



## Regeneración y elongación de tallos *in vitro* a partir de un genotipo de *Lotus tenuis* cultivado en tres ambientes

Gutiérrez F.G.<sup>1</sup>, López Miró D.<sup>2</sup>, Roldán M.L.<sup>2</sup>, Affinito M.A.<sup>1</sup>, Díaz Paleo A.H.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Pergamino, Buenos Aires, Argentina; <sup>2</sup>EEA INTA Pergamino, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.  
Correo electrónico: florencia\_gutierrez\_@hotmail.com

### INTRODUCCIÓN

*Lotus tenuis* Waldst. & Kit ex Willd. es una leguminosa forrajera de importancia en la Pampa deprimida. Para favorecer la cría de ganado en esta zona es necesario contar con cultivares de alta productividad con tolerancia incrementada a estreses abióticos, los cuales se pueden obtener a partir de herramientas biotecnológicas. La técnica de transformación genética en plantas requiere tener una eficiente regeneración *in vitro*, la cual puede depender de factores relacionados con el genotipo y el ambiente.

### OBJETIVO

✓ Comparar la capacidad de regeneración y elongación de tallos *in vitro* a partir de folíolos de un genotipo de *L. tenuis* cultivado en tres ambientes: invernáculo, sala de crecimiento e *in vitro*.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### Regeneración *in vitro* de explantes provenientes de distintos ambientes



#### Ensayo de regeneración y elongación

- ✓ 7 frascos con 5 folíolos cada uno en un diseño completamente aleatorizado
- ✓ Medio de regeneración semisólido (Espasandin *et al.*, 2010)
- ✓ Cultivo a 24 °C; 16hs luz / 8 hs oscuridad
- ✓ Pasaje del tejido regenerado > 5mm a medio MS 0,5X para permitir la elongación de tallos

#### Variables evaluadas

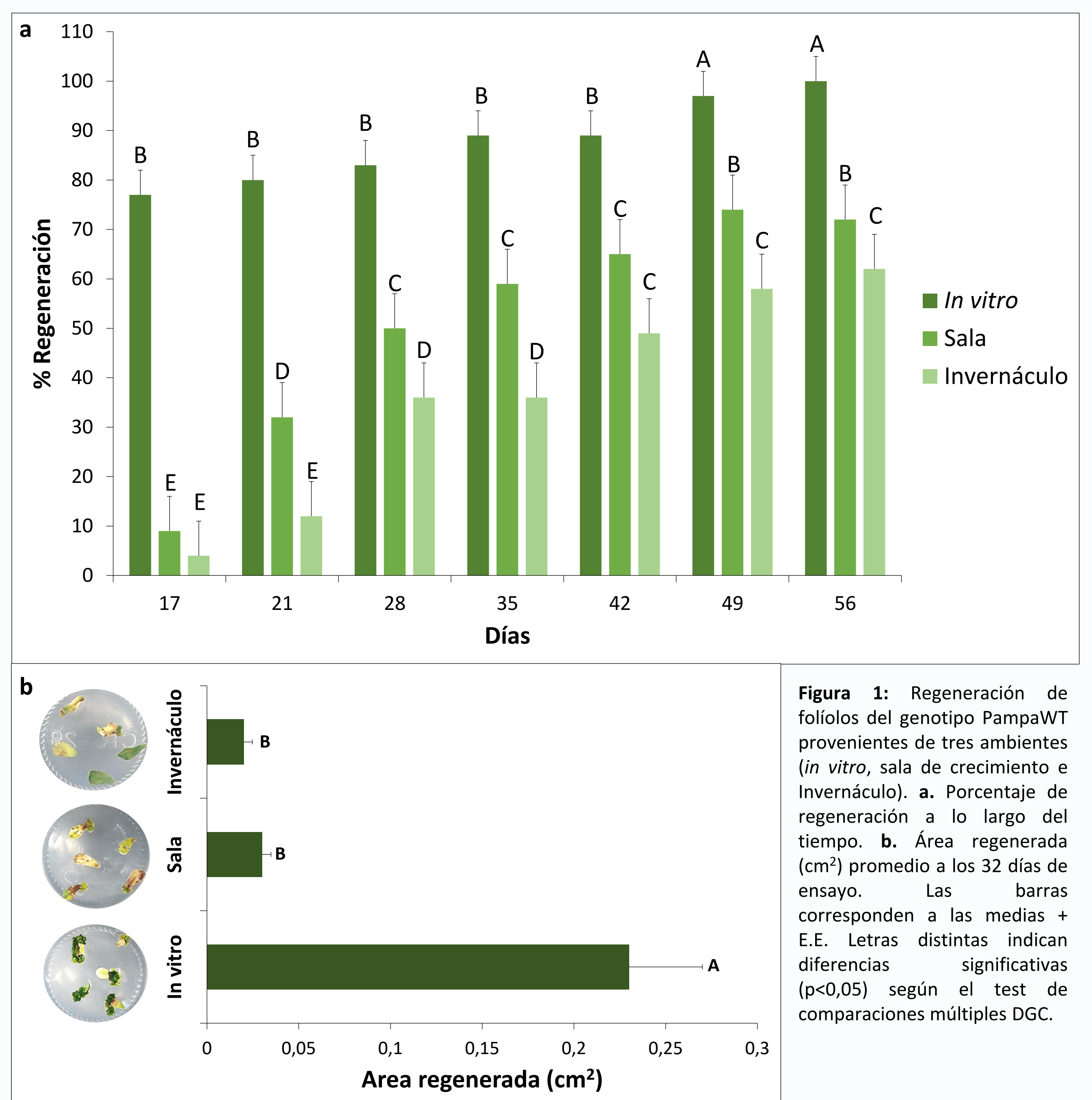
- ✓ Porcentaje de regeneración a los 17, 21, 28, 42, 49 y 56 días
- ✓ Medición del área regenerada (cm<sup>2</sup>) a los 32 días con ImageJ (Schneider *et al.*, 2012)
- ✓ Número y altura promedio (mm) de tallos por explante
  - 64 días desde el inicio del ensayo
  - 60 días desde el pasaje a MS 0,5X

### Análisis de la información

Para el análisis del porcentaje de regeneración se realizó ANOVA de dos factores considerando medidas repetidas en el tiempo; para el área regenerada se realizó ANOVA de un factor y para el número de tallos y altura promedio la prueba de Kruskal Wallis. Se utilizó el *software* InfoStat en su interfaz con R (Di Rienzo *et al.*, 2020).

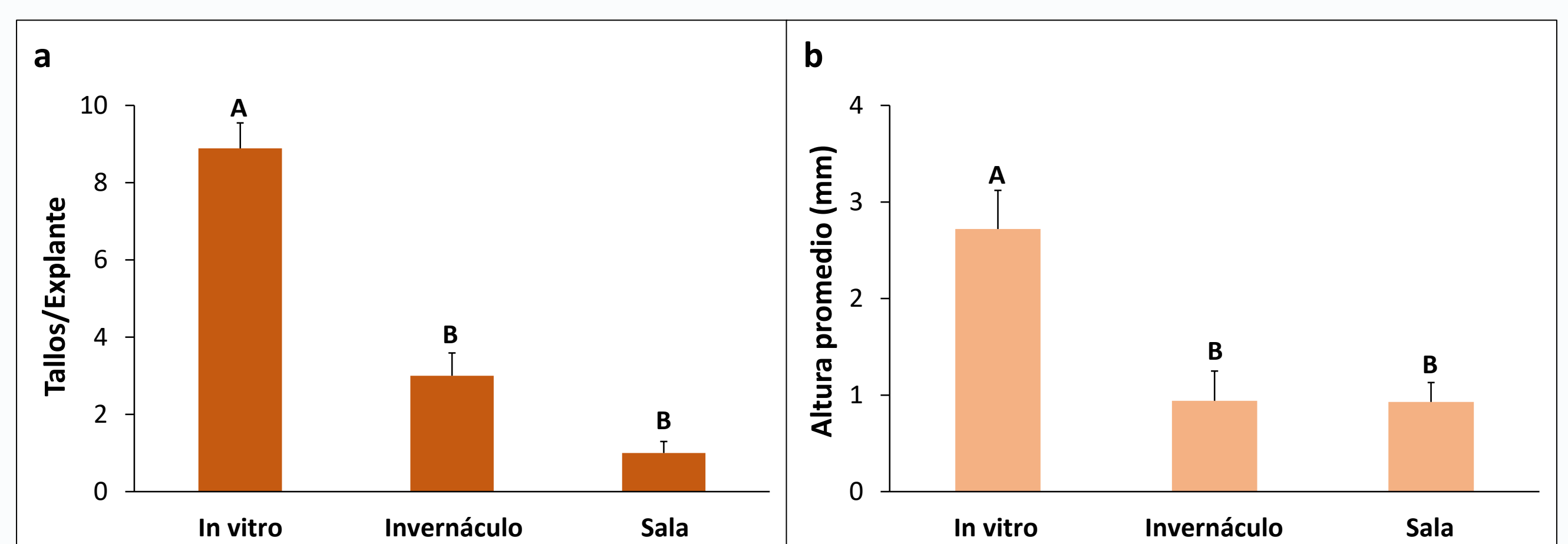
### RESULTADOS

Los folíolos provenientes de plantas *in vitro* presentaron mayor porcentaje de regeneración (Figura 1a) y mayor área regenerada (Figura 1b).



**Figura 1:** Regeneración de folíolos del genotipo PampaWT provenientes de tres ambientes (*in vitro*, sala de crecimiento e Invernáculo). a. Porcentaje de regeneración a lo largo del tiempo. b. Área regenerada (cm<sup>2</sup>) promedio a los 32 días de ensayo. Las barras corresponden a las medias + E.E. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) según el test de comparaciones múltiples DGC.

A los 64 días, los explantes provenientes de plantas *in vitro* presentaron mayor número y altura de tallos (Figura 2), mientras que a los 60 días en MS no existieron diferencias significativas (p<0,05).



**Figura 2:** Elongación de tallos a los 64 días del cultivo *in vitro* de folíolos del genotipo PampaWT provenientes de tres ambientes (*in vitro*, sala de crecimiento e Invernáculo). a. Número de tallos por explante. b. Altura promedio de los tallos (mm). Las barras corresponden a las medias + E.E. Letras distintas indican diferencias significativas (p<0,05) según el test de comparaciones múltiples DGC.

### CONCLUSIONES

Los explantes obtenidos a partir de plantas *in vitro* regeneraron en menor tiempo, lo cual incidió en el número y altura de tallos. A partir de estos resultados, se resolvió utilizar folíolos provenientes del genotipo PampaWt cultivado *in vitro* como explantes para la transformación genética de *L. tenuis*.

### BIBLIOGRAFÍA

- Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M., Gonzalez, L., Tablada, M., & Robledo, C. W. (2020). InfoStat: software estadístico. Córdoba: Universidad Nacional de Córdoba.
- Espasandin, F. D., Collavino, M. M., Luna, C. V., Paz, R. C., Tarragó, J. R., Ruiz, O. A., Mroginski, L. A., & Sansberro, P. A. (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lotus tenuis* and regeneration of transgenic lines. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 102(2), 181–189. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9720-x>.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. [doi:10.1038/nmeth.2089](https://doi.org/10.1038/nmeth.2089)