

## TESIS DE MÁSTER

*“Eliminación del gen marcador de selección de plantas transplastómicas de tabaco mediante el sistema de recombinación cre/LOX.*

M<sup>a</sup> Estefanía Repullo Muñoz

Curso 2011-12

Director: Dr. Jon Veramendi Charola

## RESUMEN

La transformación plastidial ha tomado un gran interés en los últimos 20 años, debido a sus diversas ventajas, como lo son su carácter poliploide y su herencia materna. En este trabajo se han utilizado las variedades comerciales de *Nicotiana tabaccum* (tabaco): Havana 503-B y Virginia Gold que han sido transformadas previamente con el vector pL3, el cual incluye el gen *tiorredoxina f* y el gen marcador *aadA* (resistencia a espectinomicina y estreptomycin). Una vez transformadas todas las plantas y seleccionadas las plantas transplastómicas (transformadas a nivel del cloroplasto) en un medio con espectinomicina, se considera recomendable eliminar el gen marcador. Esta eliminación se realiza a través de la recombinasa Cre que se introduce en el genoma nuclear por medio de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*. La recombinasa Cre reconoce las regiones lox que flanquean el gen marcador *aadA* y lo elimina del genoma plastidial. Los resultados de Southern blot muestran que la eliminación del gen *aadA* se ha producido en un 34% de las plantas de variedad Havana 503-B y en un 39% de las Virginia Gold. Estas plantas son heteroplásmicas, ya que mantienen un bajo porcentaje de plastomas que incluyen el gen marcador.

## INDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Transformación plastidial	1
1.2. Genes marcadores de selección: importancia y tipos	2
1.3. Sistemas de eliminación de genes de marcadores	3
1.4. Métodos utilizados para introducir la recombinasa CRE	5
2. OBJETIVOS	7
3. MATERIALES Y MÉTODOS	8
3.1. Materiales	8
3.2. Germinación <i>in vitro</i> de semillas de tabaco	9
3.3. Individualización de plántulas	9
3.4. Transformación nuclear vía <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	9
3.5. Extracción de ADN de la planta de tabaco. Método CTAB	10
3.6. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa	10
3.7. Visualización de los productos de amplificación de la PCR en gel de agarosa	11
3.8. Trasplante a maceta	11
3.9. Southern blot	12
4. RESULTADOS	13
4.1. Regeneración de plantas tras la transformación con <i>Agrobacterium</i>	13
4.2. Análisis de las plantas transgénicas mediante PCR	13
4.3. Análisis de las plantas mediante Southern blot	18
5. DISCUSIÓN	21
6. CONCLUSIONES	23
BIBLIOGRAFÍA	24

---

## 1. Introducción

### 1.1. Transformación plastidial

Durante muchos años, las tecnologías transgénicas para las plantas han estado restringidas solamente a la manipulación del genoma nuclear. En los últimos 20 años, ha despertado mayor interés el genoma del plastidio debido a las distintas ventajas que presenta, como son la alta expresión del transgén y la herencia materna de los plastidios.

El plastidio es un orgánulo celular, que posee su propio genoma y maquinaria de transcripción-traducción. El genoma del plastidio (plastoma) está formado por una molécula de ADN circular, altamente poliploide, con un tamaño de 120-160 kb y que codifica aproximadamente 130 genes. Su tamaño es muy pequeño comparado con el genoma nuclear, pero constituye hasta un 10-20% del ADN total (Bock, 2001).

El plastoma se organiza en *nucleoides* (varias moléculas de ADN asociadas a la membrana). Considerando que en cada cloroplasto puede haber entre 10 y 14 nucleoides, en función del tipo celular, y que una célula del mesófilo de la hoja contiene alrededor de 100 cloroplastos, se calcula que en una misma célula puede haber del orden de 10.000 copias del plastoma (Bendich, 1987; Thomas y Rose, 1983).

La primera transformación plastidial se realizó en una alga unicelular, *Chlamydomonas reinhardtii* (Boynton et al., 1988), y dos años más tarde se aplicó con éxito en *Nicotiana tabacum* L. (tabaco) (Svab et al., 1990a, 1990b). Para transformar una célula vegetal es necesario superar varias barreras físicas, como son la pared celular, el citoplasma y la doble membrana plastidial del cloroplasto. Por ello, se desarrollaron dos métodos de transformación plastidial: el proceso biolístico mediante bombardeo de partículas (Sanford et al., 1991) y el tratamiento con polietilenglicol (PEG).

El proceso biolístico consiste en el bombardeo de tejidos o células con microproyectiles (0,6-1  $\mu\text{m}$  de diámetro) cubiertos de ADN a una velocidad suficiente como para atravesar la pared celular e introducirlo dentro de las células. Estos microproyectiles son de un material inerte (oro o tungsteno) y son lanzados a propulsión por medio del gas inerte helio, generalmente colocados sobre un macroproyectil. El tratamiento con PEG, por su parte, consiste en la exposición de los protoplastos al PEG, el cual induce la formación de poros en las membranas celulares, facilitando la entrada del vector transformante (O'Neill et al., 1993).

---

Después de haber introducido el ADN foráneo mediante uno de estos métodos, éste se integra en el plastoma de una manera estable tras varios eventos de recombinación homóloga (Kavanagh et al., 1999), lo que da lugar a lo que se denomina heteroplasma: coexistencia de un bajo número de plastidios transformados junto con plastidios no transformados en la misma célula. El número de plastidios transformados se puede aumentar mediante un medio selectivo, normalmente suele ser un medio con antibióticos, tras varios ciclos de regeneración; se estima que la homoplasma (todos los plastomas de un plastidio y todos los plastidios de la célula transformados) se alcanza tras aproximadamente unas 20 divisiones celulares (Maliga, 2004).

Como ya se ha comentado, la transformación plastidial presenta distintas ventajas con respecto a la transformación nuclear, como lo es una elevada expresión del transgén debido al carácter poliploide del genoma plastidial. Normalmente la proteína recombinante se acumula entre un 5-25 % del total de las proteínas solubles (Daniell, 2006; Maliga, 2003). Por otro lado la naturaleza policistronica de la expresión de los genes en los plastidios permite la expresión de varios transgenes en un mismo operón (De Cosa et al, 2001; Quesada-Vargas et al, 2005). Otra ventaja de esta técnica es la herencia materna de los plastidios que evita el flujo de transgenes entre especies sexualmente compatibles vía polen (Hagemann, 2004). También, la integración dirigida del transgén por recombinación homóloga reduce los posibles efectos de posición, como es el silenciamiento del gen endógeno (Daniell, 2006; Ruf et al, 2001).

### *1.2. Genes marcadores de selección: importancia y tipos*

Estos genes son muy útiles a la hora de seleccionar aquellos tejidos y plantas que han sido transformados. Normalmente, se introduce un gen marcador de resistencia a un antibiótico junto con el gen de interés en las plantas. Al cultivar el explanto en un medio de cultivo que incluye el antibiótico sólo sobrevivirán y regenerarán plantas aquellas células que se hayan transformado ya que contendrán dicho gen de resistencia. En este paso es donde se pretende conseguir plantas homoplásmicas para el material genético transformado.

Existen varios genes marcadores de selección. Los primeros que se utilizaron fueron genes mutados, tales como el gen *16S rRNA* (*rrn16*, resistente a espectinomicina o estreptomicina) y el gen *rps12* (resistente a estreptomicina). La mutación presente en estos genes altera la estructura ribosomal, evitando la unión del antibiótico (Koop et al.,

2007). El gen más utilizado hoy en día es el gen *aadA* de *Escherichia coli*, debido a la gran eficacia que presenta en el proceso de selección (Svab y Maliga, 1993). El medio con antibiótico inhibe la división celular y la formación de brotes en los clones no transformados (Maliga, 2004). Posteriormente, se han desarrollado otros marcadores mas novedosos, como el denominado gen áureo *aadA* (Tungsuchat-Huang et al., 2011). Este gen marcador incluye el gen marcador de selección *aadA* y además interfiere postranscripcionalmente con la expresión del gen plastidial *clpP1*, apreciándose una deficiencia en la pigmentación de los plastidios no transformados, que permite llevar a cabo una selección visual de las plantas transformadas.

La Tabla 1 muestra algunos de los genes marcadores más utilizados. Además, existen marcadores de selección secundaria, que normalmente suelen ser genes que confieren resistencia a herbicidas. No se ha conseguido, hasta la fecha, utilizar estos marcadores como agentes únicos de selección en la transformación plastidial.

*Tabla 1. Principales genes empleados como marcadores de selección.*

<b>Gen</b>	<b>Proteína</b>	<b>Referencia</b>
<i>aadA</i>	Aminoglucósido 3' adenil-transferasa	Svab et al., 1990b
<i>nptII</i>	Neomicina fosfotransferasa II	Carrer et al., 1993
<i>codA</i>	Citosina deaminasa	Serino y Maliga, 1997
<i>cat</i>	Cloranfenicol acetiltransferasa	Daniell et al., 1990
<i>gfp</i>	Green fluorescent protein	Hibberd et al., 1998
<i>aadA-gfp</i>	Unión de <i>aadA</i> y <i>gfp</i>	Khan y Maliga, 1999
<i>aadA (au)</i>	Deficiencia en pigmentación y <i>aadA</i>	Tungsuchat-Huang et al., 2011

### *1.3. Sistemas de eliminación de genes marcadores*

El principal objetivo de este trabajo es la eliminación del gen marcador, debido a que su presencia puede generar ciertas desventajas a la planta: por un lado, su expresión genera una carga metabólica adicional e innecesaria a las plantas transplastómicas, por otro, su presencia genera una escasez de los marcadores selectivos primarios en los

---

plastidios caso de querer realizar una retransformación, y por último, la posible transmisión de un marcador de este tipo a otros organismos, como bacterias patógenas, puede suponer un riesgo para la salud y una oposición de la sociedad ante el producto transgénico (Lutz y Maliga, 2007). De hecho, la Agencia Europea de Seguridad Alimentaria clasifica al gen *aadA* dentro del grupo 2, es decir, genes marcadores de resistencia a antibióticos que aún pueden ofrecer utilidades concretas en terapia humana y/o animal, para los que se aconseja restringir el empleo de los mismos exclusivamente al ámbito experimental. Esto excluye una hipotética autorización para la comercialización.

Antes de eliminar el gen marcador se tiene que alcanzar el estado de homoplasma en las plantas transplastómicas. Existen distintos sistemas de eliminación de genes marcadores, siendo el más estudiado y empleado el sistema de recombinación Cre/lox. El objetivo de este sistema es introducir la recombinasa Cre en la planta, para que esta reconozca las regiones lox del genoma plastidial y elimine el fragmento de ADN flanqueado por ambas regiones. Las regiones lox son secuencias de recombinación, constituidas por 34 nucleótidos, y se han introducido en el vector de transformación flanqueando al gen marcador de selección. La recombinasa Cre (**C**yclization **R**ecombination), derivada del bacteriófago P1, es una herramienta muy útil en biología molecular, ya que presenta ventajas como el reconocimiento de secuencias de forma única y específica (en este caso las regiones lox) y su gran capacidad para actuar en un amplio rango de organismos. Esta recombinasa actúa de distinta manera según la orientación de las regiones lox. Si las dos regiones lox que comprenden una secuencia están orientadas en el mismo sentido, esta secuencia es eliminada del genoma; en cambio si las regiones lox están orientadas en sentido opuesto, se invierte la secuencia (Hajdukiewicz et al., 2001). El gen *Cre* se inserta en el genoma nuclear y se puede dirigir hacia el cloroplasto, mediante un péptido de tránsito (por ejemplo el de la Ribulosa bifosfato carboxilasa) que está fusionado en su extremo N terminal.

Hay otro sistema que tiene el mismo mecanismo que el método Cre/lox, pero con la particularidad de que está compuesto por una integrasa, denominada phiC31, y por las regiones de recombinación attB/attP; al no ser estas regiones homólogas, este sistema presenta una mayor estabilidad. (Lutz et al., 2003)

---

Aparte de los dos sistemas anteriormente mencionados, hay otras formas de eliminar los genes marcadores, como son la escisión del gen marcador basada en la homología de secuencias repetidas, la cointegración transitoria de un gen marcador, o la cotransformación-segregación de vectores independientes (Lutz y Maliga, 2007). Cada una de ellos presenta una estrategia distinta:

- Cotransformación de dos vectores independientes: se basa en la introducción del gen de interés y del gen marcador de selección en el genoma plastidial mediante dos vectores independientes. Estos genes se integran en diferentes puntos del plastoma. De esta manera, el gen marcador se eliminará mediante segregación, obteniéndose líneas que no contengan este gen (Carrer y Maliga, 1995).

- Homología de secuencias repetidas: este método consiste en eliminar cualquier fragmento de ADN que esté flanqueado por dos secuencias repetidas directamente mediante recombinación homóloga (Lutz y Maliga, 2007). Esto se demostró en el tabaco mediante la construcción de un vector con tres transgenes: el gen *uidA*, el gen marcador *aadA* y el gen de resistencia a herbicidas *bar* (Iamtham y Day, 2000).

- Cointegración transitoria: se parte de una planta transplastómica mutada (carente de pigmentación), por la sustitución de un gen implicado en la pigmentación de la planta (*rpo A*) por el gen de resistencia *aadA*. En ella, se integra un vector con un gen de interés junto con el gen *rpo* entre las zonas recombinantes y un gen marcador (*aphA-6*) fuera de esas zonas, formando una estructura cointegrativa que se mantiene mediante selección en un medio con antibiótico (kanamicina). Si se para la selección, se produce una segunda recombinación que da lugar a la eliminación del gen marcador y se expresa el gen de interés junto con *rpo*, dando un color verde (Lutz y Maliga, 2007). Mediante este método se evita los falsos positivos, es decir plantas que han sido regeneradas en el medio con antibiótico pero no se han transformado.

#### *1.4. Métodos utilizados para introducir la recombinasa Cre*

Para la eliminación del gen marcador, es necesaria la introducción de la recombinasa Cre en el interior de las células vegetales. Este proceso se puede llevar a cabo mediante distintos métodos, que son:

##### *Nuclear*

Un método ampliamente utilizado es la transformación nuclear. En este caso, el gen se introduce en el núcleo de la planta transplastómica mediante transformación por



---

*Agrobacterium tumefaciens*. Esta bacteria presenta una alta capacidad de infección y lo hace en un amplio rango de organismos. El gen *Cre* se eliminará mediante segregación en la descendencia (Gilbertson, 2003).

#### *Polinización*

Se basa en polinizar las plantas transplastómicas con una planta a la que se ha introducido el gen *Cre* mediante transformación nuclear.

#### *Transitoria*

En este método el gen *Cre* no se integra en el genoma nuclear, sino que el gen se expresa de forma transitoria. *Agrobacterium tumefaciens* se introduce en los explantos de hoja mediante agroinfiltración a vacío (Johansen et al, 2001). Mediante este sistema la recombinasa se va a expresar durante 2 o 3 días. Este método presenta la ventaja de que no hace falta eliminar el gen *Cre* del núcleo ya que no se ha integrado en él y, debido a su corto periodo de acción, reduce las posibilidades de que se eliminen otras regiones de ADN no deseadas.

---

## 2. Objetivos

El objetivo principal de este trabajo es la eliminación del gen marcador (*aadA*) en plantas transplastómicas de tabaco a las que se ha introducido el gen *tiorredoxina f*. Los objetivos específicos pueden resumirse de la siguiente manera:

1.- Introducción de la recombinasa *Cre* mediante transformación nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens*.

2.- Regeneración de transformantes nucleares por cultivo *in vitro*.

3.- Caracterización de las plantas regeneradas mediante PCR y Southern blot, para comprobar la correcta eliminación del gen marcador.

---

### 3. Materiales y métodos

#### 3.1. Materiales

##### *Material vegetal*

En este trabajo se van a utilizar como material de partida dos variedades comerciales de *Nicotiana tabaccum*: Havana 503-B (503) y Virginia Gold (Vir). Ambas variedades están transformadas con el gen *tioredoxina f* y el gen marcador *aadA* mediante el vector pL3.

##### *Medios de cultivo*

Medios para la germinación, crecimiento, formación de raíces y diferenciación celular:

- Medio P3 con espectinomicina: sales MS (Murashige y Skoog, 1962) con vitaminas, 30 g/l de sacarosa, 6 g/l de microagar (Duchefa), pH 5,8.
- Medio T1: sales MS con vitaminas, 20 g/l de sacarosa, 0,2 mg/l de ácido indolacético (AIA), 2,2 mg/l de benciladenina (BA), 8 g/l de agar, 250 mg/l de cefotaxima, 50 mg/l de kanamicina, pH 5,8.
- Medio T2: Igual que T1 pero sin benciladenina.
- Medio MS sólido: sales MS con vitaminas, 6 g/l de microagar, pH 5,8. En este medio se realiza el cocultivo del *Agrobacterium* con los explantos.
- Medio líquido de MS: sales MS con vitaminas, 20 g de sacarosa, 6 g/l de microagar, pH 5,8. En este medio se resuspende *Agrobacterium*, para luego realizar el cocultivo de la bacteria con los explantos de hoja.

El medio que se usa para el crecimiento y multiplicación del *Agrobacterium* es:

- Medio LB líquido con kanamicina y rifampicina (50µg/ml).

##### *Vectores de transformación*

En la transformación nuclear con el gen *Cre* se emplea la bacteria *Agrobacterium tumefaciens*: cepa GV 3101.

La Figura 1 muestra el vector pBin20-Rubisco ssCRE que se utiliza en la transformación nuclear del tabaco. Este vector contiene la recombinasa Cre, fusionada a la secuencia del péptido señal de la subunidad pequeña de la Ribulosa bifosfato

carboxilasa (RuBisCo). Este péptido señal tiene como función conducir a la recombinasa Cre al plastidio, para poder eliminar el gen *aadA* del genoma plastidial. Otro gen importante es el *nptII*, que confiere resistencia a la Kanamicina, y que se emplea para seleccionar las plantas que han integrado el gen *Cre* en el genoma del núcleo.



Figura 1. Vector *pBin20-Rubisco ssCRE* de la transformación nuclear de tabaco. *Rbcossupt::CRE*: péptido señal de la subunidad pequeña de la RuBisCo fusionado a la región codificante de CRE; *nptII*: gen de resistencia a la kanamicina; RB y LR: bordes derecho e izquierdo del T-ADN; *cre1* y *cre2*: sondas del gen Cre, sonda Cre forward y sonda Cre reverse.

### 3.2. Germinación in Vitro de semillas de tabaco

Las semillas de tabaco (Havana 503-B y Virginia Gold) deben de ser desinfectadas y manipuladas en una cabina de flujo laminar para evitar posibles contaminaciones. Estas se ponen a germinar en el medio P3 con espectinomicina y se cultivan en la cámara de cultivo hasta que se formen plántulas.

### 3.3. Individualización de plántulas

En este paso se individualizan las plántulas después de 2 ó 3 semanas en un medio P3 con espectinomicina, para que puedan desarrollarse y compitan lo menos posible por el espacio o los nutrientes. Después de la individualización se cultivan nuevamente las plántulas en la cámara de cultivo.

### 3.4. Transformación nuclear vía *Agrobacterium tumefaciens*

De las plántulas se seleccionan hojas bien desarrolladas y de color verde oscuro, y se trocean en fragmentos de 5x20 mm obteniendo explantos de las hojas. Estos explantos, que incluyen parte del nervio central, se cultivan en un medio MS sólido con

---

el haz de la hoja en contacto con el medio de cultivo y se realiza un cocultivo con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens*. Después de unos 15 minutos, se extrae el cultivo de *Agrobacterium* y se cultivan las placas en oscuridad a 28 °C. Tras 2 días en la cámara de cultivo, se subcultivan los explantos en el medio T1. Este medio contiene los antibióticos cefotaxima, que se encarga de inhibir el crecimiento del *Agrobacterium*, y kanamicina, que permite la división de las células vegetales que han sido transformadas. En todo el proceso se utiliza unos controles de transformación y de regeneración: control positivo (explantos de *Petite Havana* transformado y explantos sin transformar en medio T1 sin antibiótico) y un control negativo (explantos sin transformar en medio T1).

Los explantos se van a subcultivar cada 7 días en un medio T1 fresco. En este paso se va a desarrollar una masa vegetal denominada callo y de él van a derivar unas yemas que van a formar brotes. Estos brotes se individualizan y se cultivan en un medio T2, donde se forman las nuevas plántulas y se desarrollan las raíces. Luego se trasplantan las plántulas a un jiffy, que es un alveolo con una mezcla de tierra y perlita y se dejan en el fitotrón (25°C, fotoperiodo: 16h luz, 8h oscuridad).

### 3.5. Extracción de ADN de la hoja de tabaco. Método CTAB

Se emplea un Microdesmembrador (*MikroDismembrator U*, Sartorius AG, Goettingen, Alemania) para pulverizar las hojas del tabaco, tanto de la planta silvestre como de la transgénica. En este proceso las muestras se deben mantener en frío (poniendo en contacto el eppendorf con nitrógeno líquido) para conservar el ADN intacto. En la extracción de ADN se emplea el método de Bromuro de cetiltrimetilamonio (CTAB) descrito por Murray y Thompson (1980) y la cuantificación se realiza mediante un espectrofotómetro *Eppendorf BioPhotometer* (Hamburgo, Alemania).

### 3.6. PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

Mediante esta técnica se va a amplificar un fragmento específico del gen *aadA*, del gen de la *tiorredoxina f* (*trx f*) y del gen *Cre*. Las reacciones de la PCR requieren de varios compuestos: tampón, MgCl<sub>2</sub>, Cebadores (*Reverse*, *Forward*), dNTPs, Taq polimerasa, H<sub>2</sub>O MilliQ, y se producen en un termociclador *Eppendorf* (Hamburgo, Alemania). Para cada reacción se va a usar una pareja distinta de cebadores: para el gen *aadA*, se emplean los cebadores *YaadA* sense y *YaadA* antisense; para *trx f*, *trx f*

forward y trxf reverse; y para el gen *Cre*, Cre forward y Cre reverse (Tabla 2). Para cada pareja de cebadores hay un programa de amplificación distinto.

Tabla 2. Cebadores utilizados en las PCR.

Cebadores	Secuencia	Gen	Tamaño de la secuencia
YaadA sense	5'ATGGCGGCCTGAAGCCACAC3'	aadA	519 pb
YaadA antisense	5'CCCAGTCGGCAGCGACATCC3'		
trxf forw	5'CCATGGGTCACCATCACCATCA CCATAGCTCCGATGCTACTG3'	trxf	384 pb
trxf rev	5'GCGGCCGCTTAACTTGAC CGCACATCCTCAATTG3'		
Cre forw	5'CAGGTGTGGCCAATGT CCAATTTACTGACCG3'	Cre	1030 pb
Cre rev	5'GGGTCTAGACTAATCG CCATCTTCCAGCAG 3'		

### 3.7. Visualización de los productos de amplificación de la PCR en gel de agarosa

Se cargan 30 µl de muestra (junto con los controles y el marcador) en cada pocillo de un gel de agarosa (0,8%) y se le aplica una corriente eléctrica de 80 V. En este paso se separan los fragmentos de ADN amplificados en función de su tamaño. Los distintos fragmentos se visualizan en un transiluminador de luz UV y se le toma una foto mediante un sistema de imagen molecular Chemi-Doc XRS system (Syngene G-Box)

### 3.8. Trasplante a maceta

En función de los resultados obtenidos en la PCR, se trasplantan a maceta las plantas que no contengan el gen *aadA*, que es el principal objetivo de este trabajo. Una vez trasplantadas, se riegan y se dejan en el fitotrón (25°C, fotoperiodo: 16h luz, 8h oscuridad) a unas condiciones controladas de temperatura y fotoperiodo.

---

### 3.9. Southern blot

Un total de 20 µg de ADN de cada una de las muestras se digieren con la enzima de restricción *Bgl*III. De esta digestión se obtienen distintos fragmentos, que se separan mediante electroforesis (70 V) en un gel de agarosa (0,7%) y se transfieren a una membrana de nylon (Nytran N; Whatman, Springfield Mill, UK). Se emplean distintas sondas para los distintos fragmentos del ADN en la hibridación: gen *aadA*, sonda *aadA*; *tiorredoxina f*, sonda *tiorredoxina*; zona recombinante, sonda HS. La membrana se hibrida mediante un sistema de marcaje y de detección directa por quimioluminiscencia DIG High Prime ADN Labeling and Detection Starter Kit II (Roche Applied Science Penzberg, Alemania).

---

## 4. Resultados

### 4.1. Regeneración de plantas tras la transformación con *Agrobacterium*

Después de la transformación nuclear con el gen *Cre* se individualizaron 115 brotes, de los cuales 69 eran de la variedad 503 y 46 de la variedad Vir. En esta fase se observó que la variedad Vir se desarrollaba más lentamente que la 503 en el cultivo en medio T1, por lo que la cantidad de brotes obtenidos fue menor. De esos brotes se desarrollaron plántulas, las cuales se trasplantaron a contenedor tipo jiffy: 32 plántulas de 503 y 19 plántulas de Vir. Posteriormente estas plántulas serán analizadas mediante las técnicas de PCR y Southern blot.

### 4.2. Análisis de las plantas transgénicas mediante PCR

Se examinaron mediante PCR todas las plantas viables. Tanto en el caso de la variedad 503 como para Vir, se realizaron tres PCR a cada una, para los siguientes genes: *aadA*, *tiorredoxina f* y *Cre*. En cada una de las diferentes PCR realizadas, se obtendrá una banda distinta en el gel de agarosa, de acuerdo al tamaño de la secuencia del gen amplificado (Tabla 2). En la realización de esta técnica, se ha empleado como control positivo una planta transformada plastidialmente con el gen *tiorredoxina f*, además de dos controles negativos: una planta sin transformar (*Petite Havana*) y otro control negativo sin ADN.

#### *Variedad 503*

- Gen *aadA*

En la Figura 2, se observa que hay muestras que presentan el gen *aadA* y otras que no lo presentan. Concretamente, se han obtenido 7 plantas transplastómicas sin el gen *aadA* (nº 2, 6, 10,17, 20, 21, 22). En las muestras donde hay presencia del gen, se puede suponer que el gen *Cre* no se ha expresado bien, produciendo una recombinasa inactiva, o bien no se ha expresado el tiempo suficiente como para eliminar el *aadA*. En cambio en las muestras donde no presenta el gen *aadA*, el gen *Cre* se ha expresado de forma estable, eliminando al gen marcador. La banda que indica la presencia del gen es de 519 pb (Tabla 2).



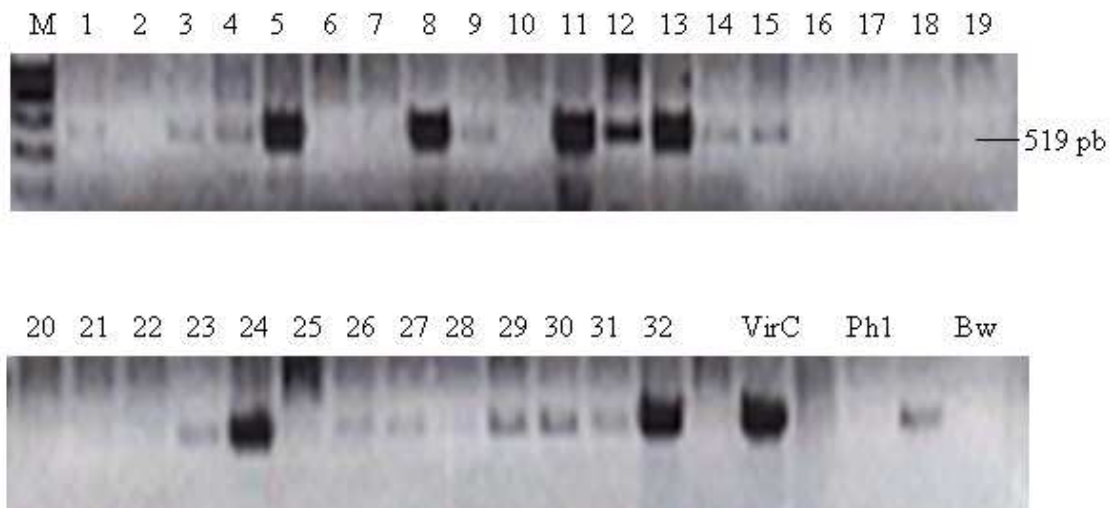


Figura 2. Resultado de la PCR para el gen *aadA* en gel de agarosa para la variedad 503. M: marcador de peso molecular; VirC (control positivo): planta transformada plastidialmente; Ph1 (control negativo): Petite Havana 1; Bw (control negativo): agua milliQ sin ADN; 1-32: muestras de la variedad 503.

- Gen *trxf*

En la Figura 3, se observa la banda de 384 pb correspondiente al gen de la *tiorredoxina f* en todas las muestras. Este control se realiza para comprobar que el gen de interés no se ha perdido tras la transformación nuclear.

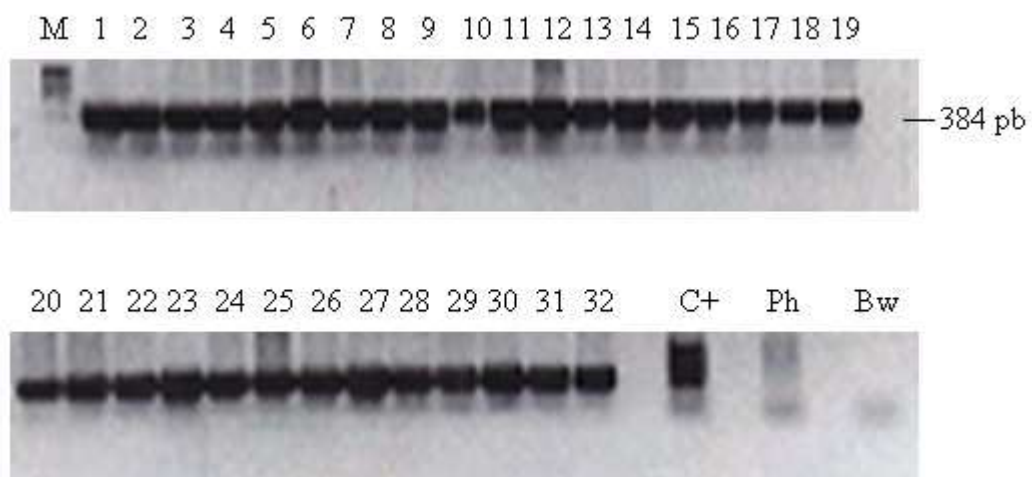


Figura 3. Resultado de la PCR para el gen *trxf* en gel de agarosa para la variedad 503. M: marcador de peso molecular; C+ (control positivo): planta transformada plastidialmente; Ph (control negativo): Petite Havana; Bw (control negativo): agua milliQ sin ADN; 1-32: muestras de la variedad 503.

- Gen *Cre*

Se espera que todas las muestras contengan el gen *Cre* ya que han sido transformadas por *Agrobacterium*. La PCR muestra que esto no ocurre en todos los casos (Figura 4). La causa posible puede ser que no se haya producido la integración en el genoma del núcleo y el gen se haya degradado. En el caso de que esté presente el gen *Cre*, se observa en el gel de agarosa una banda de 1030 pb.

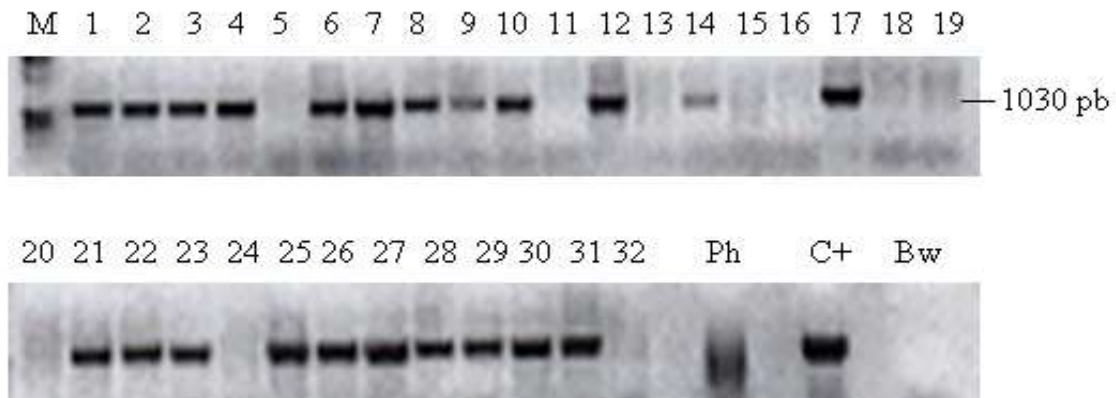


Figura 4. Resultado de la PCR para el gen *Cre* en gel de agarosa para la variedad 503. M: marcador de peso molecular; C+ (control positivo): vector de transformación que lleva el gen *Cre* diluido 1:20 (Agro 1:20); Ph (control negativo): *Petite Havana*; Bw (control negativo): agua milliQ sin ADN; 1-32: muestras de la variedad 503.

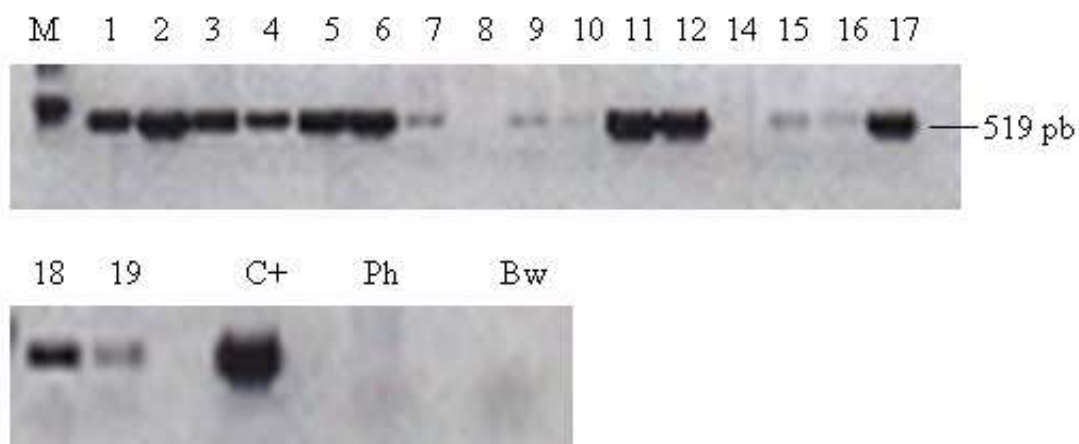
Comparando los resultados del gen *aadA* con los del gen *Cre*, se observan diferentes casos. Por un lado, puede ocurrir que la muestra contenga el gen *aadA* y además el *Cre* (por ejemplo, en las plantas n° 8, 9 y 12). Esto puede deberse a que la recombinasa *Cre* expresada sea inactiva. Por otro lado puede ocurrir que las muestras no contengan el gen *aadA* ni tampoco el gen *Cre* (planta n° 20); esto posiblemente es debido a que el gen *Cre* se haya expresado sólo de forma transitoria sin haberse integrado en el genoma nuclear. Por último, también se puede observar que hay muestras que contienen el gen *aadA* pero no el *Cre* (por ejemplo, en las plantas n° 5 y 11), lo cual puede deberse a escapes, es decir, plantas que se han desarrollado en presencia del agente de selección a pesar de no haber recibido los transgenes.

---

*Variedad Vir*

- Gen *aadA*

En la Figura 5, se observa que hay muestras sin el gen *aadA* y otras con dicho gen. Se han obtenido 2 plantas transplastómicas sin el gen *aadA* (plantas n° 8 y 14). Estos resultados se comprobarán de forma más concluyente mediante un Southern blot. La planta n° 13 no fue estudiada al morir antes de realizar la PCR.



*Figura 5. Resultado de la PCR para el gen aadA en gel de agarosa para la variedad Vir. M: marcador de peso molecular; C+ (control positivo): planta transformada plastidialmente; Ph (control negativo): Petite Havana; Bw (control negativo): agua milliQ sin ADN; 1-12 y 14-19: muestras de la variedad Vir.*

- Gen *trxf*

La Figura 6A muestra los resultados de las PCR realizadas para las plantas sin el gen *aadA* y para las plantas con baja intensidad de banda correspondiente a dicho gen, según la Figura 5. Se detectó la *tiorredoxina f* en todas las muestras excepto en la n° 14, motivo por el cual se realizó una segunda PCR para esa planta (Figura 6B). En esta segunda PCR sí que se detecta la banda de 384 pb, confirmando que todas las muestras presentan el gen *trxf*, con lo cual no lo han perdido tras la transformación nuclear.

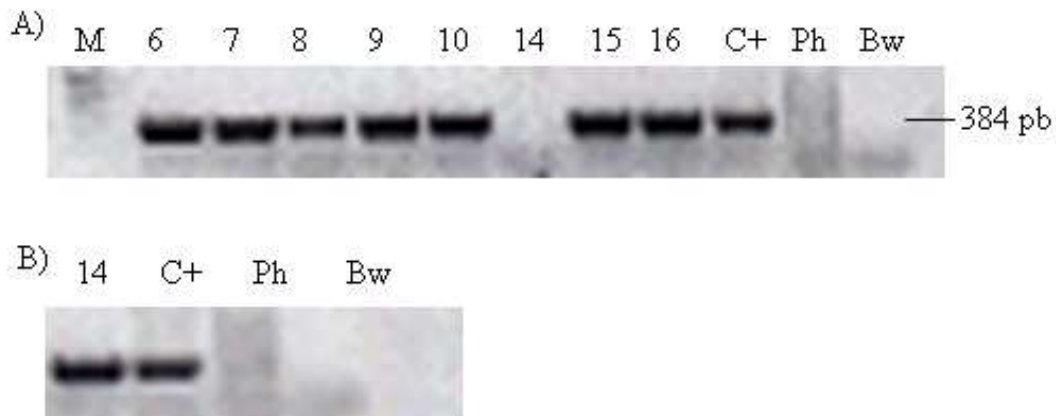


Figura 6. Resultado de la PCR para el gen *trxf* en gel de agarosa para la variedad *Vir*. A) 1° PCR que se realizó. M: marcador de peso molecular; C+ (control positivo): planta transformada plastidialmente; n° 6 (control positivo): muestra de la variedad *Vir*; Ph (control negativo): *Petite Havana*; Bw (control negativo): agua milliQ sin ADN; 7-10 y 14-16: muestras de la variedad *Vir*. B) 2° PCR para la muestra n° 14. Los controles son los mismos que los de la 1° PCR, a excepción del control positivo n° 6.

- Gen *Cre*

En la Figura 7 se aprecian muestras sin el gen *Cre*, lo cual posiblemente se debe a escapes en el proceso de la selección de plantas que no han recibido los transgenes o que ha expresado la recombinasa *Cre* y se ha degradado. Si se comparan los resultados del gen *aadA* con los del gen *Cre* se observan distintas situaciones, como se ha mencionado anteriormente para la variedad 503. Los resultados de los estudios de PCR serán confirmados en los posteriores análisis mediante la técnica Southern blot.



Figura 7. Resultado de la PCR para el gen *Cre* en gel de agarosa para la variedad *Vir*. M: marcador de peso molecular; C+ (control positivo): vector de transformación que lleva el gen *Cre* diluido 1:20 (*Agro1*:20); Ph (control negativo): *Petite Havana*; Bw (control negativo): agua milliQ sin ADN; 6-10 y 14-16: muestras de la variedad *Vir*.

### 4.3. Análisis de las plantas mediante Southern blot

Mediante esta técnica se comprueba de una manera más concluyente si las plantas presentan o no el gen *aadA*, el gen de *tiorredoxina f* y las zonas flanqueantes de recombinación. Además, mediante el Southern blot se puede detectar si existe o no heteroplasmia en las plantas.

El Southern blot se realizó para las muestras que son negativas para la PCR del gen *aadA* y también para las que presentan una banda débil.

- Gen *aadA*

Los resultados para el gen *aadA* confirmaron que ni las plantas PCR negativas ni las que presentan una débil banda (503: n° 7, 16, 25, 28; Vir: n° 7, 9, 10, 15, 16) presentaban dicho gen (Figura 8). En base a estos resultados, se puede determinar el porcentaje de éxito del proceso: para la variedad 503 se obtuvieron 11 plantas sin el gen de resistencia de un total de 32 iniciales, lo que supone un rendimiento del 34 %; en cambio para la variedad Vir se obtuvieron 7 plantas sin el gen *aadA* de 18 plantas analizadas (de las 19 iniciales), lo cual da un 39 % de rendimiento. Por lo tanto se puede apreciar que para la variedad Vir, el porcentaje de éxito es ligeramente superior al de 503, para este sistema de eliminación.

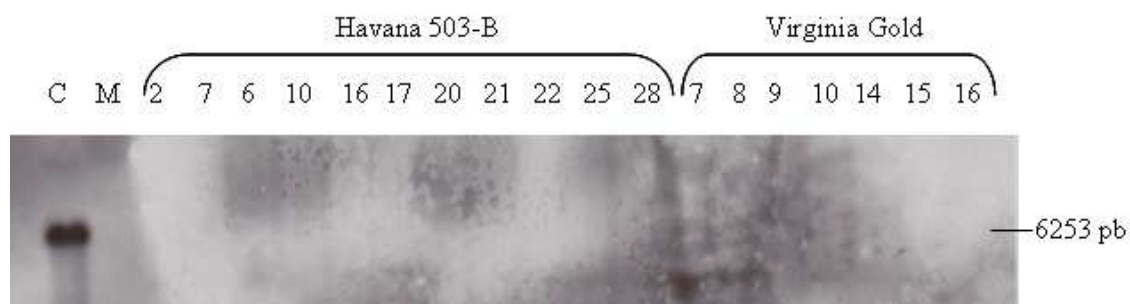


Figura 8. Resultado del Southern blot para las variedades 503 y Vir utilizando como sonda un fragmento del gen *aadA*. La presencia del gen de estudio se muestra por la aparición de una banda de 6253 pb. C (control positivo): planta transformada plastidialmente; M: marcador de peso molecular; el resto son muestras de la variedad 503 y Vir como se indica en la figura.

En la Figura 9A se muestran el vector pL3-PrnG10L-Trxf con las dianas de restricción donde se produce la digestión con la enzima *Bgl*III en el ADN plastidial. La digestión con la enzima *Bgl*III (183-6436 pb) genera un fragmento de 6253 pb y otro

fragmento de 1836 pb. En el caso de que se utilice una sonda para el gen *aadA* se obtendrá un fragmento de 6253 pb; esto mismo se obtendrá si se emplea una sonda para las zonas recombinantes (ZRI y ZRD) y para el gen *tiorredoxina f*. En la Figura 9B se muestra el vector pL3-PrrnG10L-Trxf pero sin el gen *aadA* (1350 pb). Tras la digestión con *Bgl*II del genoma plastidial se detectan mediante sonda el gen *tiorredoxina f* y las zonas recombinantes dando un tamaño de banda de 4903 pb.

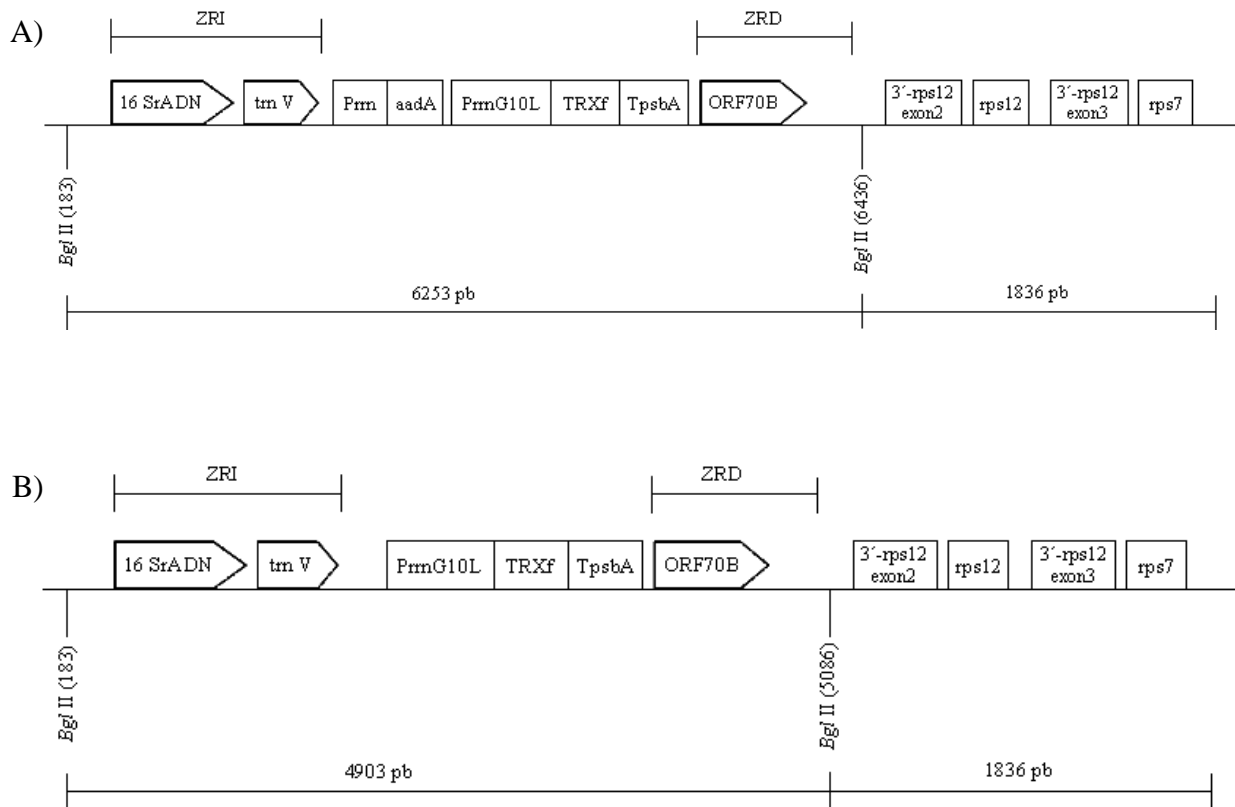


Figura 9. A) Southern pL3-PrrnG10L-Trxf (8089 pb). TRX f: *tiorredoxina f*; Prm: promotor del gen *aadA*; *aadA*: gen que confiere resistencia a espectinomicina y estreptomicina; PrmG10L: promotor de la Trxf; TpsbA: terminador del gen *psbA*; ZRI y ZRD: zonas de recombinación izquierda y derecha respectivamente. B) Southern pL3-PrrnG10L-Trxf (8089 pb) sin el gen de resistencia *aadA*.

- Gen *trxf*

El Southern blot que se realizó para el gen *tiorredoxina f* presentaba una banda de 4903 pb. Este resultado sugiere que dicho gen está presente en el genoma plastidial de las diferentes muestras y el tamaño de la banda nos indica que el gen *aadA* no está

presente en dicho genoma. Por lo tanto mediante este resultado se está demostrando nuevamente la ausencia del gen *aadA* (Figura 10).

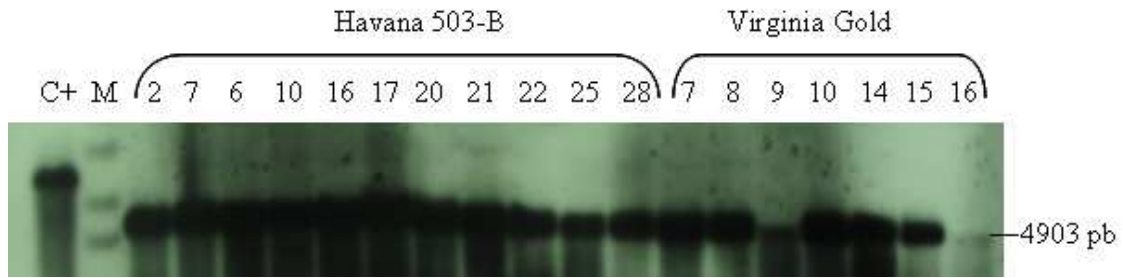


Figura 10. Resultado del Southern blot para las variedades 503 y Vir utilizando como sonda un fragmento del gen *trx f*. La presencia del gen de estudio se muestra por la aparición de una banda de 4903 pb.

- Zonas de recombinación homóloga

Finalmente, en el Southern blot realizado para las zonas de recombinación homóloga se observaron una banda de 4903 pb y una banda con menor intensidad correspondiente al fragmento que incluye el gen *aadA*, de 6253 pb (Figura 11). Estos resultados sugieren que coexisten plastidios transformados junto con plastidios no transformados, dando lugar a lo que se conoce como heteroplasma.

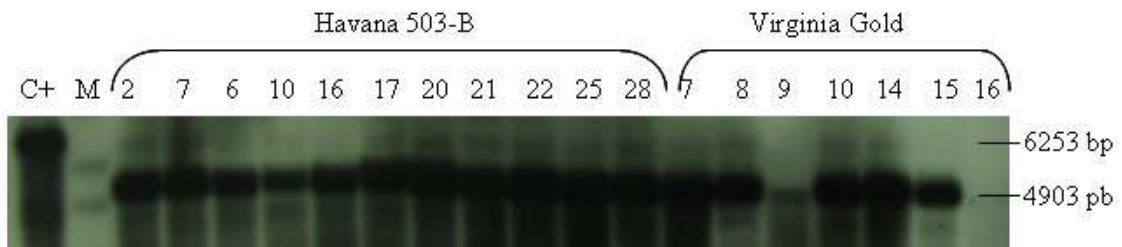


Figura 11. Resultado del Southern blot para las zonas de recombinación homóloga para las variedades 503 y Vir.

---

## 5. Discusión

En este trabajo se pretende eliminar el gen marcador *aadA* del genoma plastidial mediante el sistema Cre/lox vía *Agrobacterium tumefaciens*. Después de este proceso se han realizado distintos análisis como son la PCR y el Southern blot para comprobar la ausencia de dicho gen. En los resultados obtenidos en la PCR se han observado muestras positivas para el gen *aadA* pero negativas en el Southern blot. Este hecho se debe a que la PCR es una técnica más sensible que el Southern blot y es capaz de amplificar un fragmento aunque haya muy pocas copias de *aadA* en el plastoma. Por otro lado la existencia de heteroplasma en el Southern blot para las zonas de recombinación homóloga, confirma las PCR positivas. Por ello, parece que se han obtenido plantas heteroplásmicas en las dos variedades de tabaco, con un bajo porcentaje de plastomas con el gen *aadA*.

Otro aspecto a comentar es el resultado que se obtiene en el Southern blot para el gen *aadA*, en el cual se observa que la sonda de dicho gen no da señal pero sin embargo si que se observa una débil señal con la sonda para las zonas de recombinación homóloga. Esto puede deberse a que la sonda para el gen *aadA* no se ha hibridado bien y no da señal, o a que los tiempos de exposición de la membrana de hibridación con la película no han sido los mismos para cada sonda, pudiéndose dar casos de falsos negativos.

Los resultados obtenidos muestran un porcentaje de eliminación del gen marcador razonablemente bueno en comparación con otros autores. En la escisión del gen marcador mediante la expresión transitoria de la recombinasa Cre (Agroinfiltración) en el grupo de Pal Maliga, se obtuvo aproximadamente un 10% de las plantas regeneradas sin el gen marcador (Lutz et al., 2006). Si estos resultados se comparan con los obtenidos mediante transformación nuclear, se aprecia para ambas variedades, 503 y Vir, un mayor rendimiento en la eliminación del *aadA*.

Por otro lado, sería conveniente intentar, en futuras investigaciones, obtener plantas homoplásmicas. Para ello, se parte de semillas (generación T0), que se germinan en un medio de espectinomicina. Se seleccionan las que son sensibles, se cultivan y se obtienen nuevas semillas para repetir el proceso. Se eligen las semillas como punto de partida porque las células generativas de las que proceden así como las células meristemáticas tienen pocos plastomas, facilitando la obtención de plantas



---

homoplásmicas. Se confirmará la homoplasma cuando el 100% de la descendencia sea sensible a la espectinomicina.

Por último, otro objetivo importante es que estas plantas hayan eliminado también el gen *Cre*. Este gen está en heterocigosis, por lo que en la siguiente generación se obtendrá un 25% de plantas que no contengan dicho gen, de acuerdo a la segregación mendeliana.

---

## **6. Conclusiones**

1. Se han obtenido plantas transgénicas de las dos variedades de tabaco en las que se ha introducido el gen de la recombinasa Cre en el genoma nuclear.
2. En base a los resultados de Southern blot, se ha obtenido un 34 % (variedad Havana 503-B) y un 39% (variedad Virginia Gold) de plantas en las que se ha eliminado el gen aadA.
3. Las plantas obtenidas son heteroplásmicas, manteniendo un bajo porcentaje de plastomas que incluyen el gen aadA.

---

## Bibliografía

- Bendich, A.J. (1987). Why do chloroplasts and mitochondria contain so many copies of their genome? *BioEssays*, 6: 279-282.
- Bock, R. (2001). Transgenic plastids in basic research and plant biotechnology. *Journal of Molecular Biology*, 312: 425-438.
- Boynton, J.E., Gillham, N.W., Harris, E.H., Hosler, J.P., Johnson, A.M., Jones, A.R. *et al.* (1988). Chloroplast transformation in *Chlamydomonas* with high velocity microprojectiles. *Science*, 240: 1534-1538.
- Carrer, H., Hockenberry, T.N., Svab, Z. y Maliga, P. (1993). Kanamycin resistance as a selectable marker for plastid transformation in tobacco. *Molecular and General Genetics*, 241(1-2): 49-56.
- Carrer, H. y Maliga, P. (1995). Targeted insertion of foreign genes into the tobacco plastid genome without physical linkage to the selectable marker gene. *Biotechnology*, 13: 791-794.
- Daniell, H., Vivekananda, J., Nielsen, B.L., Ye, G.N., Tewari, K.K. y Sanford, J.C. (1990). Transient foreign gene expression in chloroplasts of cultured tobacco cells after biolistic delivery of chloroplast vectors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 88-92.
- Daniell, H. (2006). Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnology Journal*, 1: 1071-1079.
- De Cosa, B., Moar, W., Lee, S.B., Miller, M. y Daniell, H. (2001). Overexpression of the *Btcry2Aa2* operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals. *Nature Biotechnology*, 19: 71-74.
- Gilbertson, L. (2003). Cre-lox recombination: Creative tools for plant biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 21(12): 550-555.

- 
- Hagemann, R. (2004). The sexual inheritance of plant organelles. In: Daniell, H., Chase, C.D. (Ed.). *Molecular biology and biotechnology of plant organelles*. Dordrecht, *The Netherlands: Springer*; p. 93-113.
- Hajdukiewicz, P.T.J., Gilbertson, L. y Staub, J.M. (2001). Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids. *The Plant Journal*, 27(2): 161-170.
- Hibberd, J.M., Linley, P.J., Khan, M.S. y Gray, J.C. (1998). Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment. *The Plant Journal*, 16: 627–632.
- Iamtham, S. y Day, A. (2000). Removal of antibiotic resistance genes from transgenic tobacco plastids. *Nature Biotechnology*, 18: 1172-1176.
- Johansen, L.K. y Carrington, J.C. (2001). Silencing on the spot. Induction and suppression of RNA silencing in the Agrobacterium-mediated transient expression system. *Plant Physiology*, 126: 930–938.
- Kavanagh, A., Nguyen, D., Lao N.T., Noreen, M., Peter, S.O., Horvath, E.M., Dix, P.J. y Medgyesy, P. (1999). Homeologous plastid DNA transformation in tobacco is mediated by multiple recombination events. *Genetics*, 152: 1111-1122.
- Khan, M.S. y Maliga, P. (1999). Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature Biotechnology*, 17: 910–915.
- Koop, H.U., Herz, S., Golds, T.J. y Nickelsen, J. (2007). The genetic transformation of plastids. *Topics in Current Genetics*, Vol. 19. In: Bock, R. (Ed.), *Cell and molecular biology of plastids*.
- Lutz, K.A., Corneille, S., Ahzagiri, A.K., Svab, Z. y Maliga, P. (2003). A novel approach to plastid transformation utilizes the phiC 31 phage integrase. *The plant journal*, 37: 906-913.
- Lutz, K.A., Bosacchi, M.H. y Maliga, P. (2006). Plastid marker-gene excision by transiently expressed CRE recombinase. *The plant journal*, 45(3): 447-456.

- 
- Lutz, K.A. y Maliga, P. (2007). Construction of marker-free transplastomic plants. *Current Opinion in Biotechnology*, 18: 107–114
- Maliga, P. (2003). Progress towards commercialization of plastid transformation technology. *Trends in Biotechnology*, 21: 20–28.
- Maliga, P. (2004). Plastid transformation in higher plants. *Annual Review of Plant Biology*, 55: 289–313.
- Murashige, T. y Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Plant Physiology*, 15: 473–497.
- Murray, H.G. y Thompson, W.F., (1980). Rapid isolation of high molecular weight DNA. *Nucleic Acids Research*, 8: 4321-4325.
- O'Neill, C., Horvath, G.V., Horvath, E., Dix, P.J. y Medgyesy, P. (1993). Chloroplast transformation in plants: polyethylene glycol (PEG) treatment of protoplasts is an alternative to biolistic delivery systems. *The Plant Journal*, 3: 729-738.
- Quesada-Vargas, T., Ruiz, O.N. y Daniell, H. (2005). Characterization of heterologous multigene operons in transgenic chloroplasts: transcription, processing, and translation. *Plant Physiology*, 138: 1746-1762.
- Ruf, S., Hermann, M., Berger, I.J., Carrer, H. y Bock, R. (2001). Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit. *Nature Biotechnology*, 19: 870–875.
- Sanford, J.C., Devit, M.J., Russell, J.A., Smith, F.D., Harpending, P.R., Roy, M.K. y Johnston, S.A. (1991). An improved, helium-driven biolistic device. *Technique*, 3: 3-16.
- Serino, G. y Maliga, P. (1997). A negative selection scheme based on the expression of cytosine deaminase in plastids. *The Plant Journal*, 12: 697–701.
- Svab, Z., Hajdukiewicz, P. y Maliga, P. (1990a). Stable transformation of plastids in higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87: 8526-8530.

- 
- Svab, Z., Harper, E.C., Jones, J.D. y Maliga P (1990b). Aminoglycoside-3-adenyltransferase confers resistance to spectinomycin and streptomycin in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 14: 197–205.
- Svab, Z. y Maliga, P. (1993). High-frequency plastid transformation in tobacco by selection for a chimeric aadA gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 90: 913-917.
- Thomas, M.R. y Rose R.J. (1983). Plastid number and plastid ultrastructural changes associated with tobacco mesophyll protoplast culture and plant regeneration. *Planta*, 158: 329-338.
- Tungsuchat-Huang, T., Slivinski, K.M., Sinawaga-García, S.R. y Maliga, P. (2011). Visual epectinomycin resistance (aadA(au)) gene for facile identification of transplastomic selectors in tobacco leaves. *Plant Molecular Biology*, 76(3-5): 453-461.