



UNIVERSIDAD
POLITECNICA
DE VALENCIA

Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens*: la caracterización de las plantas obtenidas

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

Resumen de las ideas clave

En este artículo se va a explicar cómo se analizan las plantas regeneradas a partir de los explantes infectados con la cepa *Agrobacterium tumefaciens* (actualmente *Rhizobium radiobacter*) portadora de los genes de interés (transgenes). Es importante determinar que las plantas regeneradas han incorporado el transgen o los transgenes ubicados en la región de transferencia del plásmido binario y que éstos se están expresando. También conviene determinar el número de copias insertadas. Tras este análisis, las plantas se analizarán para determinar si cada transgen está realizando la función esperada en el fondo genético en el que se ha introducido.

1 Introducción

En los procesos de transformación genética es necesario analizar las plantas obtenidas para determinar si son o no transgénicas. En algunas ocasiones puede saberse si una planta es transgénica observando su fenotipo, por ejemplo, observando las características externas o funcionales de la misma si el gen insertado así lo permite (un gen que modifique el color de un tejido, que confiera tolerancia a un herbicida, etc.). Sin embargo, la forma más precisa de comprobar la inserción del transgen es determinar mediante técnicas moleculares que en el ADN de la planta se ha producido la inserción. Para ello, se suele utilizar la reacción en cadena de la polimerasa (del inglés Polymerase Chain Reaction: PCR) que permite obtener un gran número de copias de un fragmento conocido de ADN. Puesto que conocemos las secuencias de los genes que se insertaron en la región de transferencia del plásmido utilizado para la transformación (ver Gisbert 2012), podemos diseñar cebadores para amplificar una zona determinada de los genes y visualizar, posteriormente, el fragmento amplificado en un gel de agarosa. Algunas plantas pueden haber regenerado pero no haber insertado el transgen. A estas plantas se les suele llamar 'escapes'. Cuando en la región de transferencia se coloca más de un transgen puede haberse incorporado uno de ellos pero no todos por lo que es conveniente realizar la PCR para cada uno de los transgenes.

Aunque la inserción del transgen se haya producido, su expresión puede verse limitada por distintos factores, influyendo la zona del genoma donde se haya insertado y, el número de copias insertadas. Cuando un gen que debería estar expresándose en condiciones normales no se expresa, se dice que está silenciado. El silenciamiento génico es un mecanismo de regulación génica y de defensa que ocurre de manera natural y que se ha observado también en distintas plantas transgénicas en las se pretendía expresar un determinado transgen. Así pues, comprobar que los transgenes están expresándose es importante. Para ello, se puede analizar la presencia de ARN mensajero (ARNm) utilizando la técnica anterior (PCR) previa conversión del ARNm a DNA copia o complementario (ADNc) por retrotranscripción, lo que se conoce como RT-PCR ó utilizar la hibridación Northern en la que se va a utilizar una sonda que hibride con el ARNm. También puede comprobarse la expresión del gen comprobando que se obtiene el producto que codifica.

En los procesos de transformación se puede insertar una o más copias de cada uno de los transgenes y la probabilidad de que se produzca silenciamiento génico aumenta con el número de copias insertadas. La inserción de una única copia es pues deseable para evitar el silenciamiento y también porque facilita el análisis de los descendientes (segregantes) y la obtención de líneas puras (no segregantes). En estas líneas, se puede llevar a cabo de manera más uniforme los posteriores análisis de la función génica. La hibridación Southern es la técnica que más se utiliza para determinar el número de copias insertadas y es una comprobación más precisa que la obtenida por la amplificación PCR, de que se ha producido la inserción génica.

2 Objetivos

El objetivo de este artículo docente es que los alumnos repasen brevemente las técnicas moleculares que se utilizan para analizar las plantas regeneradas en los ensayos de transformación con el fin de: confirmar la inserción del transgen, determinar el número de copias insertadas y comprobar que el gen introducido se está expresando. Las técnicas que se utilizan comúnmente para ello son:

- PCR (inserción)
- Southern (número de copias)
- RT-PCR/ Northern blot (expresión-transcripción)

3 Desarrollo

Inserción. PCR.

Esta técnica se basa en la hibridación de un par de oligonucleótidos (que se diseñan en base a la secuencia de interés y que son sintetizados artificialmente) y la posterior amplificación de la secuencia que delimitan. Esta amplificación se inicia tras un paso previo que implica la desnaturalización del ADN de doble cadena, por elevación de la temperatura a 92-95°C. En cada ciclo de amplificación se produce la desnaturalización de la doble cadena, la unión por complementariedad del cebador al ADN de simple hebra y replicación del ADN a partir del cebador, catalizada por la enzima *Taq* polimerasa (enzima capaz de trabajar a temperaturas elevadas). La temperatura de unión de los cebadores al ADN de cadena simple depende de la secuencia y tamaño del oligonucleótido, comprendiéndose en términos generales entre los 35-60°C y la fase de síntesis de ADN complementario se lleva a cabo a la temperatura óptima para que la *Taq* polimerasa realice la replicación a partir de cada extremo 3' de los cebadores. En la siguiente figura se puede observar un gel de electroforesis en los que aparecen los productos de amplificación de dos genes (a y b).

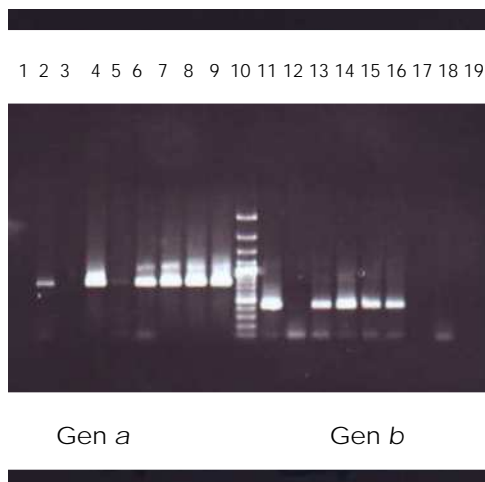


Figura 1. Separación de los fragmentos amplificados tras realizar reacciones PCR para amplificar una región del gen *a* y del gen *b* en plantas regeneradas tras la infección con *A. tumefaciens* portador de ambos genes en la región de transferencia del plásmido binario.

El marcador de peso molecular colocado en el pocillo 10 nos orienta del tamaño de los fragmentos amplificados que tiene que coincidir con el del control positivo (por ejemplo amplificación del plásmido utilizado). En los pocillos 1 y 19 se colocaron los controles negativos para el primer y el segundo gen, respectivamente, y en los pocillos 9 y 11 los controles positivos. Según los resultados podemos ver que no todas las plantas regeneradas han amplificado el gen correspondiente. En aquellas que si se ha producido la inserción se seguiría con el análisis de expresión y la determinación del número de copias insertadas.

Determinación del número de copias. Hibridación Southern.

La hibridación Southern es una técnica empleada para detectar secuencias específicas de ADN. El ADN aislado se digiere con enzimas de restricción específicas y los fragmentos generados se separan mediante electroforesis y se transfieren a una membrana que sirve de soporte. Para ello, se coloca el gel de agarosa sobre papel filtro previamente remojado en una solución llamada de transferencia (que es una solución salina concentrada) y a continuación se sitúa la membrana sobre el gel y encima varios papeles de filtro secos (un bloque). La solución de transferencia es absorbida por capilaridad por el papel de filtro, arrastrando consigo al ADN hacia la membrana donde queda inmovilizado (conservando la misma posición relativa que ocupaba en el gel). Seguidamente, el ADN puede ser hibridado con una sonda marcada.

Si disponemos de un sitio de corte dentro del gen insertado podemos digerir el ADN con este enzima que cortará en esta zona y en otras del genoma. Si hibramos con una sonda que comprenda una parte del fragmento cortado observaremos tantas bandas como copias insertadas (Figura 2). Si no disponemos de un sitio de corte interno podemos utilizar un sitio de corte situado en un extremo del T-DNA.

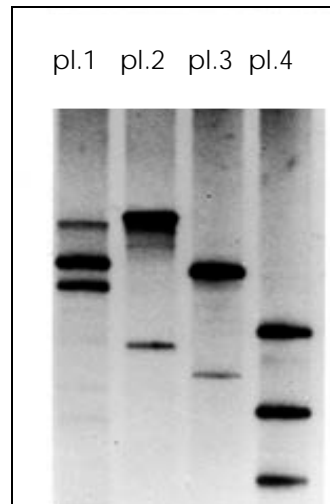


Figura 2. Hibridación Southern tras digestión enzimática con un enzima que corta una única vez en el transgen insertado e hibridación con la sonda correspondiente.

La inserción de una única copia es deseable pues facilita el análisis de los segregantes y la obtención de líneas puras en las que se puede llevar a cabo de manera más uniforme los posteriores análisis de la función del gen introducido.

Análisis de la expresión del transgen (a nivel de ARNm). RT-PCR e Hibridación Northern.

Las dos técnicas que más se utilizan para determinar que se está produciendo la transcripción del transgen son la RT-PCR y la hibridación Northern.

La RT-PCR es una variante de la PCR en la se utiliza la transcriptasa reversa para sintetizar ADNc a partir de una hebra de ARNm. El resultado se amplifica en una PCR tradicional tras la cual podremos observar en un gel si ha habido o no, amplificación.

La hibridación Northern se llama así por analogía con la hibridación Southern ya que el procedimiento a seguir es similar, salvo que en este caso se utiliza como sustrato ARN (ARNm en nuestro caso) que se separa por electroforesis en condiciones desnaturizantes (generalmente en geles de agarosa que contienen formaldehído). Las sondas están compuestas por ácidos nucleicos con una secuencia complementaria a todo o parte del RNA que nos interesa. Pueden ser de DNA, RNA o oligonucleótidos, con un mínimo de 25 bases complementarias para nuestra secuencia diana. Como controles en ambas técnicas suelen utilizarse genes que se expresan de manera constitutiva en la planta (por ejemplo el gen de la actina). En la figura 3 podemos observar cómo a igual intensidad en el gen

marcador, el gen de interés (b) no se expresa (muestra 1) o se expresa con distinta intensidad (muestras 2-6).

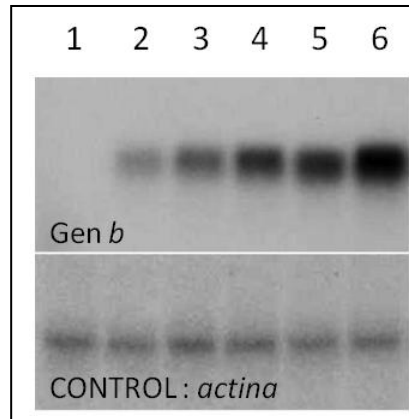


Figura 3. Resultado de la hibridación Northern. En la parte superior, gen en estudio y en la inferior control utilizado (expresión de un gen constitutivo en este ejemplo *actina*).

4 Cierre

En los apartados de introducción y desarrollo han aparecido distintas técnicas moleculares relacionadas con la caracterización de las plantas regeneradas en ensayos de transformación genética. En este contexto, cada una de estas técnicas se utiliza con un fin determinado. Comprueba al leer el siguiente cuadro que te ha quedado claro el fundamento de las mismas y su utilización.

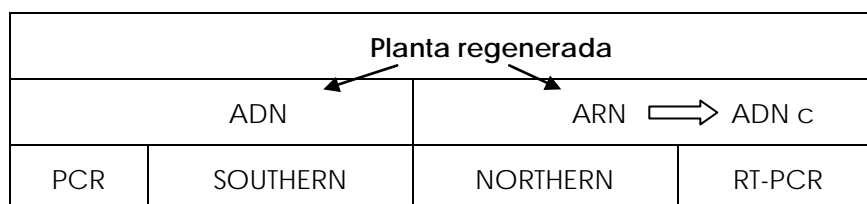


Figura 4. Esquema para la caracterización con técnicas moleculares de plantas regeneradas en experimentos de transformación genética.

Tras el análisis molecular, las plantas se analizarán para determinar si el gen de interés está realizando la función esperada en el fondo genético en el que se ha introducido. El tipo de análisis a realizar dependerá de la función génica esperada

(cuantificación de la síntesis de un compuesto determinado, estudios de tolerancia a un determinado estrés, etc.)

5 Bibliografía

DAVEY R., ANTHONY P. Plant Cell Culture. Essential Methods. Wiley-Blackwell, 2010.

GISBERT, C. *Agrobacterium tumefaciens* I. El plásmido Ti. Construcciones génicas. UPV, Valencia, 2012. <http://hdl.handle.net/10251/16574>

GISBERT, C. *Agrobacterium tumefaciens* II. De la infección a la regeneración de plantas UPV, Valencia, 2013.

GRIERSON, D. Biología Molecular de las Plantas. Acribia, 1991.

THIEMAN W.J., PALLADINO. M. A. Introducción a la Biotecnología. Pearson, 2010.

SMITH C.A., WOOD E.J. Biología Molecular y Biotecnología. Addison-Wesley Iberoamericana, 1998.