

Agrobacterium-mediated genetic transformation of Petunia for gene silencing using Kanamycin as the selection agent.

Transformación genética de Petunia mediada por *Agrobacterium* para el silenciamiento génico, utilizando Kanamicina como agente selectivo.

C. Brandoli^{1*}, C. Petri-Serrano², J. Weiss²

¹ Instituto de Biotecnología Vegetal, Universidad Politécnica de Cartagena, calle Linterna s/n, Campus Muralla del Mar, 30203, Cartagena, Murcia, España.

² ETSIA, Universidad Politécnica de Cartagena, Paseo Alfonso XIII, 48, 30203 Cartagena, Murcia, España.

*claudio.brandoli@gmail.com

Abstract

The soil bacterium, *Agrobacterium tumefaciens*, is a plant pathogen responsible for tumour induction in dicotyledonous plants. Due to its ability to transfer a very specific segment of DNA to the plant cells, it is nowadays the most frequently method used for the introduction of genes into plants cells, overexpression of genes or for gene silencing. This manuscript deals the transformation of the plant model Petunia mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

Keywords: Plant transformation; RNA interference; recombinant plasmid.

Resumen

La bacteria del suelo *Agrobacterium tumefaciens*, es un patógeno vegetal responsable de la inducción de tumores en dicotiledóneas. Debido a su capacidad de transferir un segmento muy específico de ADN a células vegetales es el método más frecuentemente utilizado para la introducción de genes en plantas, la sobreexpresión de genes o el silenciamiento génico. En este documento se trata de la transformación de la planta modelo Petunia mediada por *Agrobacterium tumefaciens*.

Palabras clave: Transformación de plantas; ARN de interferencia; plásmido recombinantes.

1. INTRODUCCIÓN

La transformación genética mediada por *Agrobacterium* es hoy en día, la tecnología dominante utilizada para la producción de plantas genéticamente modificadas. En la naturaleza, *Agrobacterium* transforma genéticamente su huésped mediante la transferencia de un bien definido segmento de ADN de su plásmido inductor de tumores (Ti) al genoma de la célula huésped. El ADN transferido (T-DNA) lleva un conjunto de oncogenes (genes implicados en síntesis de auxinas y citoquininas) y genes necesarios para el catabolismo de las opinas. Su expresión en la célula vegetal, conduce al crecimiento neoplásico del tejido transformado y a la producción de aminoácidos utilizados principalmente como fuente de nitrógeno casi exclusivamente por las bacterias, (1) (2).

Hoy en día, para la transformación se utiliza el sistema binario, un método estándar que consta de dos plásmidos, un vector binario y un plásmido Ti desarmado, llamado auxiliar, que no tiene el T-DNA con los genes oncogenes, pero tiene la región vir. Por otro lado el vector binario lleva consigo el T-DNA, con un gen marcador de selección en plantas y nuestra construcción de interés. Esto se transforma en *E. coli* y seguido por la selección de las bacteria transformadas con el antibiotico de selección, se inserta el plásmido por electroporación en una cepa desarmada de *Agrobacterium*, que contiene el plásmido auxiliar, pero sin los genes oncogenes, (3). De esta manera, después de la activación por la planta herida, las proteínas de los genes vir del plásmido auxiliar, translocan el fragmento de ADN entre los dos bordes, derecho e izquierdo, del vector binario, en la célula vegetal. En las plantas, la kanamicina es el agente de selección más usado porque normalmente se usa el gen *nptII* como gen de selección. Su uso extendido se debe debido a su eficacia en la inhibición del crecimiento de las células no transformadas.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material Vegetal

Fueron recolectadas semillas de *Petunia x hybrida*, de la variedad Mitchell W115.

2.2 Cepa de Agrobacterium y Plásmido Binario

Se utilizó la cepa desarmada de *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 y como plásmido binario el plasmido Gateway® pHellsgate12 que tiene entre los bordes derecho e izquierdo el gen *nptII*, como gen marcador de selección con el promotor CaMV 35S. Las dos copias del gen de interés están dispuestas con orientación opuesta la una a la otra para obtener una estructura a horquilla, una vez introducida en el genoma de la planta y en esta manera, silenciar el gen de interes.

2.3 Técnicas de ADN Recombinante y de Selección

El plásmido se insertó por electroporación en *Agrobacterium* y se analizaron las colonias mediante PCR con cebadores específicos del gen *nptII* para comprobar la presencia del plásmido (cebador Forward: CCCTGCTTGCCGAATATCATGGTGG, cebador Reverse: CGAAATCTCGTGATGGCAGGTTGG). Cada mezcla de reacción contenía aproximadamente 100ng/μl de ADN y se sometió al siguiente protocolo: 95°C durante 3 minutos, seguido de 30 ciclos divididos en fases de denaturación a 95°C durante 15 segundos, anillamiento a 60°C durante 15 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto, seguida por la fase de extensión terminal de 1 minuto a 72°C.

2.4 Condiciones de Cultivo y de Transformacion

El protocolo de transformación ha sido proporcionado por el laboratorio de Tom Gerats (Nijmegen) y reúne también la experiencia de Peter de Groot (Nijmegen) y Dave Clark (University of Florida) (4).

Las semillas de *Petunia* fueron esterilizadas en superficie durante 1 min con Etanol al 95%, puestas 25 min en una solución al 25% de lejía y lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Una vez secadas bajo campana de flujo, fueron colocadas en placas Petri contenientes un medio de cultivo (para la composición del medio, ver tabla n1). Una colonia de *Agrobacterium* con el plásmido binario se cultivó durante una noche en 20ml de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes a 28°C y a 180 rpm. Las hojas se cogieron desde plántulas *in vitro* jóvenes, completamente desarrolladas y sin incluir el pecíolo. Se colocaron sobre un papel de filtro estéril y se cortaron en piezas de 1x1 cm aproximativamente. Se centrifugó el cultivo de *Agrobacterium* durante 10 minutos a 4000 rpm. Se dispusieron las hojas cortadas en la suspensión bacteriana durante 15 minutos. Posteriormente, las hojas se secaron utilizando el papel de filtro estéril y se

distribuyeron 8/9 explantos por placa de co-cultivo dejándolas incubar durante 3 días en cámara de cultivo [16-h fotoperiodo ($20-25 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$, lámpara fluorescente de color blanco frío) a $26 \pm 1^\circ\text{C}$], (para la composición del co-cultivo, ver tabla n1).

Tres días después los explantos se transfirieron a medio de selección y se incubaron una semana en cámara de cultivo a las condiciones precedentes pero en oscuridad y posteriormente se expusieron gradualmente a la luz hasta la formación de los callos (para la composición del cultivo de selección, ver tabla 1). Con el aparecer de los brotes, se pusieron en nuevas placas con un medio de enraizamiento por las siguientes 6 semanas (para la composición del cultivo de enraizamiento, ver tabla n1). A la comparsa de las raíces se quitaron cuidadosamente del cultivo gel y se pusieron a crecer en tierra.

3. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Del experimento, se obtuvieron una eficiencia de transformación respectivamente del 16,6% en las plantas transformadas con la construcción que lleva el inserto del gen 1 y del 10,41%, las del gen 2 (ver tabla 2). Se transformaron por cada construcción, 48 explantos de tejido vegetal, de los cuales, resultaron transgénicas, a la análisis PCR, respectivamente 8 plantas por el inserto del gen 1 y 5 plantas por el inserto del gen 2 (ver imagen 1 por el análisis en gel de agarosa al 1,5%). Este trabajo forma parte de un proyecto de tesis donde se pretende a analizar los cambios fenotípicos y bioquímicos inducidos por el silenciamiento de genes y la mutación genética en Solanáceas con el objetivo de profundizar en el conocimiento de la función de este gen y su posible regulación.

4. REFERENCIAS

- (1) Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147–154. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.009>
- (2) Ziemienowicz, A. (2001). Odyssey of Agrobacterium T-DNA. *Acta Biochimica Polonica*, 48(3), 623–635.
- (3) Lee, L.-Y., & Gelvin, S. B. (2007). T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology*, 146(2), 325–332. <http://doi.org/10.1104/pp.107.113001>
- (4) Izaskun Mallona Gonzalez, M. Egea-Gutierrez-Cortines, J. Weiss, 2012. Identification of novel genes involved in Petunia flower development using transcript profiling and reverse genetics. Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biotecnología Vegetal. Pp.125-126, Apéndice A, información suplementaria.

5. AGRADECIMIENTOS

Quisiera agradecer al Instituto de Biotecnología Vegetal (IBV), especialmente a mi director y codirector de tesis, la Dra. Julia Weiss y al Dr. Cesar Petri Serrano por su disposición y su valioso asesoramiento. Esta obra forma parte de los proyectos BFU-2013-45148-R y Seneca 19398/PI/14.

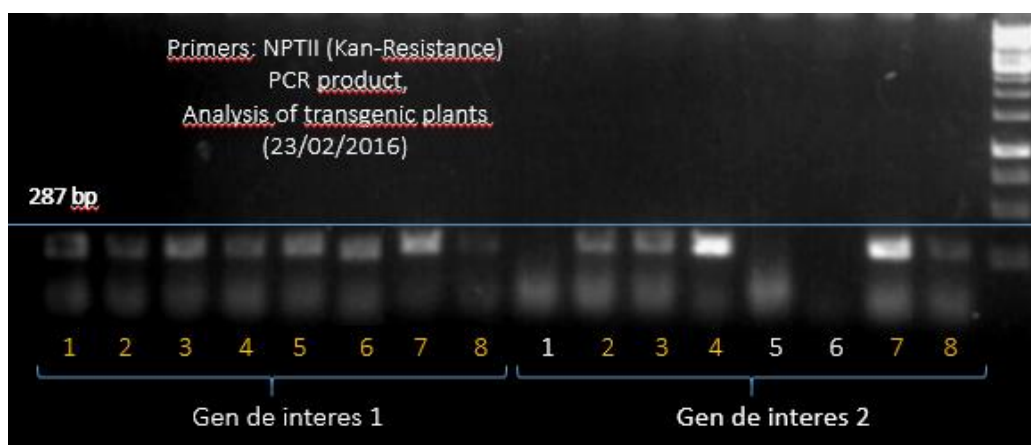


Imagen 1: Análisis en gel de agarosa al 1,5% de la amplificación PCR con cebadores dirigidos al gen *nptII*, para la selección de plantas transgénicas .

Tabla 1. Medios de cultivo

	Medio estándar	Medio de co-cultivo	Medio de selección	Medio de enraizamiento
Sàles + Vitaminas	MS	½MS	½MS	½MS
Sacarosa	15 g	30 g	30 g	30 g
Gel	4 g	4 g	4 g	4 g
BAP	—	2 mg/l	2 mg/l	—
NAA	—	0,1 mg/l	0,1 mg/l	—
Kanamicina	—	—	300 mg/l	300 mg/l
Cefotaxima	—	—	500 mg/l	500 mg/l

Tabla 2. Resultados de la transformación

	Gen 1	Gen2
Nº de muestras	48	48
Porcentaje de regeneración	62,5%	58,3%
Nº de callos sobrevividos	53,3%	60,7%
Porcentaje de transformación	50%	29,4%
Eficiencia de transformación	16,6%	10,41%