



# Efectos de la introducción de un gen de floración temprana de varias especies en *Nicotiana tabacum*



**Autores: Pablo Marín Martínez y Carmen M<sup>a</sup> Sánchez Abenza**

**Tutores: Nuria Alburquerque<sup>1</sup>, Carlos Lopesino<sup>2</sup>**

**Departamento de Mejora Vegetal. Grupo de Biotecnología. CEBAS-CSIC<sup>1</sup>**

**IES Infante don Juan Manuel (Murcia)<sup>2</sup>**



## INTRODUCCIÓN

Con la ingeniería genética podemos obtener plantas que expresen genes foráneos. La expresión de los genes de floración temprana (FT) puede ayudar a realizar estudios sobre el crecimiento y la biología reproductiva de distintas especies.

## OBJETIVOS

El objetivo principal de este trabajo fue la introducción de genes de floración temprana procedente de tres especies vegetales (chopo, manzano y *Arabidopsis*) en la planta del tabaco (*Nicotiana tabacum*). Como vector de infección se ha empleado la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*.

## METODOLOGÍA

Para conseguir el objetivo principal desarrollamos nuestro trabajo en seis etapas:

1. Desinfección de las semillas de *N. tabacum* y germinación *in vitro*.
2. Crecimiento de brotes en un medio de cultivo *in vitro*.
3. Obtención de discos de hojas de brotes de *N. tabacum* e infección con diferentes *A. tumefaciens* portando distintas construcciones moleculares con tres genes floración temprana: del chopo, del manzano y de *Arabidopsis*. Todas las construcciones llevan un gen de resistencia a antibióticos y otro chivato de fluorescencia (*eyfp*).
4. Selección de brotes, cultivo y enraizamiento en un medio selectivo con antibiótico.
5. Detección de la emisión de fluorescencia con esteromicroscopio Leica MZ75 en los brotes supuestamente transformados.
6. Extracción del ADN y análisis mediante PCR (Polymerase Chain Reaction).

## RESULTADOS

- ❖ Tras la germinación (Figura 1) las plántulas se pasaron a tarros (Figura 2) donde se desarrollaron hasta convertirse en brotes.
- ❖ Se obtuvieron discos de hoja de los brotes desarrollados y se infectaron con *A. tumefaciens* (Figura 3). Después de cuatro semanas se midió la regeneración (aparición de nuevas yemas) siendo un 100% en los discos de no hoja infectados (control de regeneración), un 19,3%, 10,6%, y 15,4% en los infectados con el gen FT de *Arabidopsis*, chopo y manzano respectivamente.
- ❖ Las nuevas yemas que se desarrollaron en brotes y enraizaron en un medio con 75 mg/L del antibiótico kanamicina fueron las que incorporaron el gen de resistencia al antibiótico junto a los otros transgenes. Se observó fluorescencia en las células que habían incorporado el gen *eyfp* (Figura 4).
- ❖ La mayor eficiencia de transformación definida como número de líneas transgénicas/número de discos de hoja infectados fue obtenida con el gen de *Arabidopsis* (45,5%) seguida por el del manzano (35,2%) y del chopo (24,5%).
- ❖ El análisis del ADN extraído de 9 líneas (3 de cada construcción) mediante PCR permitió comprobar la presencia del transgén de floración temprana, utilizando cebadores específicos de cada gen que amplifican una banda de 700 pares de bases (Figura 5: calles 1-3 corresponden al gen del chopo, las calles 4-6 al gen de *Arabidopsis* y las calles 7-9 al gen del manzano. M: marcador molecular de 100 pares de bases, C: control negativo, A: agua y P: plásmido o control positivo).



Figura 1



Figura 2

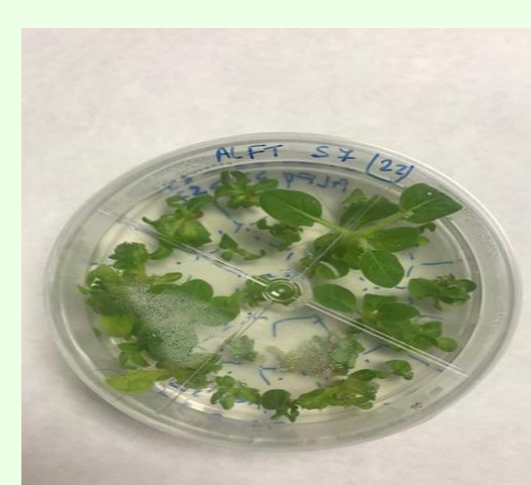


Figura 3

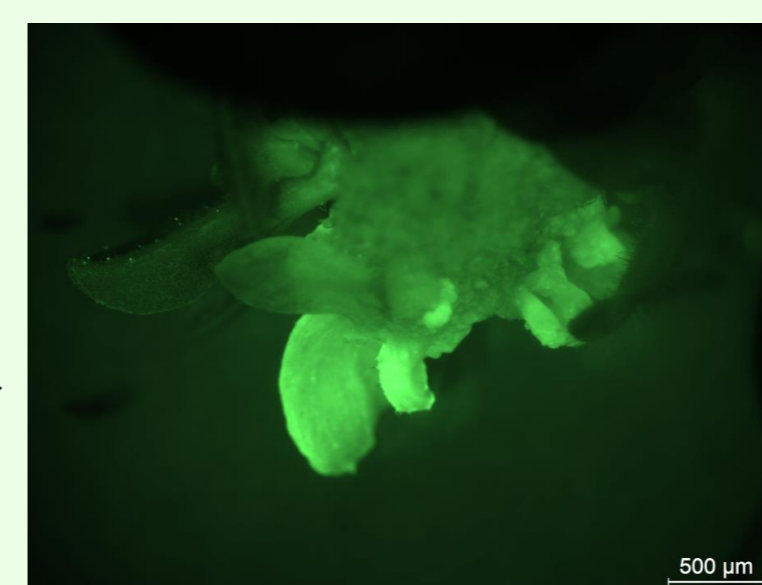


Figura 4

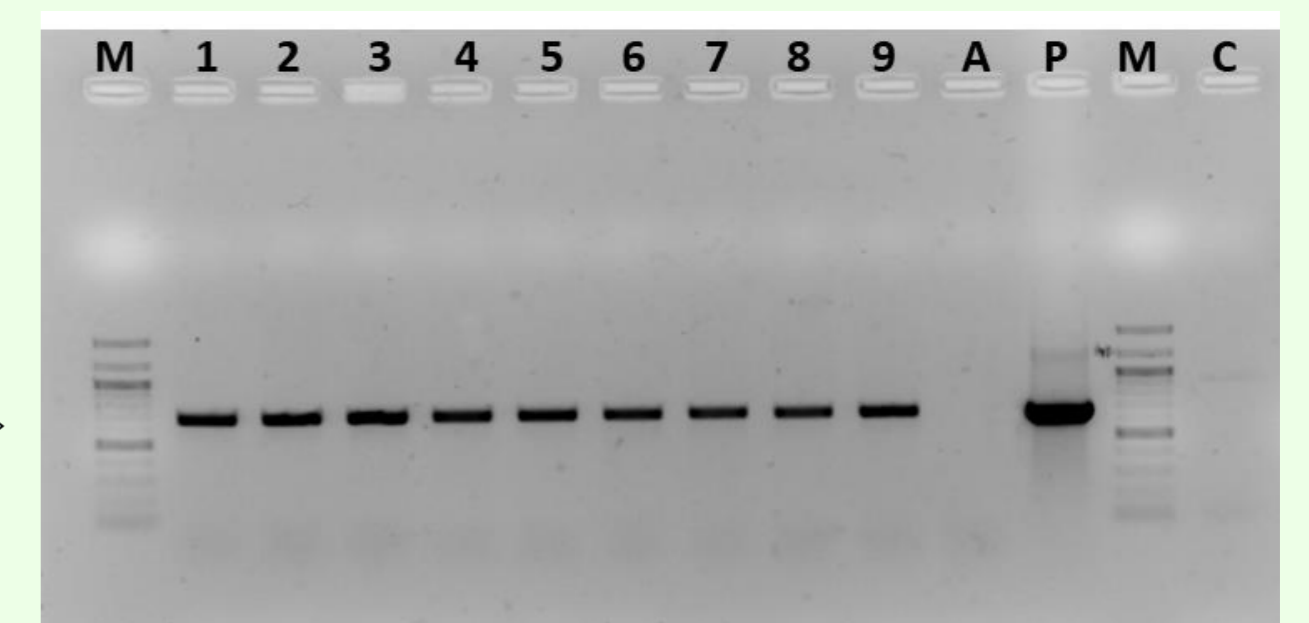


Figura 5

## CONCLUSIONES

Hemos podido obtener plantas transgénicas de *N. tabacum* con una eficiencia máxima de transformación de un 45,5% para el gen de floración temprana de *Arabidopsis*, pero es necesario más tiempo para comprobar que efectos sobre el crecimiento de las plantas se derivan de la expresión de este gen.