

Memoria de Resultados

Proyecto de Innovación Docente

Coordinador

Purificación Corchete Sánchez 7439042 Z

Participantes

Lucía Albornos Llorente 70251275Y

Establecimiento de cultivos “hairy roots” para su aplicación en prácticas de Biotecnología de plantas.

Agrobacterium rhizogenes induce la formación de raíces en forma de cabellera (*hairy roots*) en plantas dicotiledóneas debido a la incorporación del T-DNA contenido en el plásmido Ri al genoma de la planta huésped.

Con este Proyecto se ha puesto a punto un protocolo de transformación genética para la obtención de cultivos hairy roots de *Silybum marianum* según la metodología que se describe a continuación

La preparación del inóculo bacteriano (*A. rhizogenes*, cepa ARqua1) se hizo extendiendo la bacteria (conservada a -80 °C en glicerol al 20%) en placas de medio LB sólido. Se incubó 2 días a 28 °C y se sembró una colonia en medio líquido LB. El cultivo creció durante 12-14 h en agitación a 180 rpm y 28 °C.

Como material vegetal se emplearon secciones de hipocotilo aislados de plántulas estériles de 10 días. El material vegetal se sumergió en la suspensión bacteriana, se mantuvo durante 15-20 min y tras secar los explantos en papel de filtro estéril, se sembraron en medio sólido de Murashige y Skoog, sin hormonas, conteniendo 30% de sacarosa.

Los cultivos se mantuvieron en oscuridad y cuando se observó la producción de raíces en los bordes cortados de los hipocotilos, se transfirieron los explantos a medio de la misma composición que el indicado conteniendo 400 mg /l de la mezcla de antibióticos comercial Augmentine ® constituido por

amoxicilina (1g) y ácido clavulánico (0,1 g). En muchos casos la formación de raíces se demoró bastantes días: en este caso, hubo que eliminar la bacteria a las 72-96 h de co-cultivo.

Cuando las raíces formaron nuevas raíces laterales secundarias, se aislaron de los explantos y se cultivaron en medio MS líquido sin hormonas en agitador orbital a 70 rpm y 25 °C (Figura 1).

El subcultivo se realizó mensualmente transfiriendo 1 g de biomasa a medio fresco de igual composición.

La comprobación de la integración del T-DNA del plásmido Ri se efectuó analizando la presencia de los genes rol presentes en el T-DNA. Par ello se aisló el DNA genómico de raíces transformadas, utilizando el FastDNA ® Kit BIO 101, y se realizó una PCR con los cebadores que permiten detectar la presencia de un amplicón de 438 pb. (Figura 2)

Rol B Forward 5'-3': GCTCTTGCAAGTCTAGATTT

Rol B Reverse 5'-3': GAAGGTGCAAGCTACCTCTC



Figura 1: Cultivo hairy roots

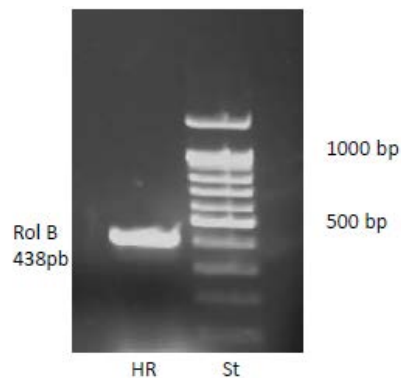


Figura 2: Integración de genes Rol B en el DNA