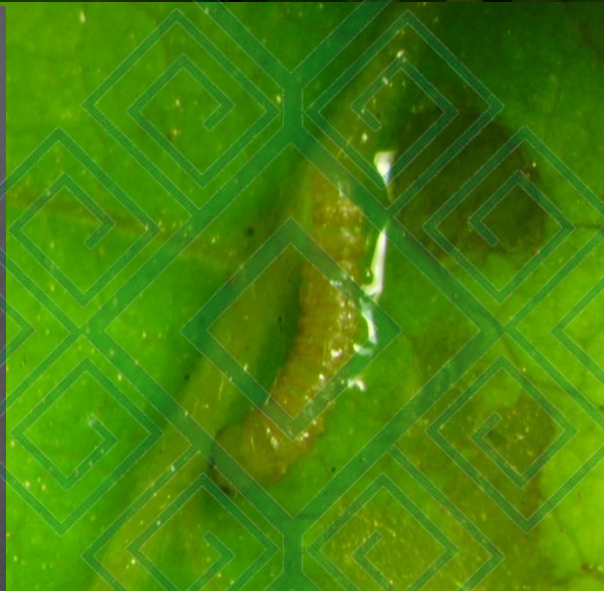
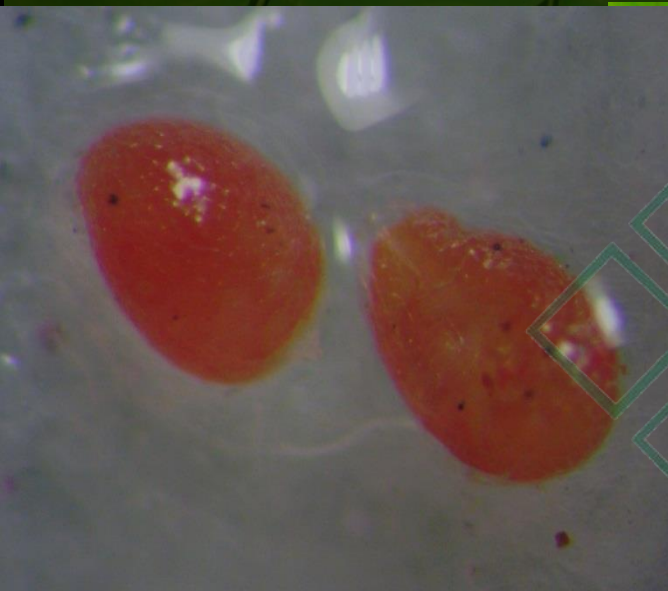
El árbol responde emitiendo ramas laterales

Se deforma el fuste

Pérdida del valor como producto forestal maderable

Una sola hembra puede ovipositar en el 100% de plantas de una Ha en una sola noche

Ciclo de vida de *H. grandella*



ECOSUR

Dificultades operativas para el control de la plaga



Control del barrenador de las meliáceas

- Control químico
- Selección de variedades “resistentes”
- Control manual / manejo forestal
- Empleo de bioinsecticidas (Toxinas BT)
- Uso de modificaciones genéticas



ECOSUR

Control del barrenador de las meliáceas

Extrapolación de resultados de otro pirálido (misma familia)
Ostrinia nubilalis
susceptible a cry (evento MON810)



Control del barrenador de las meliáceas

Bacillus thuringiensis

El gen cry es extraído de la bacteria y transferido al árbol



Las larvas de *Hypsipyla* atacan al árbol silvestre

Las larvas de *Hypsipyla* mueren al alimentarse del árbol transgénico

II El contexto del uso de un OGM en un ambiente forestal

ECOSUR



¿Es posible desarrollar un OGM destinado a un bosque tropical?

Consideraciones técnicas, éticas y de bioseguridad



¿Por qué una estrategia de transgénesis tradicional no es adecuada?

- Estructura y dinámica del genoma de *C. odorata*
- Patentes vigentes en vectores y genes comerciales
- Biocontención
- Expresión del transgén
- Silenciamiento / efectos pleiotropicos y epigenéticos

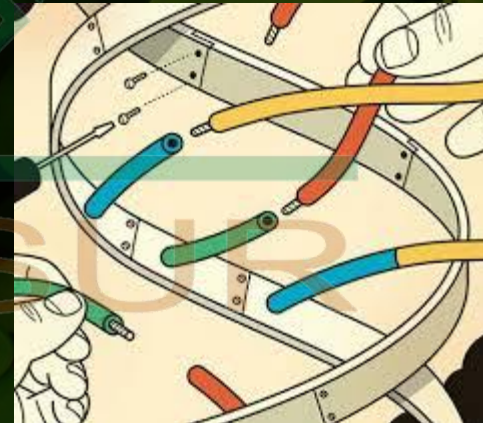
ECOSUR

III Diseño de una estrategia adecuada

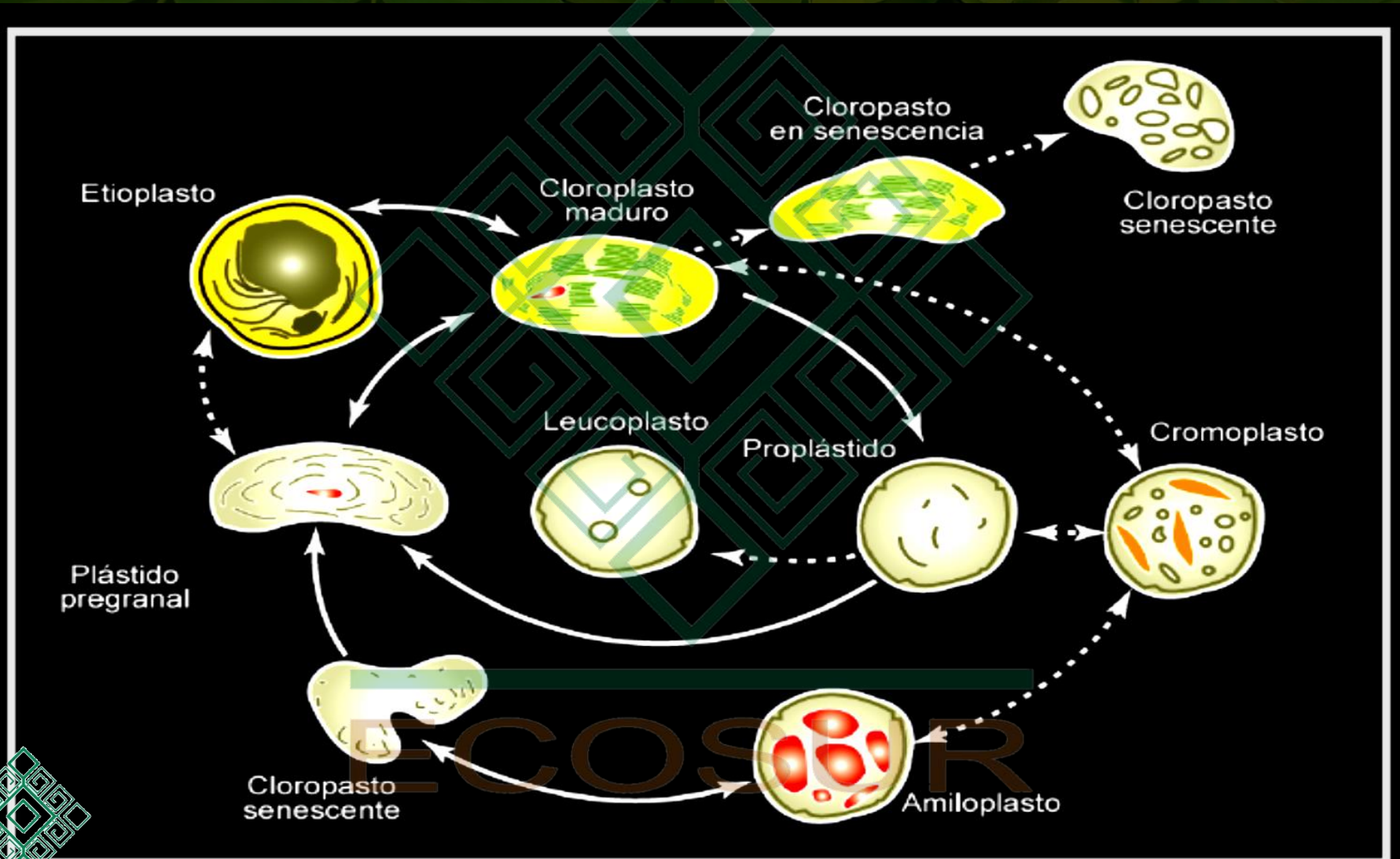
ECOSUR

Empleo de dos herramientas disponibles

- Transformación del genoma plastídico
- Biología sintética



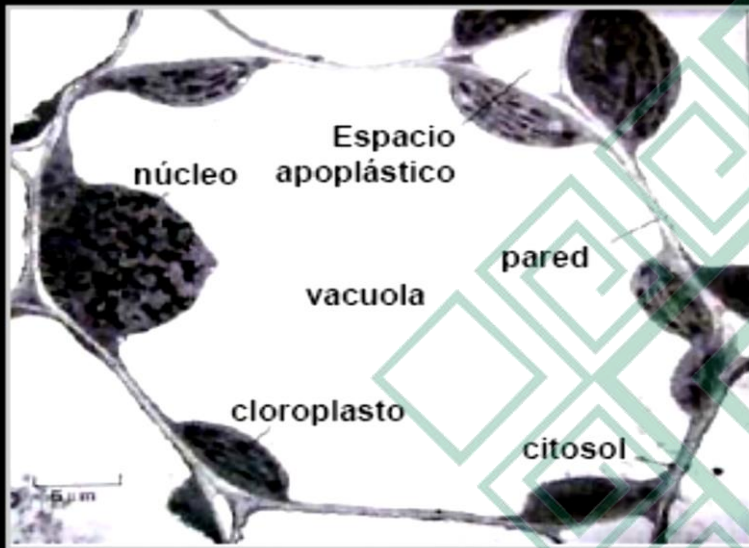
Los plástidos morfogénesis y diferenciación



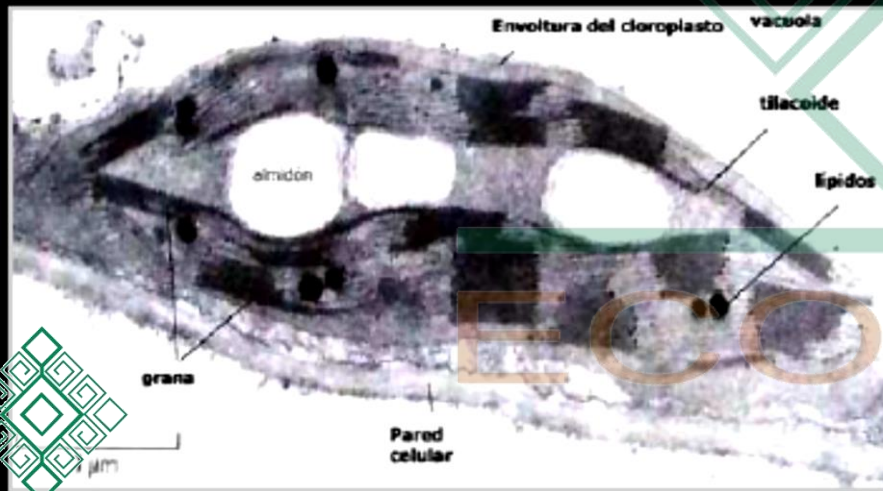
Tomado de: Buchanan *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2001.



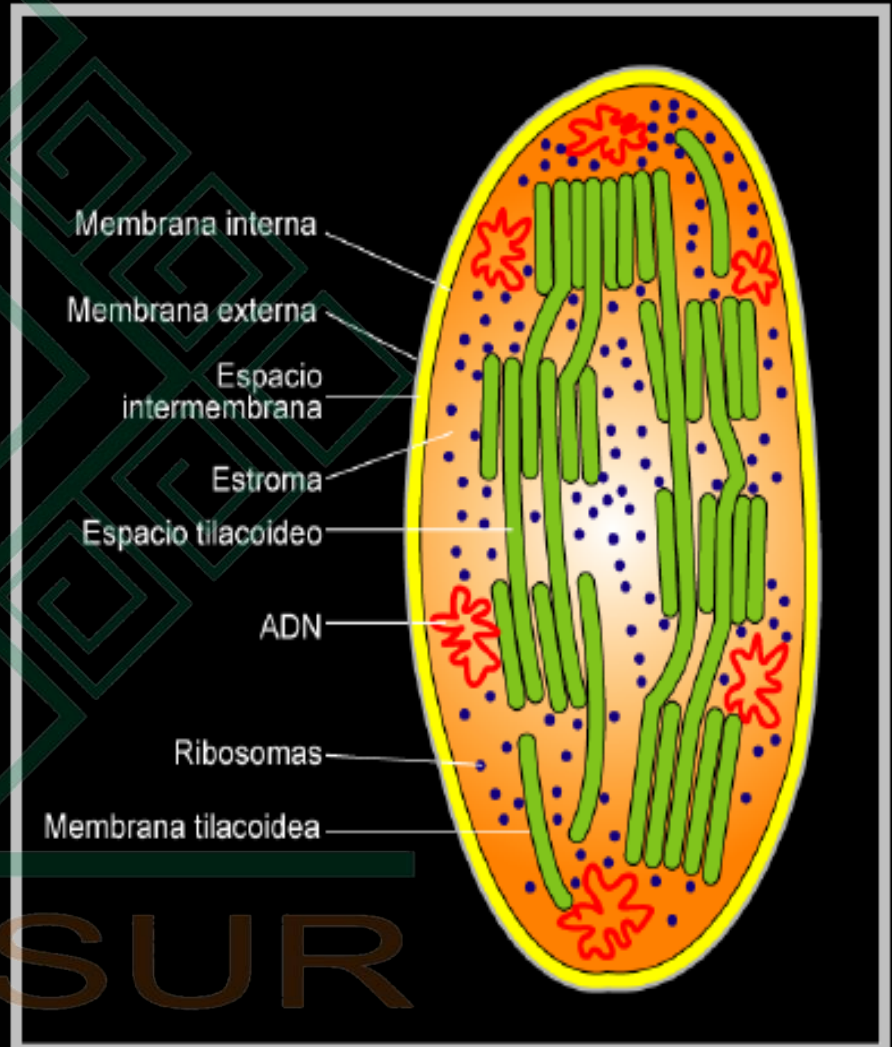
Estructura del cloroplasto



Microscopía de una célula vegetal



Microscopía de un cloroplasto

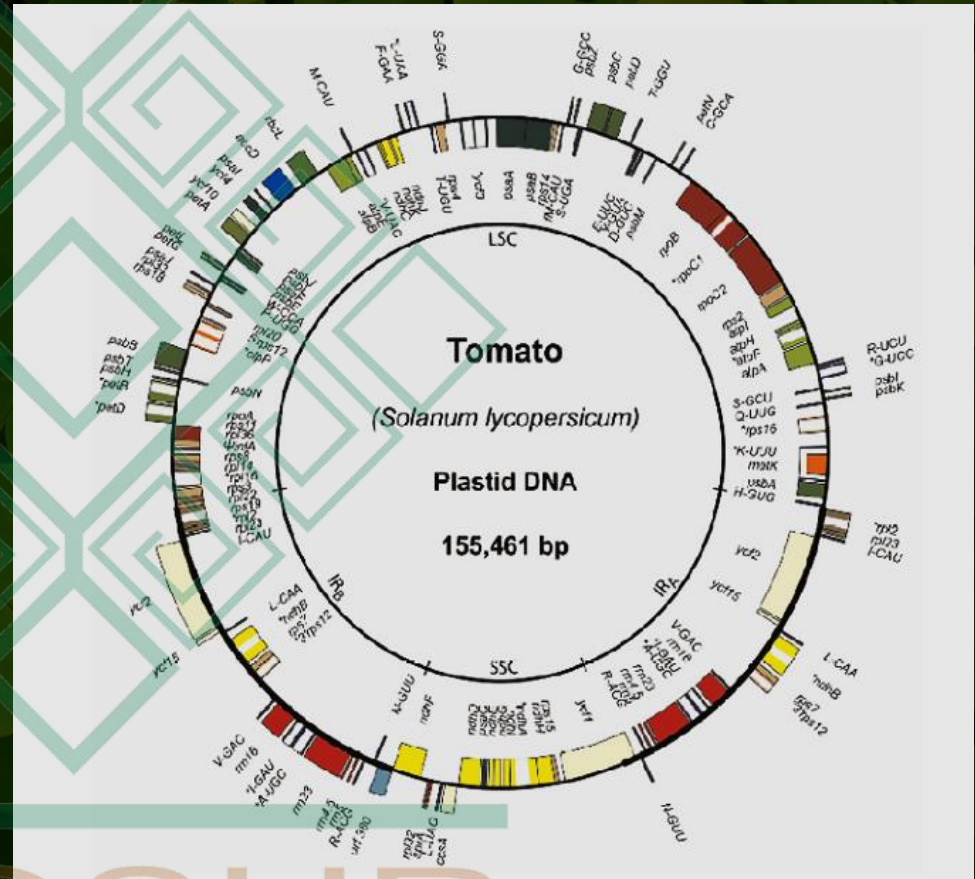


Tomado de: Buchanan *et al.*, *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*, 2001.



Estructura del plastoma en plantas superiores

- DNA circular cerrado
- El tamaño de su genoma es de 120 – 220 Kb.
- Hay 10,000 copias de su genoma en cada célula de la planta.
- Secuencias reportadas relativamente bien conservadas



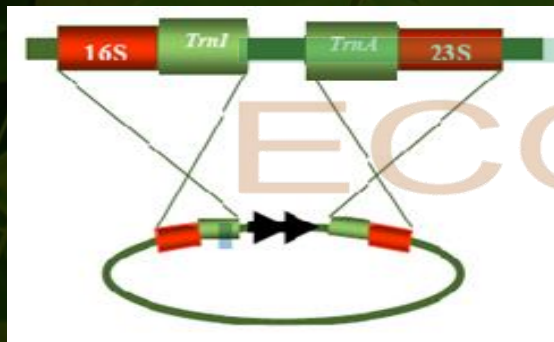
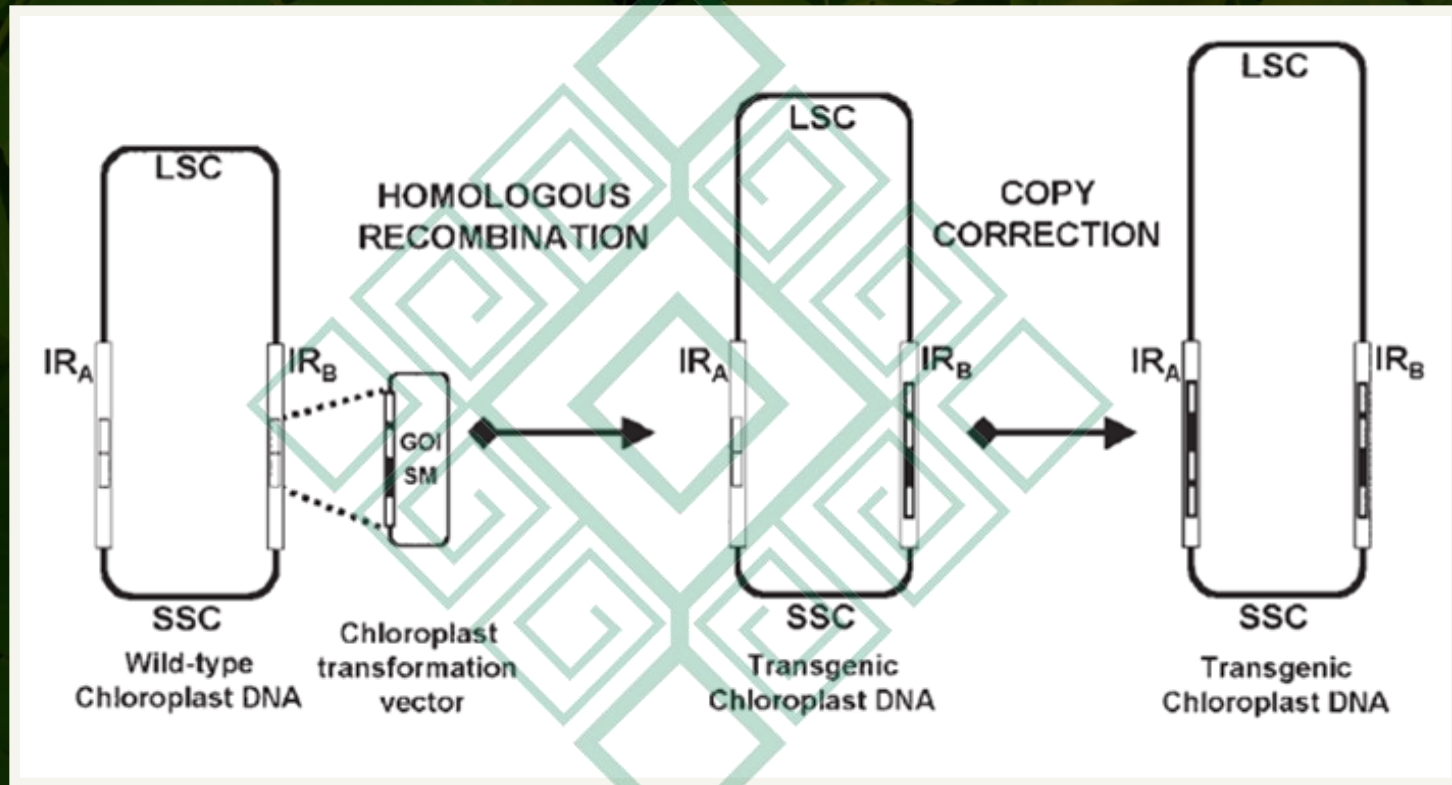
ECOSUR

Comparativo de ambos sistemas de transformación

CLOROPLASTOS VS NÚCLEO		
	PLASTIDICA	NUCLEAR
Número de copias	~ 10, 000/célula	Pocas copias
Niveles de expresión	2- 47%	0.001-0.1%
Genes y expresión	Operones	Unidades de transcripción
Efectos de posición	sitio específico	Inserción al azar
Silenciamiento génico	No se ha reportado	TGS Y PTGS
Flujo génico	Solo semillas	En polen y semillas

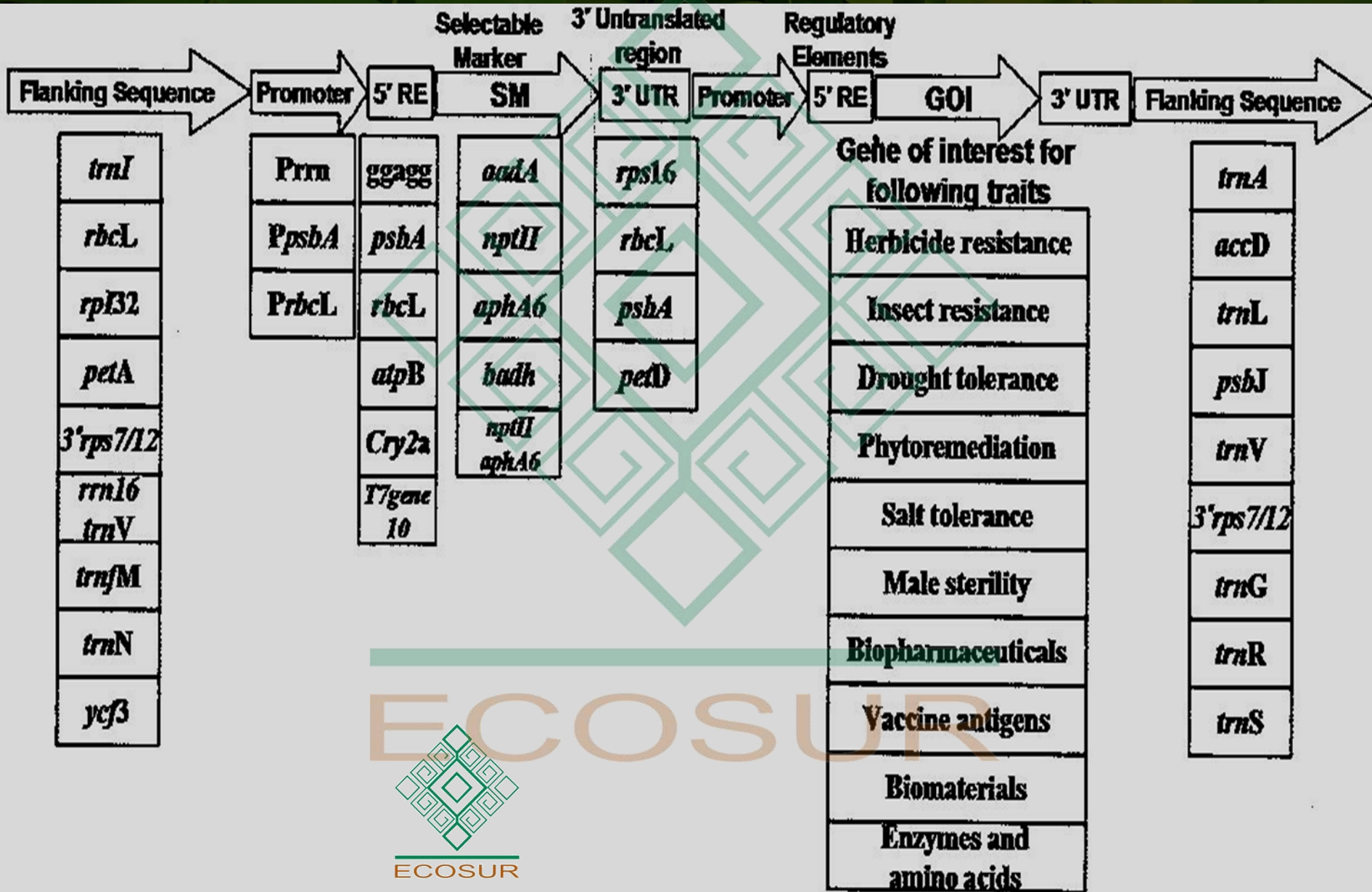
ECOSUR

Transformación del plastoma



Daniel et al 2004

Arquitectura y componentes típicos de un constructo transplastómico



Homoplastía

Bombardeo con partículas de oro
cubiertas con el ADN de interés

50-100 plástidos / célula
50-100 genomas
plástidos/plástido
~10.000 genomas / célula

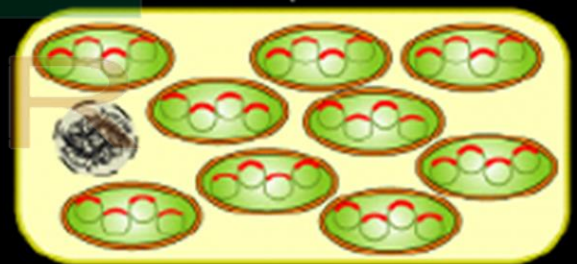
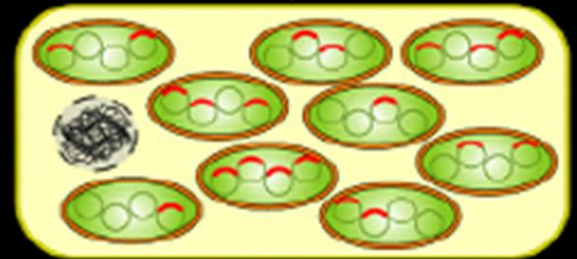
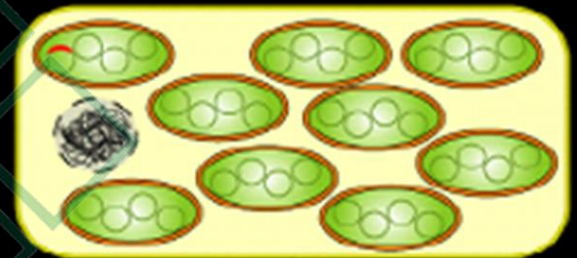
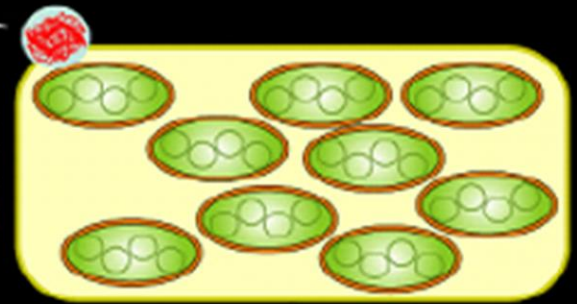
Heteroplastía

Primer evento
de transformación

División de células
y organelas
en condiciones
de selección
(heteroplasma)

Homoplastía

División de células
y organelas
en condiciones
de selección
(homoplasma)



IV Requisitos previos

ECOSUR

Elementos básicos para la transformación genética:

1. Un sistema de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas y fértiles.
2. Un protocolo de transformación (sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado).
3. Herramientas de análisis para detectar la presencia del transgén y los productos del mismo en la planta.
4. Vectores apropiados, que permitan el clonado del gen de interés y/o su transferencia al tejido blanco de transformación.

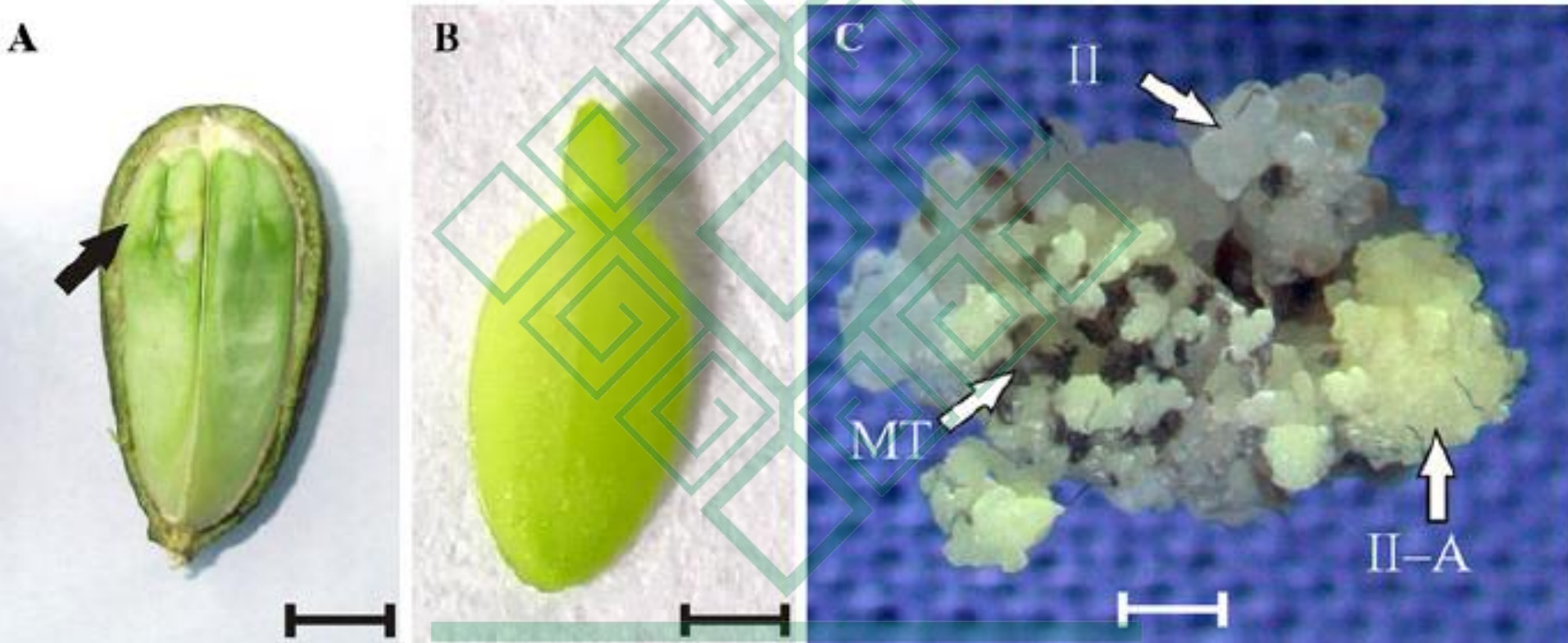


Sistema de regeneración empleando CTV

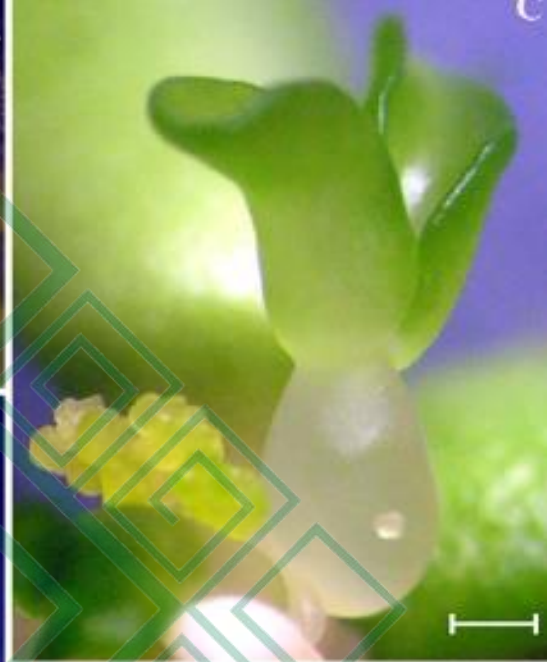
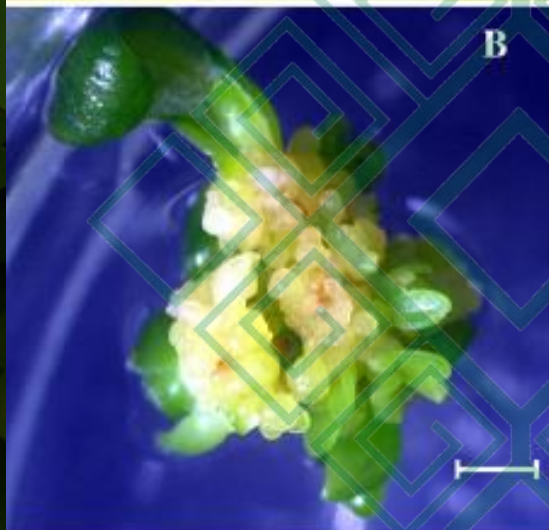
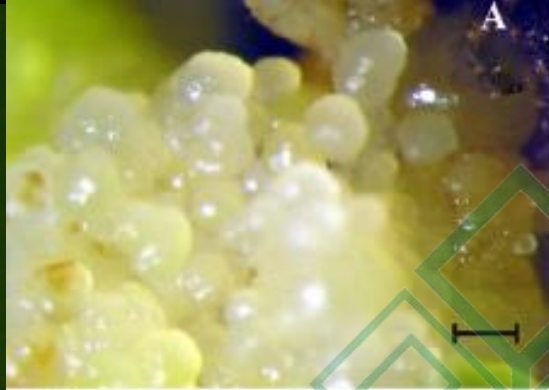
ECOSUR



Protocolo de regeneración de *C. odorata* empleando embriogénesis somática repetitiva

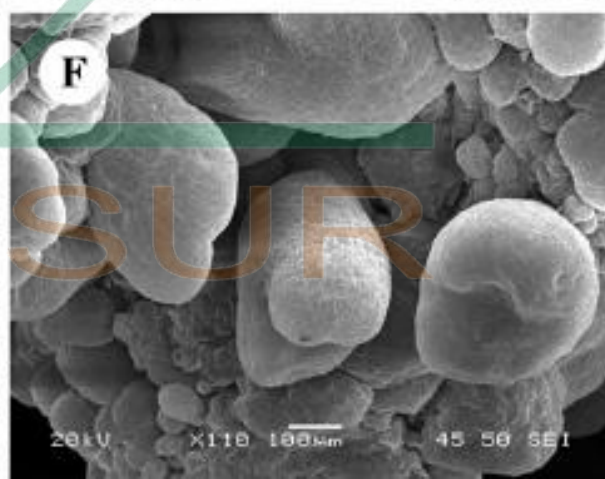
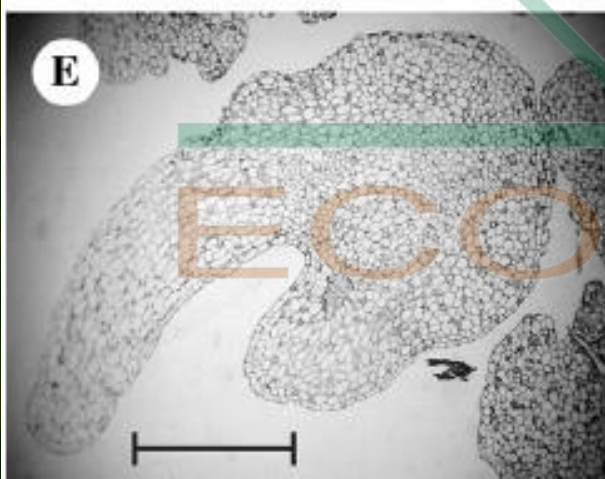
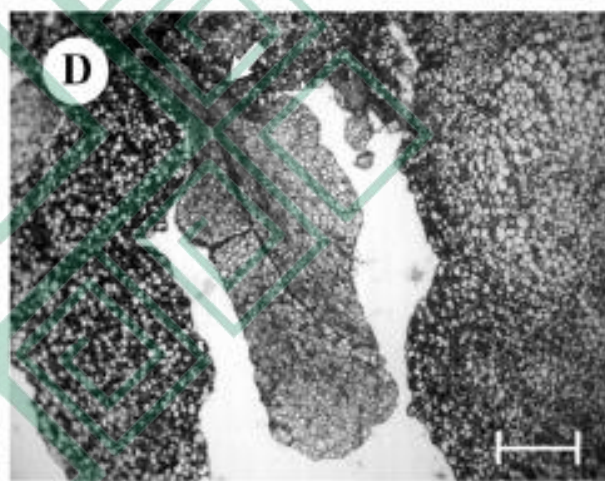
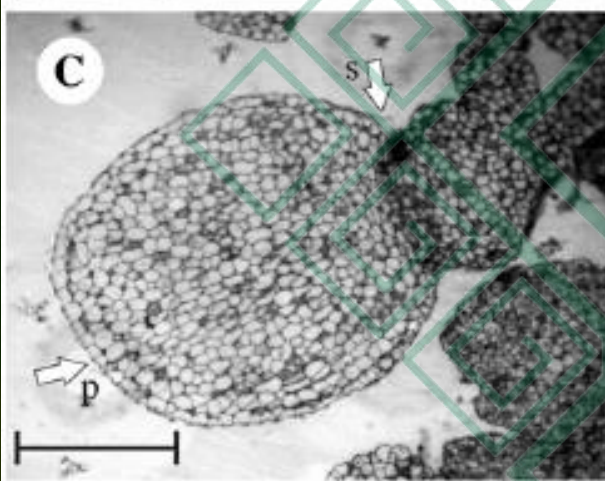
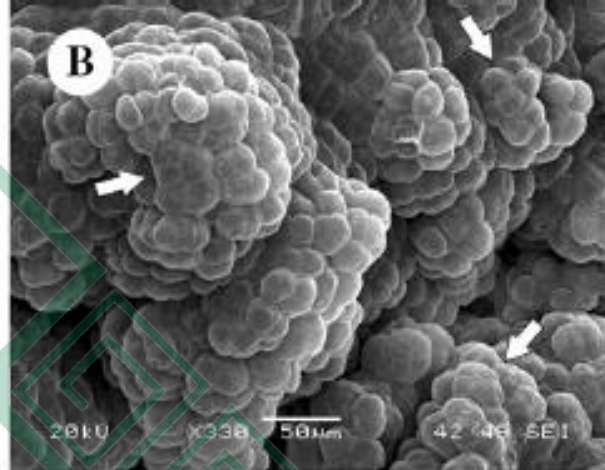
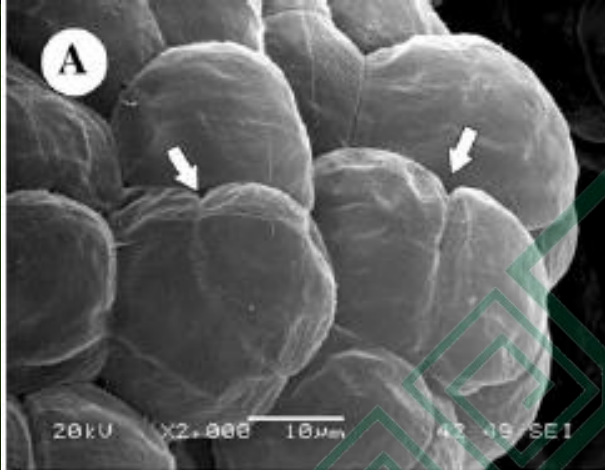


ECOSUR



ECOSUR





ORIGINAL PAPER

**Induction of somatic embryogenesis and plant regeneration
in the tropical timber tree Spanish red cedar [*Cedrela odorata* L.
(Meliaceae)]**

Yuri J. Peña-Ramírez · Israel García-Sheseña · Ángel Hernández-Espinoza ·
Alfredo Domínguez-Hernández · Felipe A. Barredo-Pool ·
José A. González-Rodríguez · Manuel L. Robert

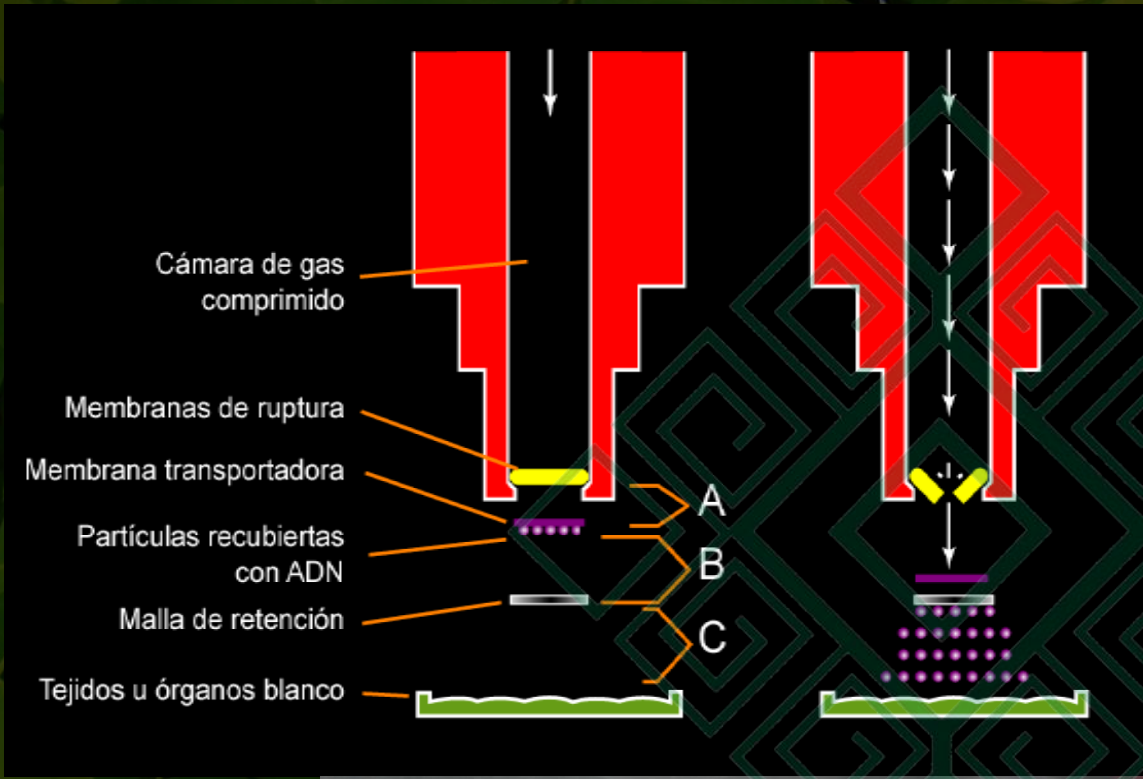
ECOSUR



Sistema de transferencia de genes

Biobalística

ECOSUR



Establecimiento de las condiciones de bombardeo en *C. odorata* empleando expresión transitoria

Table 1.
Optimization of biolistic parameters.

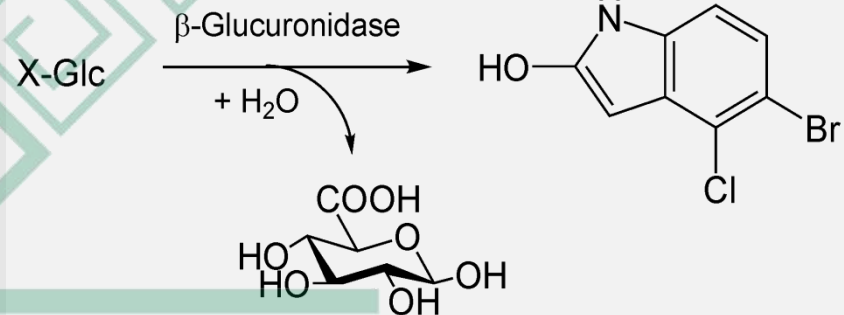
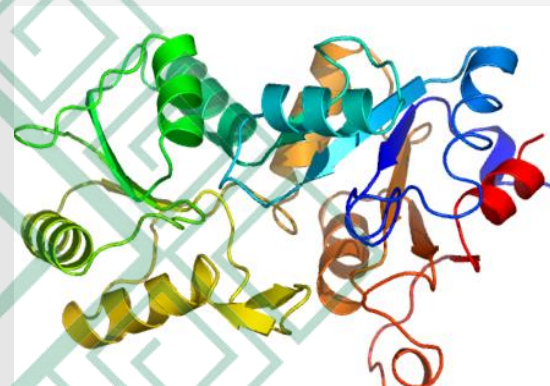
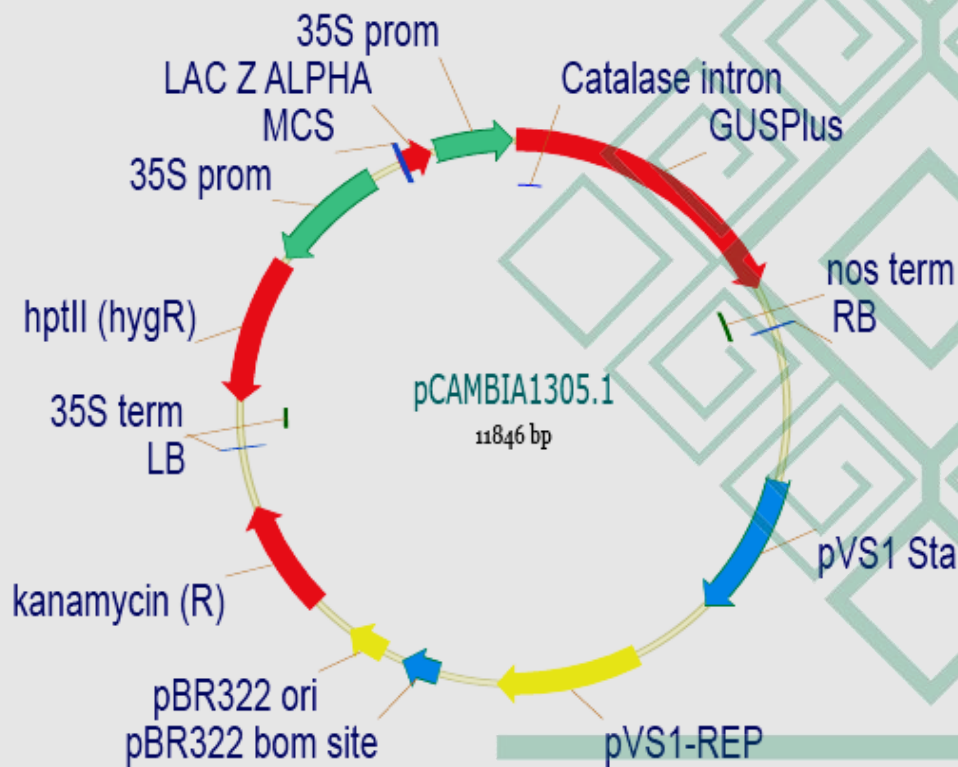
Treatment	Membrane rupture pressure (psi)	Shoot distance (cm)	Microcarrier diameter (μm)	DNA amount (μg)	Spermidine addition	pCambia vector	Number of foci/100 mg of embryogenic calli
1	400	6	1	6	+	1302	21.0 \pm 1.1 ^c
2	600	6	1	6	+	1302	28.6 \pm 1.9 ^d
3	900	6	1	6	+	1302	49.4 \pm 1.5 ^e
4	1100	6	1	6	+	1302	49.2 \pm 1.0 ^{fb}
5	1550	6	1	6	+	1302	45.6 \pm 1.9 ^{ef}
6	1100	3	1	6	+	1302	15.0 \pm 2.0 ^b
7	1100	4.5	1	6	+	1302	19.6 \pm 1.5 ^c
8	1100	7.5	1	6	+	1302	56.0 \pm 1.4 ^h
9	1100	9	1	6	+	1302	60.6 \pm 2.6 ^f
10	1100	12	1	6	+	1302	12.4 \pm 2.4 ^{ab}
11	1100	9	0.6	6	+	1302	32.2 \pm 1.1 ^d
12	1100	9	1.6	6	+	1302	10.4 \pm 1.1 ^{ab}
13	1100	9	1	2	+	1302	32.2 \pm 0.9 ^c
14	1100	9	1	10	+	1302	67.2 \pm 0.7 ^f
15	1100	9	1	10	-	1302	8.8 \pm 1.2 ^{ab}
16	1100	9	1	10	+	1201	57.6 \pm 1.2 ^h

The average value of the number of foci per treatment is presented \pm Mean Standard Error. Cursive letters next to values correspond to significant difference levels by LSD test at $p \leq 0.05$; $n = 5 \times 3$.

Herramientas de detección del transgén

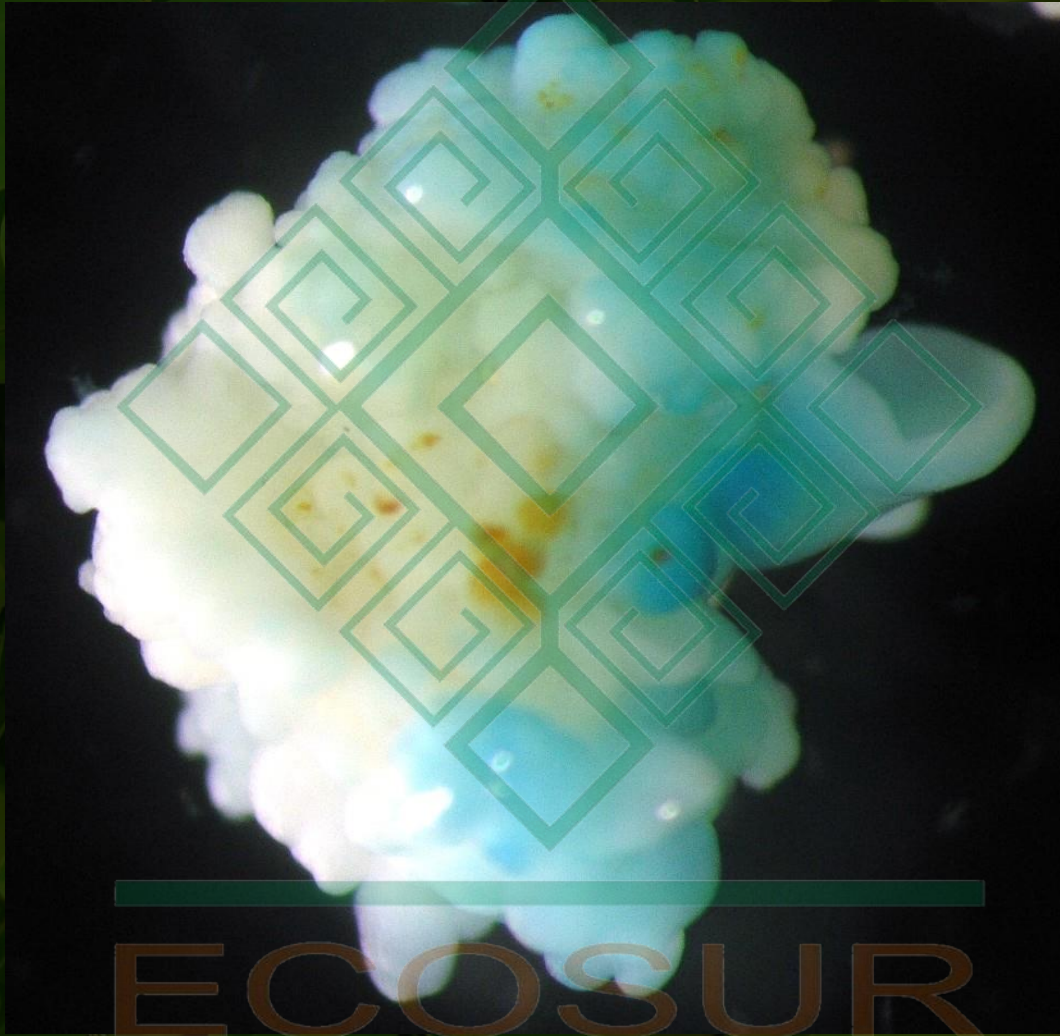
ECOSUR

Beta Glucuronidasa como gen reportero.

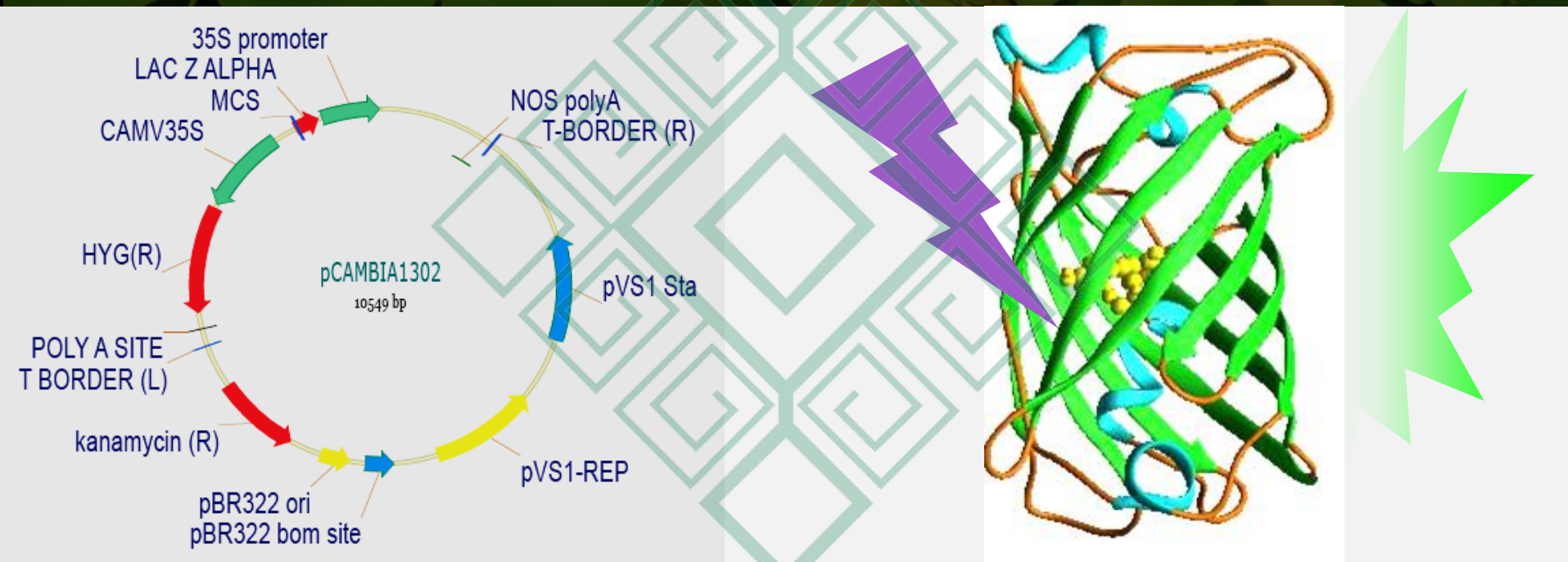


ECOSUR

Expresión transitoria del gen *gus* en *C. odorata*.

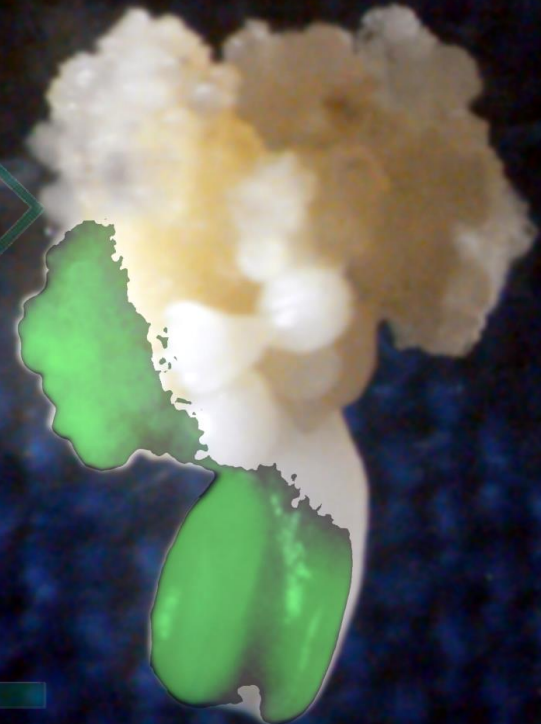
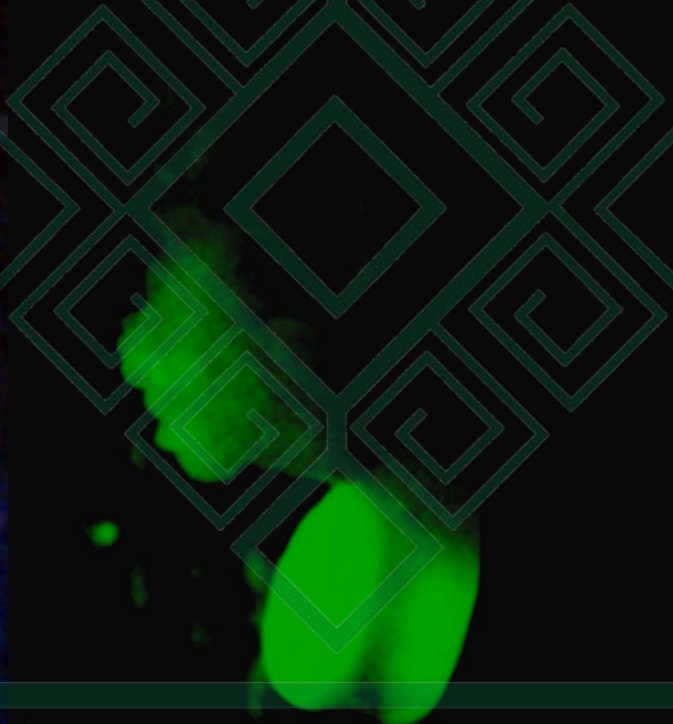


Proteína Verde Fluorescente como reportero



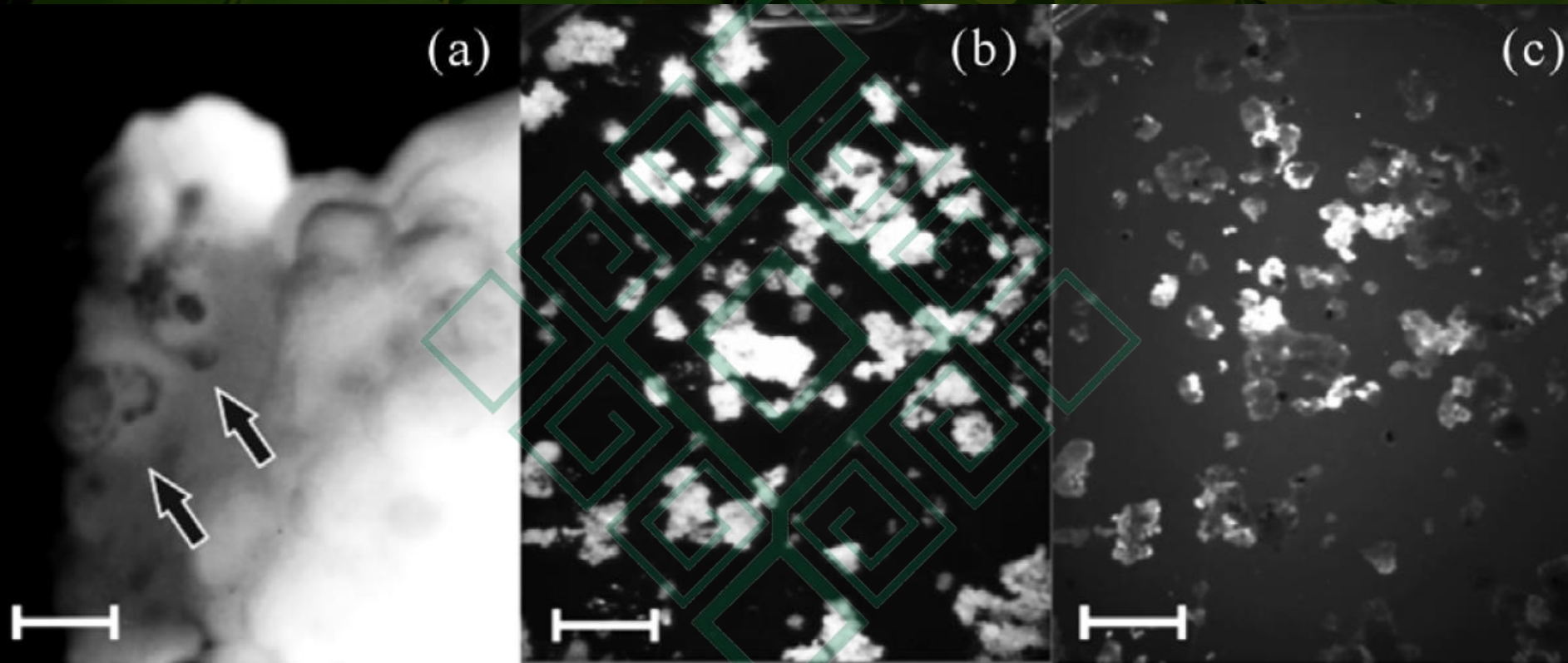
ECOSUR

Expresión transitoria del gen *gfp* en *C. odorata*.



ECOSUR

Expresión transitoria de genes reporteros en *C. odorata*



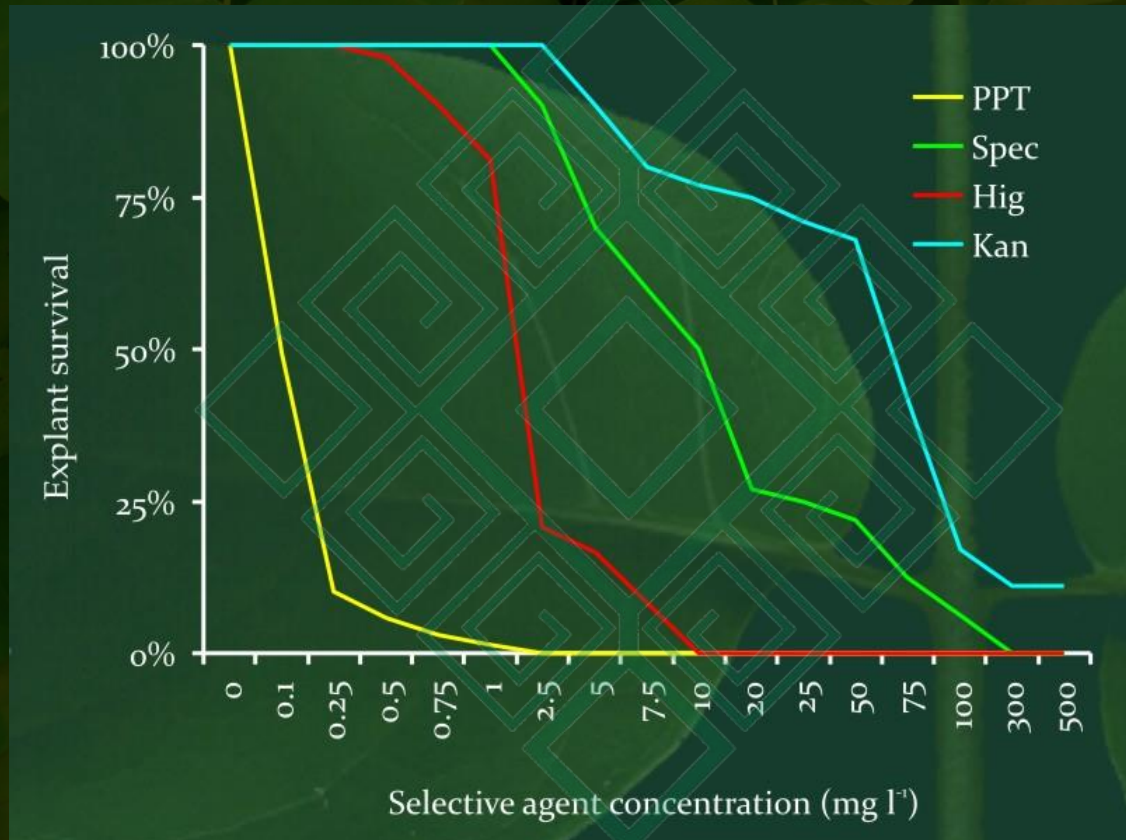
Gus

Gfp luz blanca

Gfp luz UV

ECOSUR

Curvas de tolerancia a agentes de selección en *C. odorata*



Transient GUS and GFP Expression in Spanish Red Cedar (*Cedrela odorata* L.) Somatic Embryos. Optimization of Bombardment Conditions and Evaluation of Selective Agent Lethal Dose

Yuri J. Peña-Ramírez^{1*}, Max M. Apolinar-Hernández¹, Oscar A. Gómez-y-Gómez¹,
Luisa A. López-Ochoa², Aileen O'Connor-Sánchez²

¹Instituto Tecnológico Superior de Acayucan, Acayucan, México

²Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, México

Email: *yuri.pena@gmail.com

Received October 2nd, 2011; revised January 14th, 2012; accepted January 21st, 2012

ECOSUR



El vector adecuado

Síntesis de novo

ECOSUR



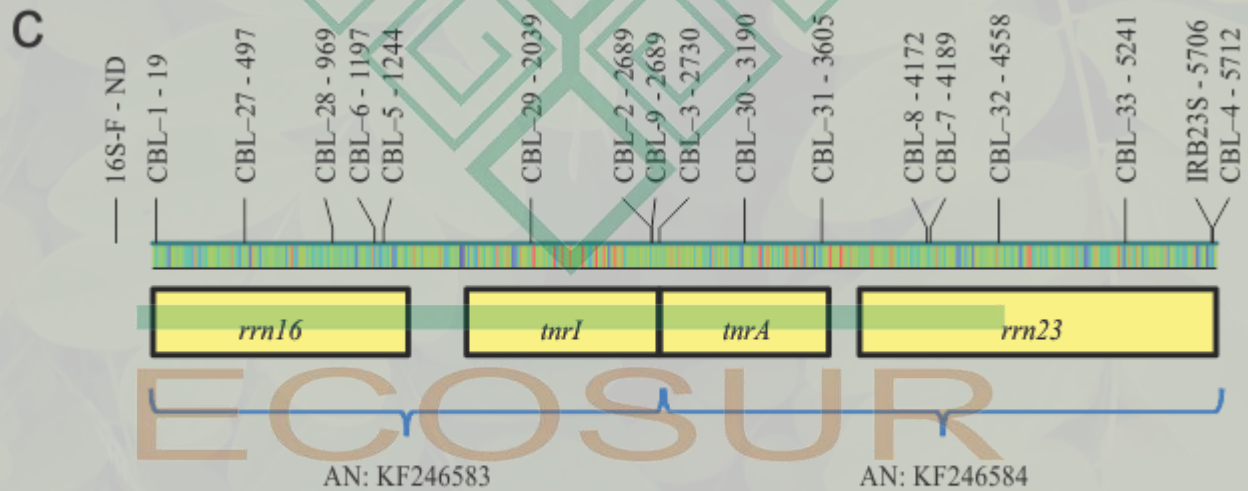
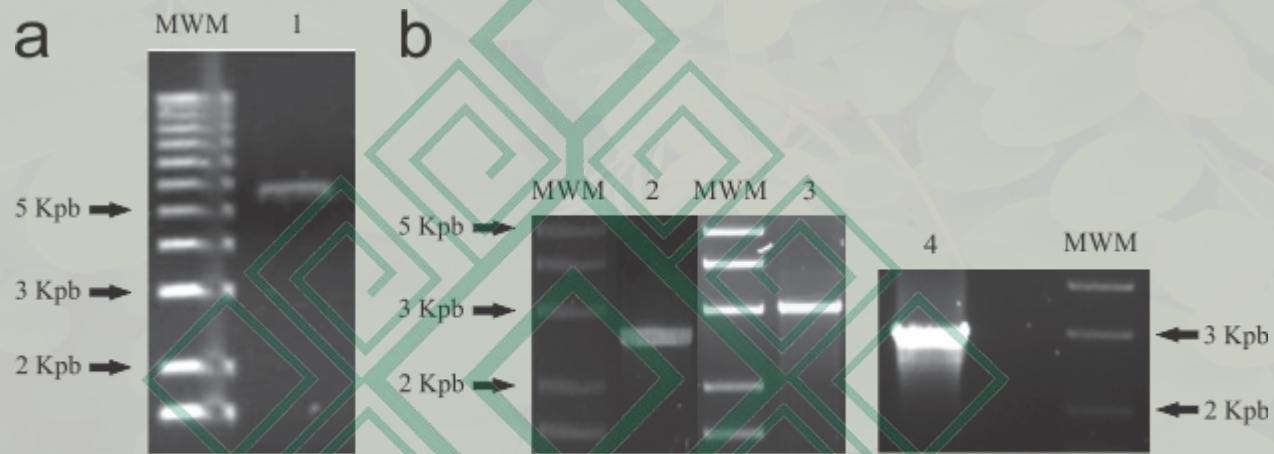
ECOSUR

Elección de la región *rrn16-trnI-trnA-rrn23*

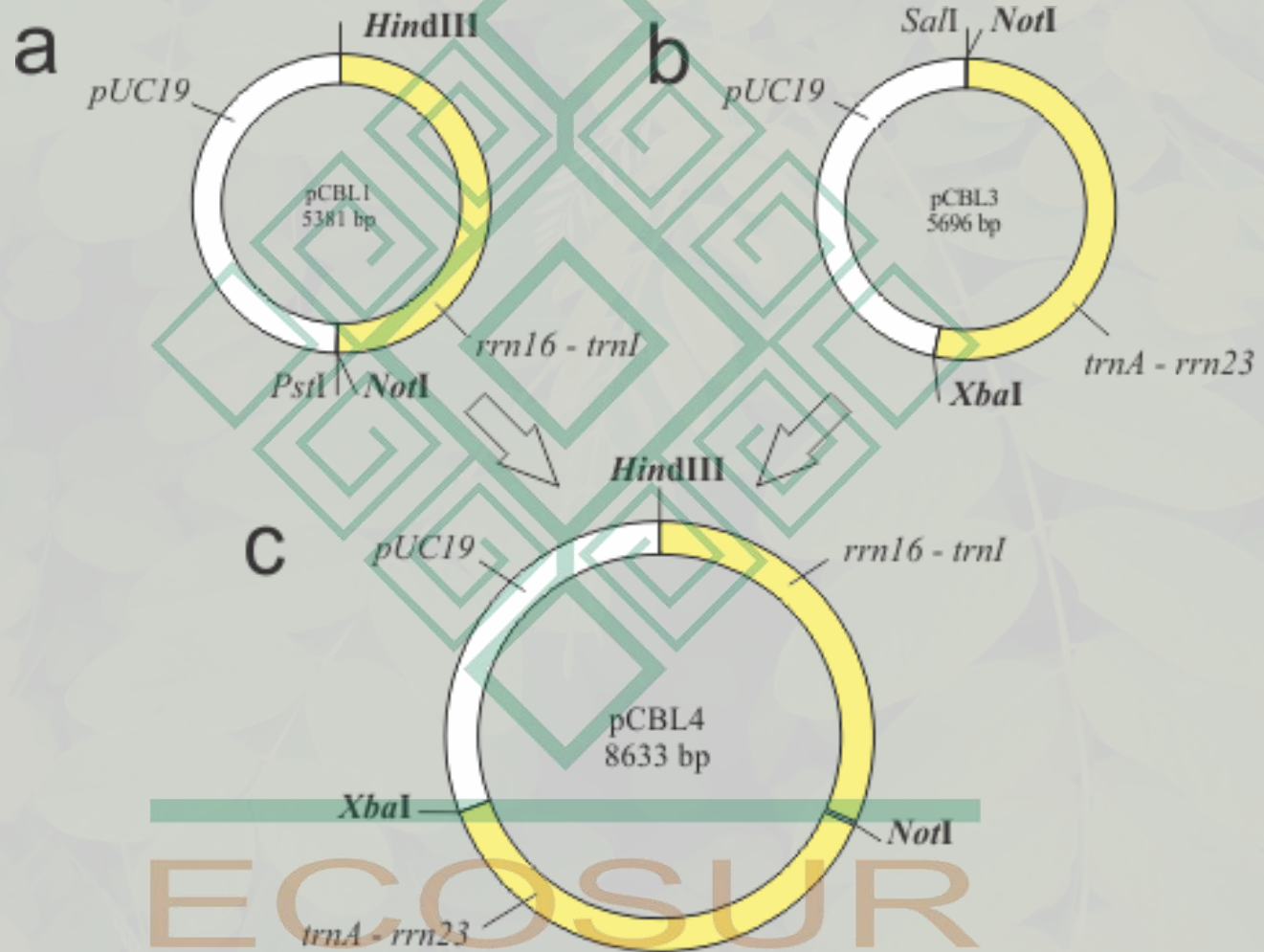
- Altamente conservada
 - Cercana a los Ori A y Ori B
 - Región intergénica bien definida entre *trnI-trnA*
- 1) Obtención de una secuencia consenso empleando las especies filogenéticamente más cercanas a *C. odorata*
 - 2) Diseño de primers añadiendo sitios de clonación no presentes en la región *rrn16-trnI-trnA-rrn23*
 - 3) Clonación por separado de las secuencias *rrn16-trnI* y *trnA-rrn23*



Caracterización y clonación de la región *rrn16* –*rrn23* de *C. odorata*



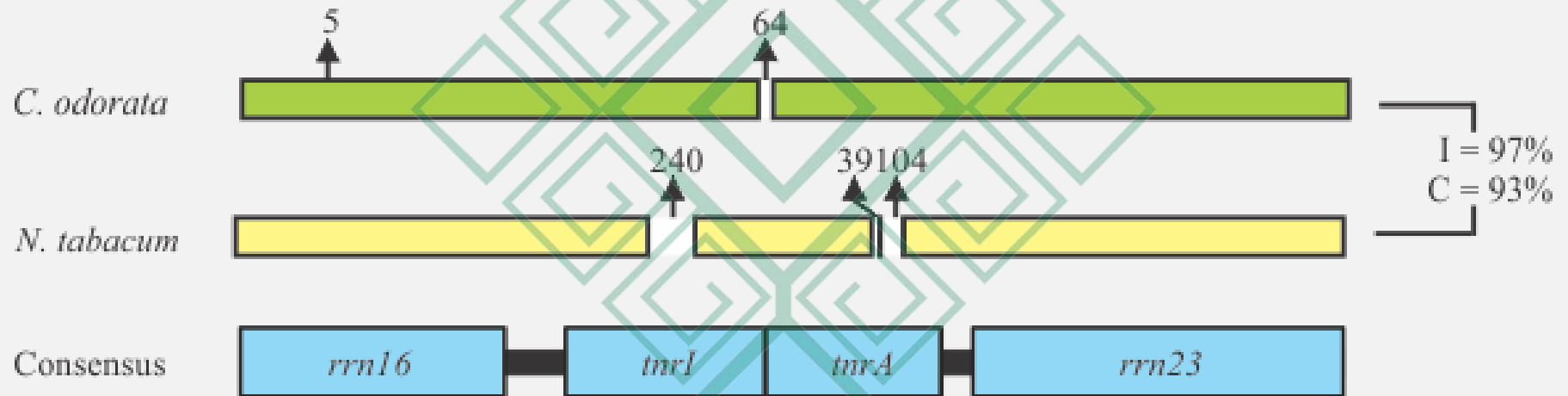
Clonación de la región *rrn16-rrn23* en pUC19



ECOSUR



Diferencias sustanciales encontradas entre las secuencias de *C. odorata* y *N. tabacum*



ECOSUR

d



Diseño *in silico* del casete de expresión y síntesis química.

Elementos regulatorios: homólogos (cisgenes) o “cedrelizados”

Genes estructurales: “Cedrelizados”

Eliminación de sitios de restricción.

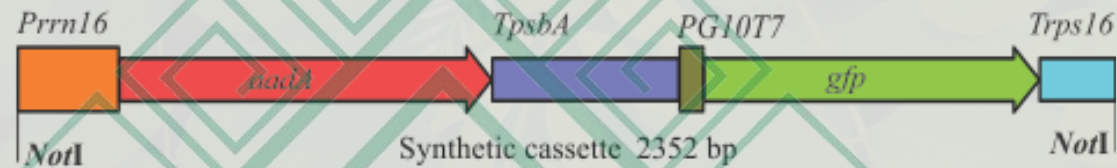
ECOSUR

“Cedrelización” de secuencias ” Edición de la secuencia en ADN a partir de la secuencia de AAs empleando el uso de codones del plasmoma de *C. odorata*;

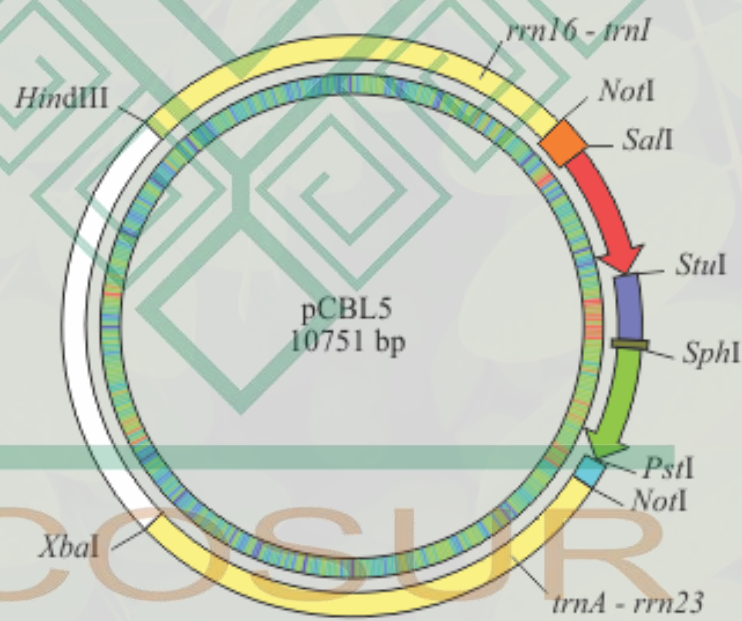
TTT Phe	TCT Ser	TAT Tyr	TGT Cys
TTC Phe	TCC Ser	TAC Tyr	TGC Cys
TTA Leu	TCA Ser	TAA stop	TGA stop
TTG Leu	TCG Ser	TAG stop	TGG Trp
CTT Leu	CCT Pro	CAT His	CGT Arg
CTC Leu	CCC Pro	CAC His	CGC Arg
CTA Leu	CCA Pro	CAA Gln	CGA Arg
CTG Leu	CCG Pro	CAG Gln	CGG Arg
ATT Ile	ACT Thr	AAT Asn	AGT Ser
ATC Ile	ACC Thr	AAC Asn	AGC Ser
ATA Ile	ACA Thr	AAA Lys	AGA Arg
ATG Met	ACG Thr	AAG Lys	AGG Arg
GTT Val	GCT Ala	GAT Asp	GGT Gly
GTC Val	GCC Ala	GAC Asp	GGC Gly
GTA Val	GCA Ala	GAA Glu	GGA Gly
GTG Val	GCG Ala	GAG Glu	GGG Gly

Construcción del vector base pCBL5

d



e



GC% in 26 bp blocks

11	18	24	31	37	44	50	57	63	70	76
----	----	----	----	----	----	----	----	----	----	----

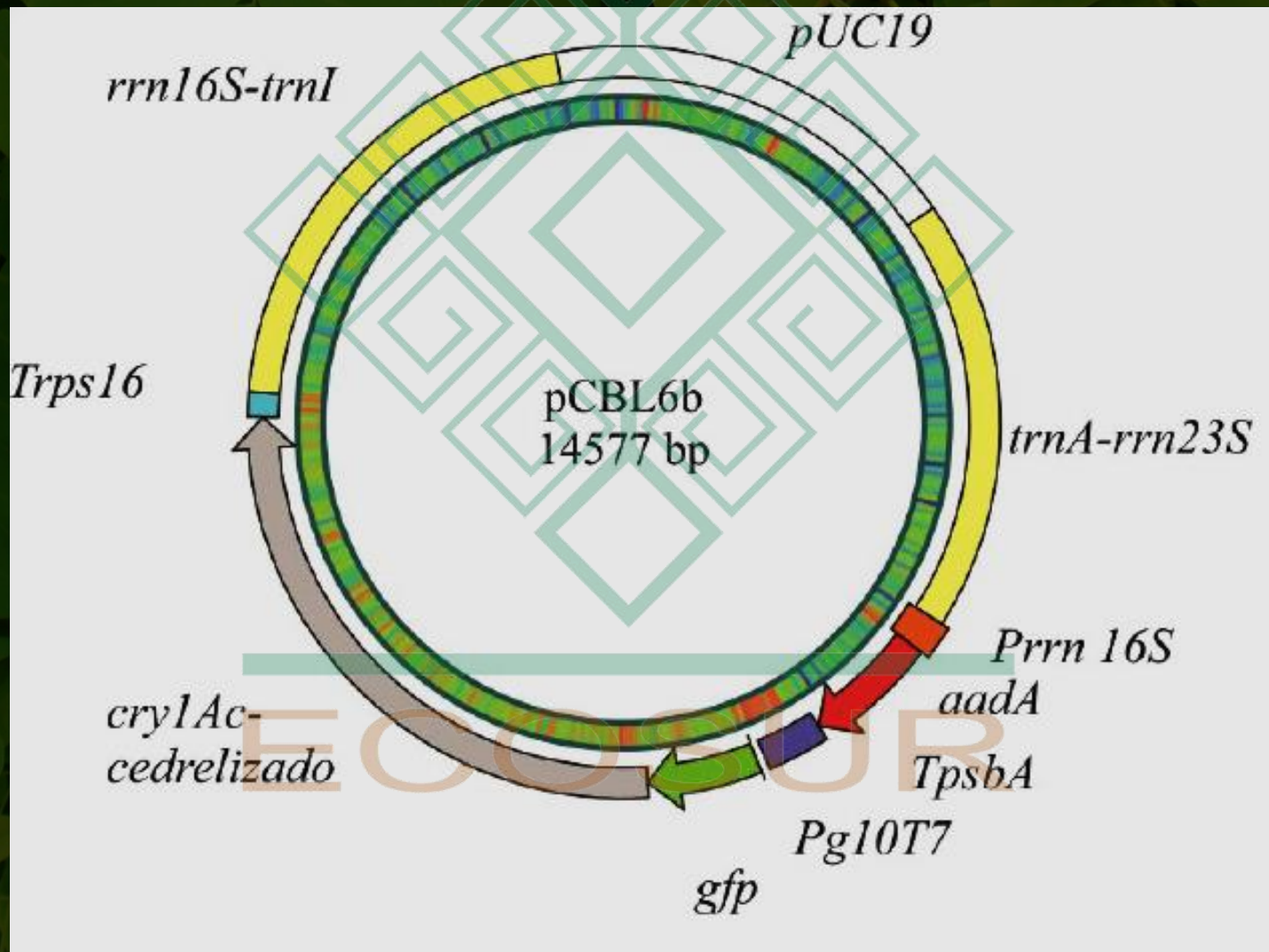
V En dónde estamos y hacia
dónde vamos?

ECOSUR



ECOSUR

Diseño *in silico* y síntesis del gen *cry* cedrelizado, clonación en pCBL5

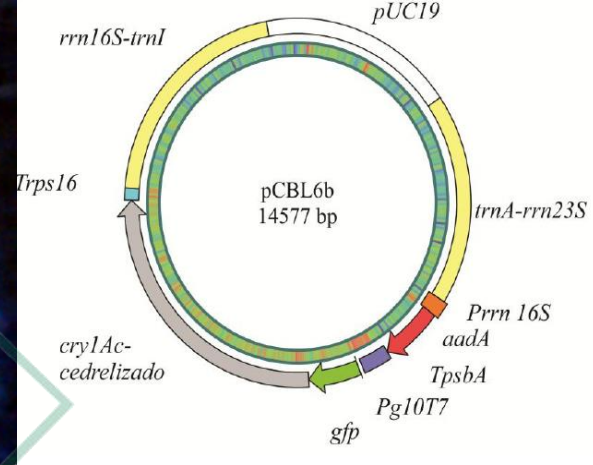
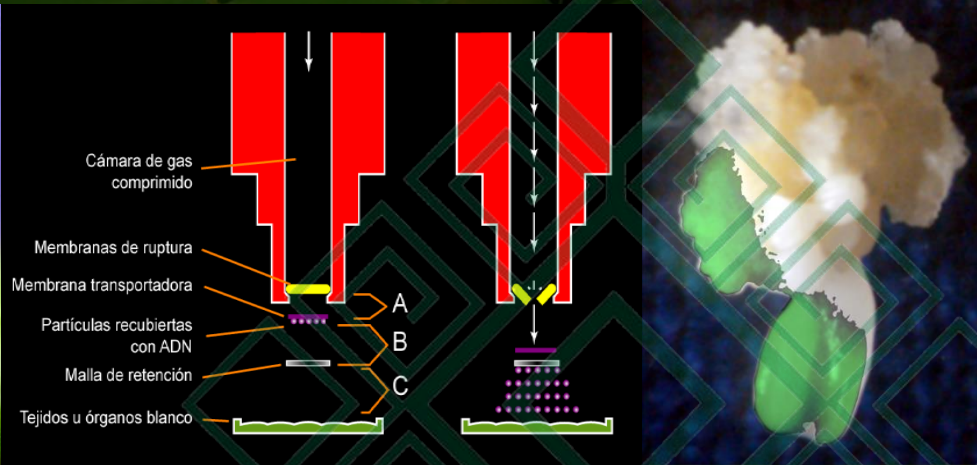


Bioensayos *in vitro* con toxinas Cry y relacionadas



ECOSUR

¿Qué sigue?



ECOSUR

Gracias por su atención

ypena@ecosur.mx

yuri.pena@gmail.com

Twitter

[@calgene](https://twitter.com/calgene)

www.ecosur.mx

www.cultivo.com.mx

ECOSUR



ECOSUR