

Autores¹: María Franco Martínez, Luis Ortín García
Tutores: Nuria Alburquerque², Carlos Lopesino¹

¹Instituto de Educación Secundaria Infante Don Juan Manuel

²Departamento de Mejora Vegetal. Grupo de Biotecnología. CEBAS-CSIC

Introducción

Mediante ingeniería genética ha sido posible obtener cultivos transgénicos que incorporan genes interesantes desde el punto de vista agrícola o de la salud.

Los metabolitos secundarios son moléculas orgánicas presentes en las plantas que realizan diversas funciones, entre ellas de defensa contra algunos organismos patógenos. Por lo tanto, se ha investigado extensamente su posible influencia en la mejora de la calidad de vida de las personas.

Objetivos

En objetivo de este trabajo fue modificar genéticamente la planta *Nicotiana tabacum* utilizando la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* para que pueda producir resveratrol, un metabolito secundario natural presente en muchas plantas, pero no en tabaco, al que potencialmente se le atribuyen propiedades beneficiosas para salud humana.

Metodología

El trabajo consta de seis etapas:

- 1) Desinfección de las semillas de tabaco y germinación.
- 2) Crecimiento de las plantas germinadas *in vitro*.
- 3) Infección de discos de hoja con una cepa *Agrobacterium tumefaciens* que contiene un gen de resistencia a antibióticos (*nptII*), un gen chivato (*eyfp*), que codifica una proteína que emite fluorescencia al ser excitada con luz ultravioleta y una estilbeno sintasa (*sts*) que permite la síntesis de resveratrol (Figura 1).
- 4) Selección de nuevos brotes en un medio de regeneración con antibiótico y visualización de fluorescencia con un estereomicroscopio Leica MZ75.
- 5) Enraizamiento.
- 6) Extracción de ADN y análisis molecular mediante reacción PCR.

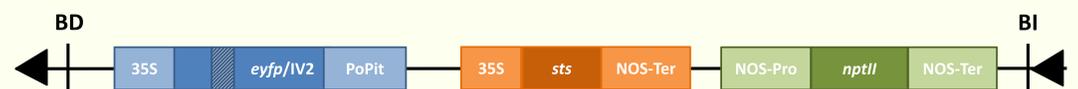


Figura 1. Esquema de la construcción molecular utilizada para obtener plantas transformadas de *Nicotiana tabacum*

Resultados

Los brotes germinados (Figura 2A) se pasaron a medio de cultivo en tarros para que crecieran adecuadamente y enraizaran (Figura 2B).

A las cuatro semanas tras la infección con *Agrobacterium tumefaciens* se midió la regeneración (aparición de nuevas yemas) siendo un 100% en los discos de hoja no infectados (control de regeneración) y un 96,7% en los infectados (Figura 2C).

La transferencia de brotes a un medio con 75 mg/L del antibiótico kanamicina permitió sólo el crecimiento y enraizamiento de los que habían incorporado el gen de resistencia al antibiótico. Además visualizamos fluorescencia en las células que habían incorporado el gen *eyfp* (Figura 2D). Se realizó una extracción del ADN de yemas supuestamente transformadas y se comprobó la presencia del transgén *sts* mediante PCR, utilizando cebadores específicos de ese gen que amplifican una banda de 140 pares de bases. Se analizaron 9 líneas y en todas ellas apareció la banda correspondiente (Figura 2E).

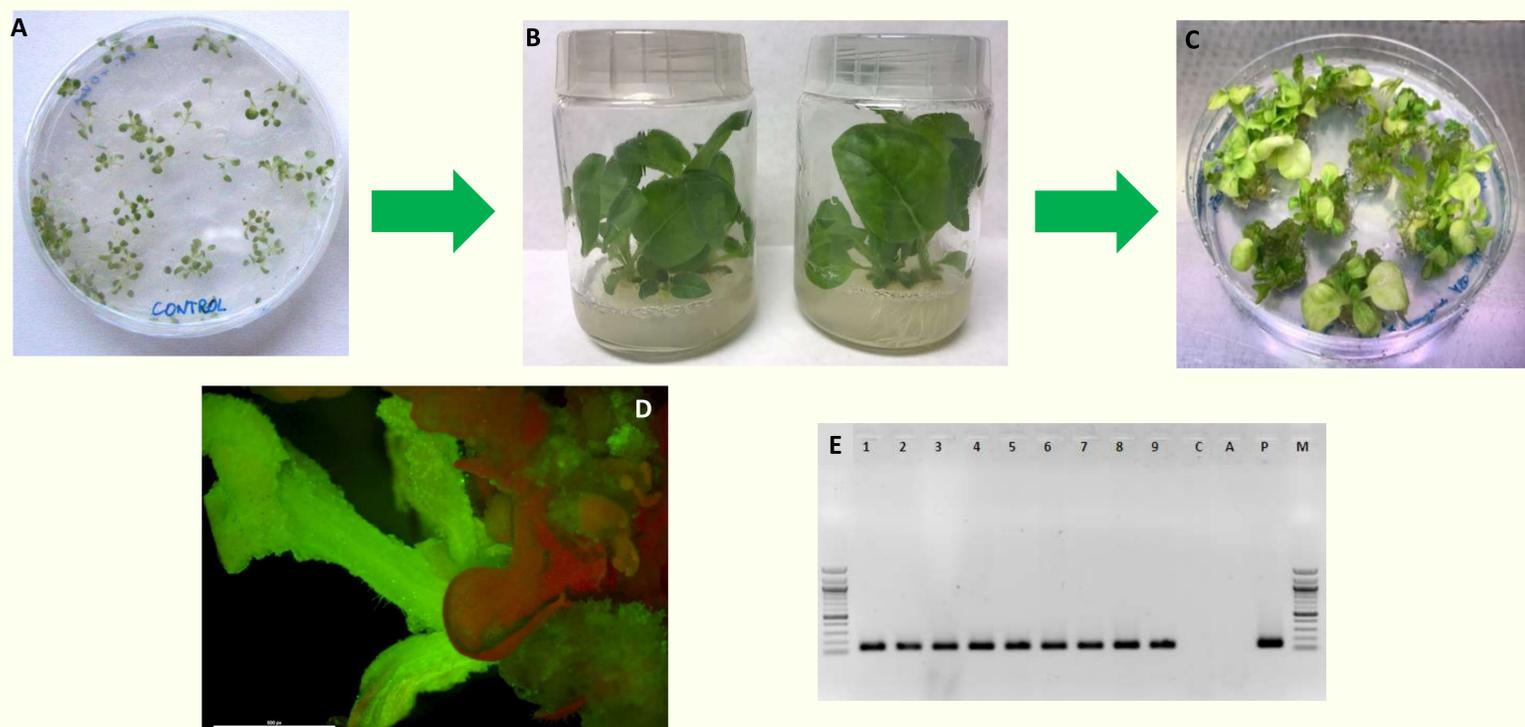


Figura 2. (A) Semillas de *Nicotiana tabacum* germinadas *in vitro*. (B) Brotes utilizados para extraer los explantos a infectar con *Agrobacterium tumefaciens*. (C) Regeneración de plantas de tabaco transgénicas a partir de discos de hoja. (D) Brotes expresando *eyfp*. La barra representa 5 mm. (E) Producto de la PCR analizado en 9 líneas de *Nicotiana tabacum* (calles 1-9). M: marcador molecular 100 pb, C: control sin transformar, A: agua, P: plásmido (control positivo)

Conclusiones

- ❖ Se han conseguido plantas transformadas de tabaco con una eficiencia de transformación del 70% (número de líneas establecidas respecto al número de discos infectados).
- ❖ En futuros experimentos se estudiará la producción de resveratrol en estas plantas.