



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: de la infección a la regeneración de plantas

Apellidos, nombre	Gisbert Doménech, Carmina (cgisbert@btc.upv.es)
Departamento	Departamento de Biotecnología
Centro	ETSIAMN-Universidad Politécnica de Valencia

*Fotos propiedad del autor

1 Resumen de las ideas clave

En este artículo se va a explicar cómo se lleva a cabo comúnmente el proceso de infección de explantes con *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) portadora de los genes que se desea introducir y, los pasos a seguir para conseguir la regeneración de plantas a partir de las células transformadas. Se comentan distintos factores que pueden influir en las frecuencias de transformación.

2 Introducción

Antes de iniciar la infección de los explantes con la bacteria portadora de los genes de interés, es imprescindible disponer de un protocolo de regeneración eficiente que permita la regeneración de plantas a partir de los explantes (material vegetal) a infectar. Es decir, haber estudiado qué condiciones de cultivo (medios de cultivo, tipo de explantes, tiempos de inducción, etc.) son adecuadas para obtener regeneración de una manera eficiente a partir de estos explantes. También, es conveniente determinar la dosis del agente selectivo si se va a introducir un gen de selección junto con el gen de interés.

La transformación que se iniciará con la obtención de los explantes, su infección y su posterior cultivo en medios que permitan la eliminación de la bacteria y la regeneración de las plantas a partir de las células transformadas. Existen distintas cepas de *Agrobacterium* que pueden mostrar distinta capacidad infectiva frente a un material determinado por lo que será importante tener en cuenta este factor.

El objetivo de este artículo docente es comentar cada una de las etapas del proceso de transformación; desde la infección hasta la regeneración de las plantas a partir de los explantes infectados. Estas etapas son:

- La infección.
- El cocultivo.
- El lavado.
- El cultivo y la regeneración.

3 Desarrollo

La infección

Por infección se puede entender el primer contacto entre la bacteria y los explantes. Para ello se prepara un cultivo de *Agrobacterium* portador de las construcciones de interés utilizando medios de cultivo de bacterias (por ejemplo el LB) en los que se suele adicionar un antibiótico al que muestre resistencia la cepa en cultivo. Tras el cultivo, se determina y ajusta la concentración de bacteria que se quiere utilizar para la infección (por ejemplo, un cultivo con una densidad óptica de 0.6). El cultivo se coloca en un recipiente estéril y se introducen los explantes obtenidos a partir de plantas cultivadas en condiciones asépticas. El tiempo de contacto entre el cultivo y los explantes dependerá del protocolo pero suele ser de unos minutos.

El cocultivo

Tras la infección, los explantes se cultivan en un medio de cultivo de plantas en el que no se ha adicionado ningún antibiótico que impida el crecimiento del *Agrobacterium*. El periodo en el que los explantes están en este medio es lo que llamamos cocultivo. Generalmente, esta etapa comprende entre 1 y 2 días.

El lavado

Tras el cocultivo, los explantes pueden introducirse en un medio líquido al que se adicionan antibióticos para eliminar el *Agrobacterium* (por ejemplo, cefotaxima o carbenicilina). La bacteria que está en la superficie se suelta en este proceso, tras el cual, los explantes se depositan en papel estéril para su 'secado'. Este paso se omite en muchos protocolos, en los que se pasa directamente a la siguiente etapa.

El cultivo y la regeneración

Tras el lavado, los explantes se cultivan en el medio de inducción de la regeneración puesto a punto previamente a la transformación. A este medio se le adicionan, previamente a su distribución en placas u otros recipientes, antibióticos para eliminar el *Agrobacterium* y otros compuestos que limiten la regeneración a partir de las células no transformadas. Es común, que junto con el gen de interés que se quiere introducir, se coloque un gen selectivo, por ejemplo, un gen de resistencia a antibióticos. En estos casos, en el medio de cultivo, se adiciona el antibiótico en cuestión que limitará la regeneración de aquellas células que no hayan incorporado los transgenes. Un gen utilizado comúnmente con este fin es el *nptII* que confiere resistencia a kanamicina. Otro gen selectivo común es el gen *bar*, que codifica una enzima capaz de detoxificar el herbicida glufosinato. Las concentraciones de los compuestos que se adicionan al medio de regeneración tienen que ajustarse antes de llevar a cabo la transformación para: determinar la sensibilidad de los explantes a estos compuestos y ajustar la dosis que nos permita la selección, sin detrimento de la regeneración.

En la siguiente figura se muestra la infección de explantes de hoja de tabaco (*Nicotiana tabaccum* L.) (A) y el cultivo en medio de selección (B-D). Puesto que muchas células no han sido transformadas, van mostrando clorosis a medida que transcurre el cultivo (B y C). Sin embargo, pueden observarse zonas de regeneración verdes (señaladas con flechas) a partir de las cuales se obtienen brotes (C). Los brotes se transfieren a medio de cultivo con agente selectivo. Las plantas que se obtienen (D) son pues capaces de detoxificar el antibiótico de selección. Una vez obtenidas, se procede a la extracción de ácidos nucleicos para llevar a cabo los análisis que permitan confirmar la inserción y la expresión de los genes, y determinar el número de copias insertadas.

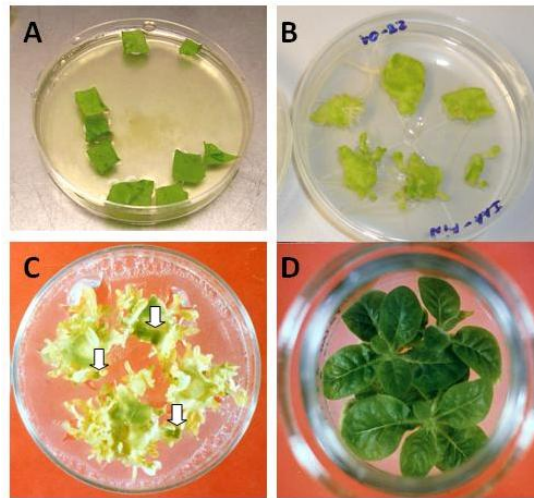
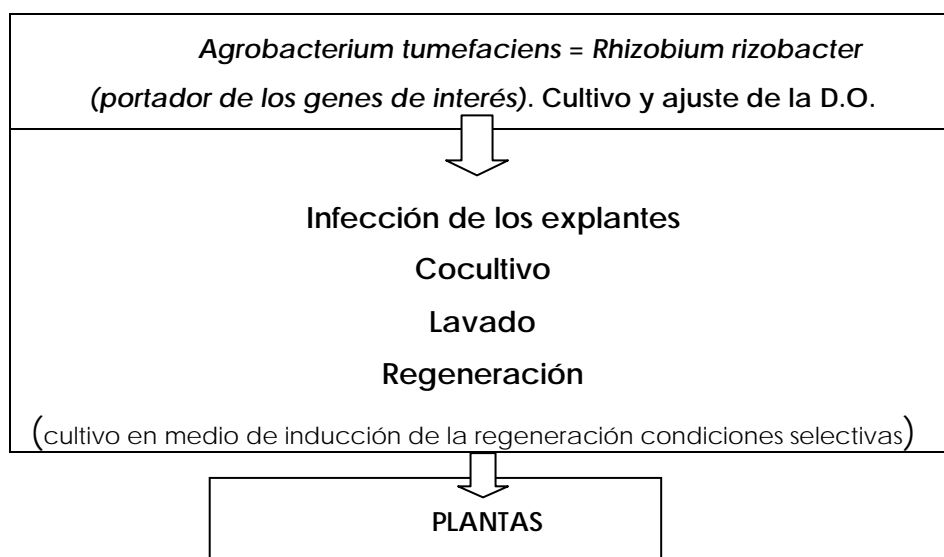


Figura 1.Proceso de infección de explantes de hoja de tabaco. A. Infección. B y C. Cultivo en medio selectivo con kanamicina (zonas con yemas verdes indicadas con flechas). Antes de este proceso los explantes infectados se cultivaron durante un día en medio base (etapa de cocultivo) D. Plantas regeneradas y cultivadas en medio de selección.

4 Cierre

En los apartados de introducción y el desarrollo se ha pretendido explicar de manera breve las distintas etapas de la transformación y aclarar conceptos relacionados que se resumen en el siguiente esquema. Comprueba al leerlo si estos conceptos te han quedado claros.





UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Bibliografía

GISBERT, C., FITA, A., DÍEZ, M.J. "Prácticas de cultivo in vitro y transformación genética de plantas" 2ª ed. Editorial UPV, Valencia 2008.

LUQUE J, HERRÁEZ A. Biología molecular e ingeniería genética. Elsevier, Madrid, 2009.

SMITH, J.E. (2006). Biotecnología 4ª ed. Acribia, Zaragoza, 2006.