

Soria, Florencia E.¹, Galiñales, Antonella E.^{1,3}, Bossio, Adrián E.⁴, Valentini, Gabriel H.², Sánchez, Gerardo.¹

¹Laboratorio de Biotecnología; ²EEA San Pedro, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA); ³Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales, UNNOBA; ⁴Instituto de Genética Ewald A. Favret (IGEAF, INTA). sanchez.gerardo@inta.gov.ar



INTRODUCCIÓN

Un requisito clave para la obtención de líneas transformadas y/o editadas genéticamente es el desarrollo de un protocolo simple, eficiente y reproducible de regeneración *in vitro* de plantas completas. Sin embargo, las especies del género *Prunus* se caracterizan por ser recalcitrantes al cultivo *in vitro*. En este sentido, el Diseño y Optimización de Experimentos (DOE) podría ser un enfoque útil para comprender cómo diferentes factores, relacionados al material vegetal, medio, y condiciones de cultivo y procedimientos de transformación, influyen sobre la eficiencia de cada etapa del cultivo *in vitro* y la transformación genética. El objetivo general de este trabajo fue desarrollar un protocolo eficiente para la regeneración *in vitro* y transformación del ciruelo europeo 'D'Agen'.

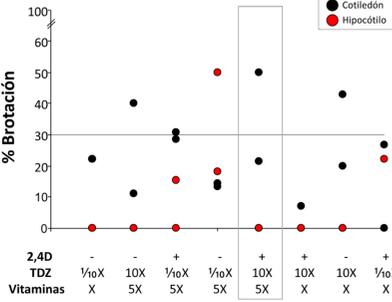
● **Regeneración *in vitro* de brotes a partir de cotiledones e hipocótilos**

-Influyen de manera significativa el tipo de explanto y sus interacciones con los reguladores de crecimiento y la concentración de vitaminas en el porcentaje de brotación de D'Agen.

-La utilización de cotiledón como explanto inicial permite obtener un mayor % brotación en comparación con el hipocótilo.

RESULTADOS

Fig. 1. Inducción de brotes en cotiledones e hipocótilos de ciruelo europeo 'D'Agen' en medio optimizado: los explantos estuvieron en por 3 días en medio 3/4MS suplementado con 9 µM 2,4-D (pulso), 1/10X TDZ, 0,25 µM IBA y 5X Vitaminas y luego se pasaron a medio sin pulso.



28 días en medio sin pulso. Barra: 10 mm

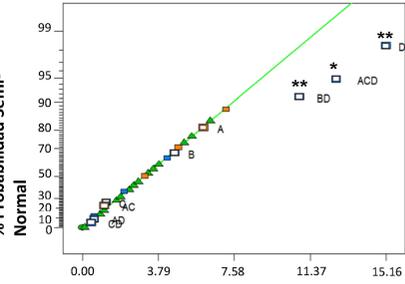


Fig. 3. Gráfico de probabilidad semi-normal. Los efectos del factor principal *Tipo explanto* y los factores interactivos doble (Concentración de TDZ * *Tipo de explanto*) y triple (Concentración de Vitaminas * Pulso de 2,4D * *Tipo de explanto*) son estadísticamente significativos (* p < 0,05; ** p < 0,01) sobre el % brotación.

● **Multiplicación y elongación de brotes regenerados**

-El BAP tiene efecto positivo significativo sobre la multiplicación de brotes.
-La elongación de los brotes se induce en medio basal sin reguladores.

Tabla 1. Evaluación del efecto de la concentración de BAP e IBA a 5 niveles en un diseño de optimización central compuesto sobre el número de brotes nuevos. El rango de concentración se definió como 1,0-8,8 µM y 0,0-0,5 µM, para el BAP e IBA respectivamente. Las unidades experimentales estaban conformadas por tres explantos (brotes iniciales), que habían sido mantenidos previamente en medio 3/4MS (BAP 3 µM e IBA 0,25 µM).

Tratamiento	BAP(µM)	IBA(µM)	n brotes nuevos/brote inicial
1	8,8	0,25	9
2	4,9	0,50	7
3	2,14	0,43	5
4*	4,9	0,25	8
5*	4,9	0,25	9
6	4,9	0,00	9
7*	4,9	0,25	5
8	1,0	0,25	3
9	7,66	0,43	9
10*	4,9	0,25	2
11	2,14	0,07	2
12	7,66	0,07	15
13*	4,9	0,25	1

*Réplicas del punto central del diseño



Fig. 4. Brotes del tratamiento 4 al tiempo inicial (izq.) y a los 28 días (der.) de iniciado el experimento de optimización mediante un diseño central compuesto para la etapa de multiplicación. Barra: 10 mm.

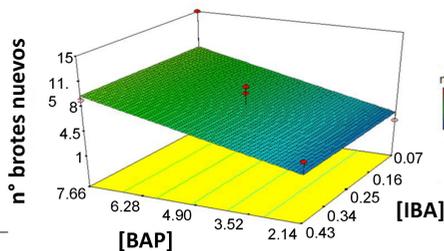


Fig. 5. Gráfico de superficie respuesta: efecto de la conc. de BAP e IBA sobre la variable respuesta n° de brotes nuevos. La concentración de BAP tiene un efecto positivo (coef. de regresión = 3,19) estadísticamente significativo sobre la variable respuesta (ANOVA, p<0,05); es decir, que a medida que aumenta la concentración de BAP aumenta el número de brotes nuevos.

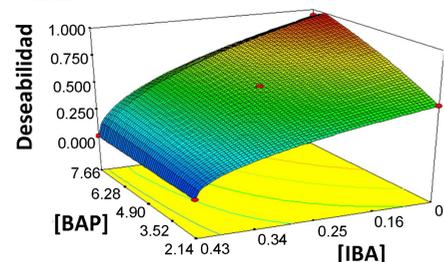


Fig. 6. Optimización de la etapa de elongación: el uso de medio basal sin reguladores permitió aumentar la longitud de vástago. Barra: 10 mm.

Fig. 7. Función Deseabilidad (D) para los siguientes criterios de optimización→ BAP: en rango, IBA: mínimo, n° brotes nuevos: target= 9. En función de dichos criterios de optimización con una D= 1, se estableció la composición del medio óptimo para la multiplicación de brotes de 'D'Agen'.

● **Enraizamiento**

-Se determinó el efecto de cuatro factores categóricos a dos niveles (y sus interacciones)→ 29,6 µM adenina (presencia/ ausencia), 200 mg/L carbón activado (presencia/ ausencia), 0,1 µM KIN (presencia/ ausencia) y tipo de auxina (5 µM ANA vs 20 µM IBA) sobre seis variables respuestas relacionadas al desarrollo de un buen sistema radicular, lo que permitió obtener un medio de enraizamiento optimizado.

Tabla 2. Efecto de los factores estadísticamente significativos sobre las seis variables respuestas estudiadas para optimizar la etapa de enraizamiento de 'D'Agen' mediante un diseño de screening full factorial. Los signos de los coeficientes de regresión representan el efecto positivo o negativo de los factores sobre las variables respuestas. En base a los modelos de cada variable respuesta, se muestran los valores predichos por el modelo y los valores obtenidos en el ensayo de validación (n=9) de enraizamiento en medio de cultivo optimizado: 3/4MS + IBA.

Variables respuesta	Factores significativos		Modelo	Predicción		Validación		
	Tipo*	P		Media	SE	Media	SE	
% Enraizamiento	D	< 0,0001	-9,22	0,59	97,50	5,56	86,70	4,71
	BD	0,0026	14,53					
Media del n° raíces/brotes	B	< 0,0001	-0,72	0,90	4,69	0,42	4,60	0,59
	D	< 0,0001	1,22					
	BD	< 0,0001	-0,97					
Longitud media de raíces	A	< 0,0001	-4,66	0,94	21,69	2,46	24,49	2,08
	B	< 0,0001	5,09					
	BD	< 0,0001	-7,41					
%-Brotes con raíces 2°	B	0,0386	9,16	0,38	30	8,42	52,56	9,04
	BD	0,0022	-14,28					
Vigor medio	-	-	-	-	0,80	0,11	0,73	0,03
	B	0,0006	-13,13					
% Callo	D	< 0,0001	25,63	0,76	77,50	6,75	91,11	4,84
	BD	0,0016	-11,88					

*Factores principales: A- Adenina, B- Carbón activado y D- Auxina. Factor interactivo: BD- Carbón activado * Auxina

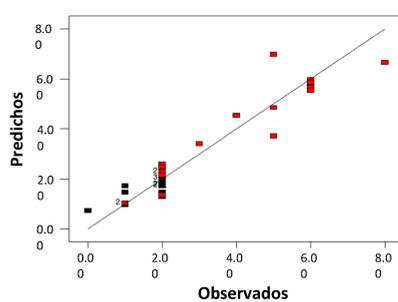


Fig. 8. Gráfico de predichos vs. observados para el n° medio de raíces/brote. El modelo quedó definido en términos de factores codificados como: n° medio raíces/brotes= 2,84 +0,22 * A + 0,72 * B -0,094 * C + 1,22 * D +0,34 * A*D -0,16 * B*C -0,97 * B*D +0,031 * C*D -0,41 * B*C*D (p < 0,0001, R² = 0,90).

● **Aclimatación**



● **Transformación transiente en cotiledones con el gen marcador GUS**

-Se evaluó el efecto de tres OD de infección, dos métodos de enfrentamiento (vacío y sonicación) y la presencia de acetosiringona en co-cultivo sobre la eficiencia de transformación de cotiledones de 'D'Agen' mediada por *Agrobacterium*, a través de la cuantificación de la expresión transiente de GUS empleando un análisis digital de imágenes.



Fig. 11. Análisis histoquímico la expresión transiente del gen marcador de la β-glucuronidasa (GUS). A la izq. cotiledón infectado con la cepa C58C1 de *Agrobacterium tumefaciens* provista con el plásmido pCambia2301-GUS. A la derecha control negativo de transformación infectado con la cepa C58C1 vacía. Se consideró cotiledón transformado, al cabo de 3 días de co-cultivo y reacción histoquímica, aquel cuya intensidad de pixel (señal) analizada con el software FIJI estuvo por encima del valor umbral detectado en el control (ruido). El cotiledón GUS+ (izq.) corresponde al tratamiento con mayor número de pixeles GUS+ definido como: OD= 0,6 + acetosiringona en el medio de co-cultivo. Barra: 2 mm.

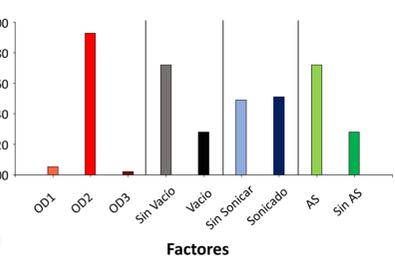


Fig. 12. Frecuencia relativa del n° de pixeles considerados positivos para GUS en función de los factores analizados de manera independiente: OD de infección (a 3 niveles: OD1= 0,2; OD2= 0,6 y OD3= 0,8), enfrentamiento con vacío (presencia/ausencia), sonicación de los cotiledones previa infección (presencia/ausencia) y el empleo de medios de co-cultivo suplementados con acetosiringona (presencia/ ausencia).

CONCLUSIONES

El protocolo desarrollado permitió obtener un porcentaje elevado de regeneración *in vitro* (30-40%), y se pudo determinar las mejores condiciones de transformación transiente. Según nuestro conocimiento, este trabajo constituye el primer reporte de regeneración *in vitro* eficiente del ciruelo 'D'Agen'. Asimismo, se probó la eficiencia del DOE para optimizar el cultivo *in vitro*, lo que abre la posibilidad de extrapolar la estrategia de regeneración a otras especies del género.

