

UNIVERSIDAD DE LA REPUBLICA

FACULTAD DE AGRONOMIA

ANÁLISIS DE LAS CONDICIONES PARA LA
TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE *TRIFOLIUM*
PRATENSE L.

FACULTAD DE AGRONOMIA

por

DEPARTAMENTO DE
CULTIVACIÓN Y
BIBLIOTECA

María Eugenia ABREU CARDOZO

María Elena TAVARES EIRALDI

TESIS presentada como uno de
los requisitos para obtener el
título de Ingeniero Agrónomo
(Orientación Agrícola-Ganadero
y Ganadero-Agrícola).

MONTEVIDEO

URUGUAY

1999

Tesis aprobada por:

Director: Ing. Agr. Daniel Pagliano

Dra. Cristina Mazzella

Dr. Jorge Monza

Fecha: 5 de marzo de 1999

Autores: María Eugenia ABREU CARDOZO

María Elena TAVARES EIRALDI

AGRADECIMIENTOS

- Al Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria por haber permitido la realización de este trabajo.
- Al Ing. Agr. Daniel Pagliano, director de esta tesis, por la participación, orientación y apoyo.
- A los Dres. Jorge Monza y Cristina Mazzella, por las sugerencias y evaluación de este trabajo.
- Al personal de la Unidad de Biotecnología de la Estación Experimental INIA Las Brujas.
- Al personal de la biblioteca de la Unidad Experimental INIA Las Brujas, por la colaboración en la búsqueda de material bibliográfico.
- A nuestras familias y amigos por el apoyo brindado.

TABLA DE CONTENIDO

	Página
PÁGINA DE APROBACIÓN.....	II
AGRADECIMIENTOS.....	III
LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES.....	IV
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA.....	2
II.1 PRODUCCIÓN FORRAJERA EN URUGUAY.....	2
<u>II.1.1 Clima y suelo</u>	3
<u>II.1.2 Fertilización fosfatada</u>	3
<u>II.1.3 Implantación</u>	4
<u>II.1.4 Manejo</u>	4
<u>II.1.5 Competencia y Alelopatía</u>	5
<u>II.1.6 Rhizobium</u>	5
<u>II.1.7 Enfermedades</u>	6
II.2 BIOTECNOLOGÍA DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS.....	7
<u>II.2.1 Cultivo de tejidos</u>	7
II.2.1.1 Cultivo de meristemas.....	8
II.2.1.2 Cultivo de anteras y producción de haploides.....	8
II.2.1.3 Regeneración <i>in vitro</i> de plantas, cultivo de callos y variación somaclonal.....	9
II.2.1.4 Suspensión de células embriogénicas y cultivo de protoplastos.....	10
<u>II.2.2 Hibridación somática</u>	10
<u>II.2.3 Transformación genética</u>	11
II.2.3.1 Transformación mediante <i>Agrobacterium</i>	11
II.2.3.2 Transformación directa.....	12
<u>II.2.4 Aplicaciones y perspectivas</u>	13
II.3 INGENIERÍA GENÉTICA DE TRÉBOL ROJO.....	15
<u>II.3.1 Regeneración</u>	15
<u>II.3.2 Transformación</u>	16
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	18
III.1 MATERIALES.....	18
III.2 MÉTODOS.....	19
<u>III.2.1 Embriogénesis Somática</u>	21
III.2.1.1 Regeneración y selección.....	22

<u>III.2.2 Organogénesis Directa</u>	23
III.2.2.1 Protocolo de transformación de Larkin <i>et al.</i> , (1996).....	24
III.2.2.2 Protocolo de transformación de Larkin <i>et al.</i> , (1996), modificado por Spangenberg (com. pers.).....	25
<u>IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</u>	27
<u>IV.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA</u>	27
<u>IV.1.1 Regeneración</u>	27
IV.1.1.1 Formación de callo.....	27
IV.1.1.2 Morfogénesis.....	28
IV.1.1.3 Formación de núcleos organogenéticos.....	29
<u>IV.1.2 Selección</u>	32
<u>IV.1.3 Transformación</u>	33
<u>IV.2 ORGANOGÉNESIS DIRECTA</u>	35
IV.2.1 <u>Esterilización</u>	35
IV.2.2 <u>Calibración de Kanamicina</u>	36
IV.2.3 <u>Protocolo de Larkin <i>et al.</i>, (1996)</u>	37
IV.2.4 <u>Protocolo de Larkin <i>et al.</i>, (1996) modificado por Spangenberg (com. pers.)</u>	39
<u>IV.3 CONSIDERACIONES GENERALES</u>	42
<u>IV.3.1 Variable bacteria</u>	42
<u>IV.3.2 Afinidad bacteria-planta</u>	42
<u>IV.3.3 Variable genotipo</u>	42
<u>V. CONCLUSIONES</u>	44
<u>VI. RESUMEN</u>	45
<u>VII. SUMMARY</u>	46
<u>VIII. BIBLIOGRAFIA</u>	47
<u>IX. ANEXOS</u>	52

LISTA DE CUADROS E ILUSTRACIONES

Cuadro n°	Página
1. Diseño de un módulo tipo de transformación y número de explantes.....	20
2. Experimentos y módulos desarrollados.....	21
3. Porcentaje de explantes no contaminados luego de los métodos de esterilización.....	36

Figura n°

1. Producción promedio (tt MS/Há) y coeficiente de variación de praderas (CV%).....	3
2. Diseño del plásmido pBI121.....	18
3. Pasos para la obtención de explantes de peciolo y folíolos.....	22
4. Pasos para la obtención de explantes de cotiledones.....	23
5. Porcentaje de formación de callo para los 25 clones tanto en peciolo como folíolo.....	27
6. Formación de callo en peciolo y folíolo.....	28
7. Ejemplo de morfogénesis generada a partir de explantes de peciolo y folíolos..	28
8. Porcentaje de morfogénesis para los 25 clones en peciolo y folíolo.....	29
9. Ejemplo de núcleos organogénéticos en callo y bajo lupa estereoscópica.....	30
10. Porcentaje de formación de núcleos organogénéticos en peciolo.....	31
11. Porcentaje de formación de núcleos organogénéticos en folíolos.....	31
12. Clon 90-2, porcentaje de formación de callo, porcentaje de organogénesis y clases de formación de núcleos organogénéticos en porcentaje para peciolo y folíolo.....	33
13. Porcentaje de regeneración en la transformación de explantes de peciolo y folíolo.....	34
14. Tratamientos de transformación según Quesenberry <i>et al.</i> , (1996).....	34
15. Porcentaje de regeneración de cotiledones en condiciones crecientes de Kanamicina.....	36
16. Calibración de Kanamicina.....	37
17. Porcentaje de regeneración en módulos del protocolo de Larkin <i>et al.</i> , (1996)....	38
18. Regeneración a partir de un explante de cotiledón siguiendo el protocolo de Larkin <i>et al.</i> , (1996).....	39
19. Porcentaje de regeneración en módulos del protocolo de Larkin <i>et al.</i> , (1996) modificado por Spangenberg.....	40
20. Etapas de la regeneración de explantes de cotiledones siguiendo el protocolo de Larkin <i>et al.</i> , (1996) modificado por Spangenberg (com. pers.).....	41

LINTRODUCCION

El estudio de las pasturas cobra importancia dado que son la base de las producciones de carne, leche y lana, de gran importancia a nivel nacional. Dentro de éstas, las pasturas cultivadas tienen gran incidencia en estos rubros, ya que determinan mayores aportes de forraje tanto en cantidad como en calidad. Las pasturas cultivadas se componen por lo general de mezclas de gramíneas y leguminosas forrajeras, las que interactúan entre sí promoviendo una mayor productividad de la pradera. Las leguminosas incluidas en estas pasturas, cumplen el rol de aumentar el valor nutritivo y la longevidad de ésta.

Una de las leguminosas en las pasturas cultivadas utilizadas es trébol rojo (*Trifolium pratense*), que presenta hábito de vida perenne, pero que bajo nuestras condiciones se comporta como bianual debido a la baja persistencia provocada, entre otros, por el alto número de patógenos al que es susceptible.

En los últimos años se han generado nuevas técnicas para mejorar las características productivas de las pasturas. En este punto la ingeniería genética ha hecho posible la identificación y transferencia de genes particulares entre distintos individuos (plantas, animales y microorganismos). Como herramientas básicas para la aplicación de esta técnica, se utiliza por un lado el cultivo de tejidos, el cual se refiere al crecimiento y mantenimiento de plantas en el laboratorio y está siendo usado para producir copias idénticas (clones) de individuos genéticamente deseables. Por otro lado se utiliza la incorporación de genes de importancia agronómica para las pasturas, dentro del genoma de la planta, la cual debe ser regenerada a partir de una célula transformada.

Esta tesis tiene como objetivo el análisis de las técnicas que permitan la obtención de plantas transgénicas a partir de materiales de trébol rojo nacionales. Esto incluye el análisis de las condiciones en las que sea posible regenerar una planta a partir de una célula, la capacidad regenerativa de los materiales utilizados y las condiciones para transformar estos materiales.

II. REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

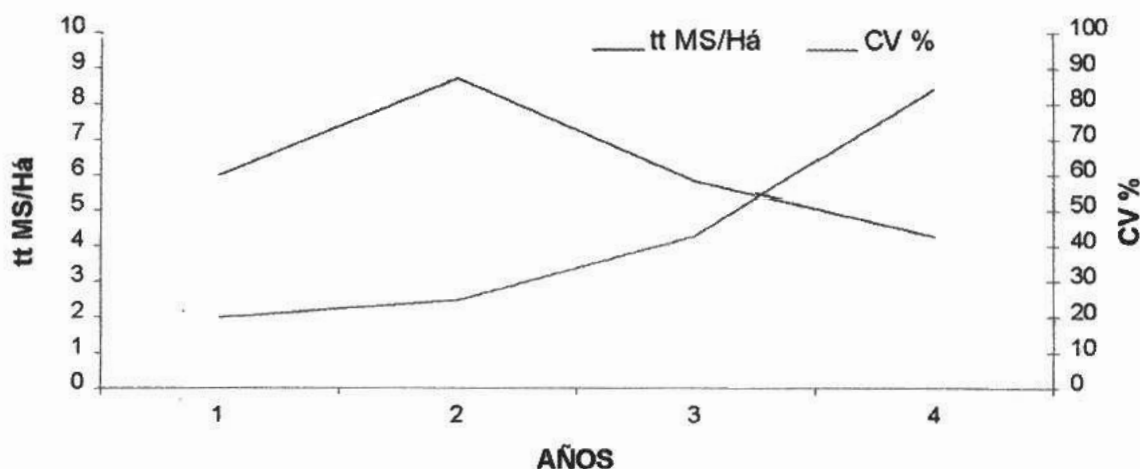
II.1 PRODUCCIÓN FORRAJERA EN URUGUAY

Las pasturas naturales representan el principal recurso forrajero del Uruguay, comprendiendo el 85% de la superficie total productiva. El 15% restante está comprendido por cultivos cerealeros y pasturas cultivadas. Entre las características de las pasturas naturales se deben considerar su marcada estacionalidad y variabilidad entre años, así como su escaso aporte en cantidad y calidad de forraje determinado por las especies que lo constituyen, en su mayoría gramíneas (81%).

Se ha demostrado que es posible elevar los niveles de producción y calidad utilizando mejoramientos forrajeros de gramíneas y leguminosas. Uno de los objetivos más importantes de la producción de forraje mediante pasturas cultivadas mixtas, es obtener de estos cultivos los máximos rendimientos de materia seca por hectárea (t MS/Há), explotando en forma eficiente al mismo tiempo los principales atributos que presentan las gramíneas y las leguminosas. Las gramíneas aportan a la mezcla: productividad sostenida por años, adaptación a gran variedad de suelos, facilidad de mantenimiento de poblaciones adecuadas, estabilidad en la pastura y baja sensibilidad tanto al pastoreo como a enfermedades, insectos e invasión de malezas. Por otra parte la fijación biológica de N₂, el alto valor nutritivo y la promoción de pasturas longevas está dado por las leguminosas. (Carámbula, 1977).

La productividad de las pasturas convencionales alcanza su máximo rendimiento en el segundo año, siguiendo un período de rendimientos decrecientes con una mayor variabilidad de los mismos (ver Figura nº1). Gran parte de este comportamiento es debido a la evolución del componente leguminosa en el tapiz vegetal, el cual presenta un máximo de producción en el segundo año, luego declina y generalmente no persiste más allá del tercer o cuarto año. Esta baja persistencia de las leguminosas condiciona marcadamente la producción de las praderas sembradas. La persistencia es el resultado de la acción de diversos factores tales como el clima, variedades, enfermedades y plagas, manejo, aspectos microbiológicos, competencia, etc., los que interaccionan en forma diferente en cada ambiente dando origen a un problema complejo y propio de cada situación en particular.

Figura n° 1: Producción promedio (tt MS/Há) y coeficiente de variación de praderas (CV %). (Carámbula *et al.*, 1979). La gráfica muestra un pico de producción al segundo año de implantada decayendo rápidamente en los años siguientes, mientras el coeficiente de variación de la producción de la pradera va en aumento. tt MS/Há: toneladas de materia seca por hectárea; CV %: coeficiente de variación expresado en porcentaje.



II.1.1 Clima y suelo

Las leguminosas tienen generalmente un menor rango de adaptación y menor elasticidad a estreses ambientales y de pastoreo que las gramíneas y requieren, por lo tanto, mejor manejo para persistir y permanecer productivas.

Los factores climáticos que parecen afectar más el crecimiento y persistencia de las leguminosas en Uruguay son los déficit y excesos hídricos y las altas temperaturas. Desde el punto de vista edáfico la limitante más generalizada es el bajo nivel de fósforo en el suelo pudiendo también ser un problema la compactación superficial.

El estrés que imponen los factores bióticos (plagas, enfermedades, etc.) son aditivos de factores abióticos (mal manejo, clima, etc.) y cuanto más extremos sean éstos, especialmente la sequía, más sensible es el sistema a los primeros (García, 1992).

II.1.2 Fertilización fosfatada

Los suelos del Uruguay son deficientes en fósforo y la falta de este nutriente impide generalmente un normal desarrollo de las leguminosas. Sin embargo, existen

evidencias de que aún en situaciones de alta fertilización inicial y su mantenimiento, la declinación del componente leguminosa igual se produce (Castro, 1981; García, 1989), aunque esta tasa de declinación es menor cuanto mayores son los niveles de refertilización. Sheath *et al.*, (1988) sostienen que para la situación uruguaya existe poca evidencia de que la fertilidad del suelo por sí sola impida la persistencia de las leguminosas introducidas en la pastura.

II.1.3 Implantación

Si no existe una implantación satisfactoria difícilmente podrá lograrse alta producción y persistencia. Es importante el logro de un alto número inicial de plantas implantadas pues si éste es deficitario será difícil de solucionar. El primer punto a tener en cuenta es la calidad de la semilla, ya que si ésta no es buena no se obtendrá una buena pastura.

Los métodos de siembra son elementos manejables e influyen en la instalación de pasturas. Las técnicas tendientes a reducir la competencia entre el cultivo y la pastura en este tipo de siembra deben ser consideradas muy especialmente como forma de mejorar la implantación y por consiguiente la persistencia.

Aparentemente las plantas de leguminosas son más susceptibles al ataque de hongos durante los primeros días de crecimiento, luego se vuelven más resistentes. Como alternativas para controlar esto se recomienda, por un lado, la siembra cuando las condiciones son más favorables para una germinación y crecimiento rápidos, para minimizar las pérdidas de plantas durante el periodo en el cual son más susceptibles a la infección, y por otro, el uso de semillas tratadas con fungicidas que no deben ser tóxicos para *Rhizobium*. (García, 1992).

II.1.4 Manejo

El manejo de pasturas tiene generalmente dos objetivos: aumentar la producción y promover la persistencia de las especies deseables. En el caso particular de las leguminosas, éstas presentan distintos requerimientos de manejo en función de su fisiología, hábito de crecimiento, etc.. Por consiguiente, la forma en que las mismas son defoliadas (intensidad, frecuencia, época del año) tienen efectos muy importantes en su producción posterior.

El manejo puede afectar la persistencia de leguminosas por un efecto directo sobre las mismas, o indirecto, ya sea promoviendo o debilitando los efectos competitivos de las gramíneas asociadas. Generalmente la persistencia de las

leguminosas es más pobre cuanto más vigoroso y denso es el crecimiento de la gramínea acompañante.

Se acepta que en ambientes con alta erraticidad de lluvias es difícil tener estrategias de manejo muy refinadas. Por eso el éxito en el manejo de las pasturas debe basarse en el conocimiento de los factores que afectan el crecimiento de las plantas y en el ajuste permanente del equilibrio entre las necesidades de las pasturas y los animales. (García, 1992).

II.1.5 Competencia y Alelopatía

Las leguminosas forrajeras se usan en mezclas con gramíneas y con otras especies de leguminosas forrajeras y están sujetas a competencia. El clima del Uruguay permite el crecimiento de gramíneas templadas y subtropicales, esto hace que normalmente en una pastura el componente gramínea pueda presentarse como un importante factor de competencia para las leguminosas por su mayor adaptación a situaciones de estrés. Hochman y Helyar (1989) citado por García, (1992), sostienen que las leguminosas muy raramente dominan ecosistemas naturales y que el mantenimiento de un contenido de leguminosas agrónomicamente deseable en pasturas puede ser considerado como un intento de sostener una condición de no equilibrio.

El término alelopatía denota cualquier efecto dañino, directo o indirecto, de interacción química o bioquímica entre plantas. Estas interacciones son complejas y se confunden muchas veces con competencia. Se ha sugerido la existencia de efectos alelopáticos como uno de los factores involucrados en la declinación de las leguminosas en el tapiz. Se ha encontrado, por ejemplo, que los extractos foliares de festuca reducen la germinación de trébol rojo (varios autores citados por García, 1992).

II.1.6 *Rhizobium*

Un requisito indispensable para la persistencia de las leguminosas es el establecimiento y mantenimiento de una simbiosis efectiva leguminosa-*Rhizobium*. Estudios realizados por Labandera *et al.*, (1988) y Danso *et al.*, (1991) citados por García, 1992, sugieren que para leguminosas de importancia agronómica la declinación observada en dichos experimentos no estuvo asociada con una falla en la simbiosis, por lo que se puede afirmar que la simbiosis con la cepa del inoculante es efectiva y no es una de las causas que llevan a la declinación en la producción.

II.1.7 Enfermedades

La alteración de una o varias de las funciones de una planta por la acción de un patógeno incide en la producción de la pradera. Funciones como fotosíntesis, absorción de agua y nutrientes, fijación de nitrógeno, translocación y respiración son necesarias para cumplir con los requerimientos de mantenimiento y desarrollo. Cualquier alteración en las mismas resulta en un costo energético de reparación a expensas del desarrollo de la planta, y en consecuencia del rendimiento; o en el caso extremo a expensas del mantenimiento de la planta provocando así su muerte.

A nivel de la población de plantas, el desarrollo de enfermedades se traduce en pérdidas económicas en la producción de la pastura, afectando tanto el rendimiento como la calidad del producto (forraje, semilla). Se debe considerar además el efecto sobre la persistencia, lo cual resulta en una menor vida útil de la pastura.

Existen diversos microorganismos patógenos que causan enfermedades infecciosas en las leguminosas, incluyendo hongos, virus, micoplasma, bacterias y nemátodos. Las enfermedades causadas por hongos constituyen el grupo de mayor importancia, seguido por las enfermedades virósicas. Por tratarse de especies perennes existen continuas oportunidades para que interactúen los diversos patógenos, ocasionando enfermedades en forma simultánea o secuencial con efectos acumulativos en la vida de la pastura (Altier, 1996).

Las enfermedades se caracterizan según afecten la implantación del cultivo o al cultivo ya establecido. Las enfermedades de implantación son causadas por patógenos del suelo o de la semilla, por ejemplo: podredumbre de semilla, ahogamiento de plántulas y "damping-off", causadas por hongos de los géneros *Pythium*, *Rhizoctonia* o *Fusarium*. Las enfermedades que afectan al cultivo ya establecido se pueden agrupar en base a la parte de la planta afectada: órganos aéreos y subterráneos o ubicados a nivel del suelo. Algunos ejemplos de enfermedades de órganos aéreos son: manchas foliares, canchros, antracnosis, roya, oídio, mildiu y virosis. Los virus más comúnmente encontrados en leguminosas forrajeras son: mosaico de la alfalfa (AMV), mosaico del trébol blanco (WCMV), mosaico amarillo del poroto (BYMV), mosaico amarillo de trébol (CYMV) y nervadura amarilla de trébol (CYVV). (Altier, 1995).

Las enfermedades causadas por virus, si bien se manifiestan en la hoja, generalmente resultan en enfermedades sistémicas que reducen el vigor de la planta y su productividad. Afectan la fisiología de la planta de diversas formas: reducen el crecimiento foliar y radicular, incrementan la susceptibilidad a los patógenos que causan

podredumbre radicular y la vulnerabilidad a estreses climáticos y edáficos, e interfieren con los procesos de nodulación y fijación simbiótica de nitrógeno.

Los virus son agentes patógenos obligados, que necesitan de la maquinaria biológica de las células del hospedante para su multiplicación. Las vías de transmisión y las formas de persistencia varían entre los distintos grupos de virus. Pueden ser transmitidos por semilla, insectos, nemátodos, hongos, cuscuta, y en forma mecánica (efecto del pastoreo directo de los animales y cortes), y a su vez pueden persistir en plantas vivas, en semillas y en los vectores (Altier, 1988).

En el INIA La Estanzuela, se están llevando a cabo programas de mejoramiento de leguminosas forrajeras y uno de los objetivos es el incremento de resistencia a enfermedades que afectan la persistencia de las pasturas. En trébol rojo se busca incrementar la resistencia a enfermedades de raíz y corona, y se eliminan de los ensayos aquellos materiales susceptibles a enfermedades virósicas. La otra leguminosa en que se está realizando mejoramiento genético, para la mejora de la persistencia es en *Lotus corniculatus*, a través de la selección fenotípica recurrente a campo (Altier y Rebuffo, 1996).

II.2 BIOTECNOLOGIA DE LEGUMINOSAS FORRAJERAS

El mejoramiento genético a través del método convencional de plantas alógamas autoincompatibles como las leguminosas forrajeras es lento y representa un desafío para el mejorador, ya que las plantas son generalmente heterocigotas y la autoincompatibilidad no permite la expresión de la endogamia.

Como parte de los programas de mejoramiento en pasturas se han usado algunas técnicas biotecnológicas como el cultivo de anteras para la generación de haploides, la hibridación somática para la combinación de germoplasma de especies incompatibles sexualmente, la transformación genética para la introducción de genes de interés agronómico y los marcadores moleculares como herramientas para la identificación de cultivares. Estas técnicas complementarían o acelerarían los métodos convencionales ya que amplían la información genética y ofrecen herramientas adicionales para la identificación de cultivares y determinación de la pureza varietal (Spangenberg *et al.*, 1997).

II.2.1 Cultivo de tejidos

Los sistemas de regeneración de plantas a partir de órganos, tejidos y células cultivadas *in vitro* se realizan actualmente para importantes gramíneas y leguminosas forrajeras. En los últimos 25 años han sido desarrolladas técnicas como cultivos de

anteras, meristemas y callos, cultivos de suspensiones celulares y protoplastos y se han aplicado a un amplio rango de especies.

II.2.1.1 Cultivo de meristemas

Se han desarrollado eficientes métodos para el cultivo *in vitro* de ápices vegetativos y florales para diferentes gramíneas y leguminosas forrajeras. Estas técnicas de cultivo de tejidos son útiles para el mejoramiento y la producción de semillas de cultivos forrajeros y son también de importancia para la erradicación del virus, almacenamiento de germoplasma *in vitro* y la propagación clonal. La erradicación de virus por cultivo de meristemas ha sido lograda en trébol blanco (Barnett *et al.*, 1975) y trébol rojo (Phillips y Collins, 1979). El cultivo de meristemas y la introducción *in vitro* de la planta pueden ser usadas para la propagación de plantas madre de un cultivar almacenadas *in vitro* de manera de incrementar la cantidad de semilla producida.

Si bien el almacenamiento de germoplasma y la propagación de plantas de gramíneas y leguminosas forrajeras es por semilla, es necesario el cultivo de meristemas con el propósito de mantener durante varios años y propagar vegetativamente genotipos saneados.

Han sido mantenidos con vida a bajas temperaturas (2-6 °C) de uno a ocho años meristemas apicales correspondientes a raigrás italiano, trébol blanco y trébol rojo. Para el almacenamiento a largo plazo de meristemas de trébol blanco se usaron técnicas criogénicas (conservación a bajas temperaturas). El mantenimiento de plantas sexualmente estériles tales como haploides o mutantes estériles, aneuploides raras y de plantas con inestable composición cromosómica, son un potencial adicional en la aplicación del cultivo de meristemas. (Spangenberg *et al.*, 1997).

Para plantas que son convencionalmente cultivadas a campo o invernáculo existen problemas sanitarios y de mantenimiento. Esto puede ser vencido a través del uso de cultivo de meristemas, almacenamiento aséptico *in vitro* de plantines y propagación clonal (Phillips y Collins, 1984). La efectiva eliminación de virus de plantas infectadas, el limitado alcance para inducir nueva variación genética y una acelerada producción por el precoz desarrollo de tallos a partir de yemas axilares, hacen del cultivo *in vitro* de ápices vegetativos y florales una herramienta atractiva.

II.2.1.2 Cultivo de anteras y producción de haploides

La producción de plantas haploides vía el cultivo de anteras en leguminosas forrajeras ha sido demostrada solo para *Medicago sativa* (diversos autores citados por Spangenberg *et al.*, 1997). Para la mayoría de las especies de gramíneas y leguminosas

forrajeras, el desarrollo de métodos de cultivo de anteras aún es prematuro, permitiendo solamente la regeneración genotipo-dependiente de pocas plantas verdes haploides. La aplicación del cultivo de anteras en planes de mejoramiento de plantas forrajeras puede llegar a ser exitoso si las técnicas permiten la recuperación de un suficiente número de plantas verdes dobles haploides de un amplio rango de germoplasma útil comercialmente.

II.2.1.3 Regeneración *in vitro* de plantas, cultivo de callos y variación somaclonal

Se han desarrollado protocolos para diferentes gramíneas y leguminosas forrajeras para la regeneración de plantas *in vitro* a partir de tejido meristemático joven y cultivo de callos. Han sido regeneradas plantas de distintas leguminosas forrajeras a partir de cultivo de tejidos, que pertenecen a los géneros *Lotus*, *Medicago*, *Stylosanthes* y *Trifolium*. En leguminosas forrajeras, se ha observado que generalmente los tejidos inmaduros responden más rápidamente que los maduros, y los tejidos meristemáticos tienden a regenerar plantas más eficientemente que los no meristemáticos (Phillips y Collins, 1984). Los explantes usados generalmente para la regeneración de plantas de leguminosas forrajeras *in vitro* fueron principalmente segmentos de cotiledones, hipocótilos, secciones de semillas, hojas, pecíolos y segmentos de estolones (Spangenberg *et al.*, 1997).

Los cultivos de gramíneas y leguminosas forrajeras han mostrado capacidad para producir tallos adventicios y embriones somáticos que finalmente darán plantas completas. En leguminosas forrajeras, la regeneración de plantas de alfalfa a partir de cultivo *in vitro* es exclusiva vía embriogénesis somática, mientras que la regeneración en otras leguminosas forrajeras como ha sido estudiado en especies de *Trifolium* y *Lotus*, es más frecuentemente vía organogénesis de tallo (McKersie y Brown, 1997).

La variación somaclonal, es decir la recuperación de cambios genéticos en plantas regeneradas a partir de cultivo de tejidos, ha sido observada en regenerantes *in vitro* para gramíneas y leguminosas forrajeras. Las plantas deben mostrar variación considerable en morfología, capacidad de desarrollo y estabilidad genética. La regeneración de plantas a través del cultivo de callos ofrece una oportunidad para descubrir la variabilidad natural y usar potencialmente esa variabilidad al azar. Sin embargo ha sido limitado el desarrollo de cultivares mejorados y el potencial para explotar la variación genéticamente heredable, para desarrollar nuevos materiales de mejoramiento en cultivos forrajeros mediante mutaciones.

II.2.1.4 Suspensión de células embriogénicas y cultivo de protoplastos

En las especies de leguminosas forrajeras, donde el aislamiento de protoplastos a partir de tejidos diferenciados, que tienen la habilidad de desdiferenciarse, el establecimiento del cultivo de suspensiones embriogénicas ha sido principalmente usado tanto para la producción de semilla artificial (McKersie y Brown, 1997) como para la selección *in vitro* (Phillips y Collins, 1984). Se han aislados protoplastos totipotentes de diferentes fuentes como hojas, cotiledones, hipocotilos y suspensiones celulares y de callos. De esta forma se obtuvieron plantas de *Lotus*, *Medicago*, *Onobrychis* y *Trifolium* derivadas de protoplastos.

El establecimiento de sistemas de regeneración de gramíneas y leguminosas forrajeras proporciona las bases experimentales necesarias para la manipulación genética a nivel celular. La fusión de protoplastos para la producción de híbridos somáticos y cíbridos (híbridos citoplasmáticos), la transferencia directa de genes al protoplasto y la transferencia de genes vía biolística (ver II.2.3.2) a suspensiones celulares embriogénicas permiten la generación de plantas transgénicas (Spangenberg, *et al.*, 1997).

II.2.2 Hibridación somática

En leguminosas forrajeras la mayoría de los esfuerzos para la obtención de plantas híbridas somáticas se centraron en *Medicago* y *Lotus*. El inconveniente de plantas híbridas somáticas obtenidas en *Trifolium* está relacionada a las dificultades en regenerar plantas enteras a partir de protoplastos (Honkanen y Ryöpy, 1989). Han sido regeneradas plantas híbridas somáticas interespecíficas e intergenéricas, encontrándose de estas últimas menos casos publicados. Los híbridos somáticos fueron identificados y caracterizados por isoenzimas, análisis citológicos, marcadores moleculares y por características morfológicas (Arcioni *et al.*, 1997). Todos los híbridos somáticos de *Lotus* fueron completamente estériles, mientras que los de *Medicago* difieren en los niveles de autogamia y alogamia (Arcioni *et al.*, 1997).

A pesar de los esfuerzos necesarios para generar y evaluar híbridos somáticos en combinaciones más amplias, los resultados han demostrado que la fusión de protoplastos provee una poderosa herramienta para transferir genoma nuclear en combinaciones intra o intergenéricas en gramíneas y leguminosas forrajeras. Estas técnicas facilitan la limitada transferencia de genes entre especies sexualmente incompatibles para complementar o realzar los programas de hibridación convencional en forrajeras. (Spangenberg *et al.*, 1997).

II.2.3 Transformación genética

En la última década se han obtenido considerables progresos en el desarrollo de protocolos para la producción de gramíneas y leguminosas forrajeras transgénicas. Los principales métodos para la generación de plantas transgénicas para gramíneas forrajeras son la transformación mediante biolística y protoplastos, mientras que para la producción de leguminosas forrajeras transgénicas el método más ampliamente usado es la transformación mediada por *Agrobacterium*.

II.2.3.1 Transformación mediante *Agrobacterium*

A. tumefaciens y *A. rhizogenes* son responsables de causar enfermedades en determinadas plantas, la primera produce "agalla de corona" causada por la formación de tumores debido a una multiplicación excesiva de células y la segunda "raíces en cabellera" a través de la producción de raíces en el sitio de infección.

Agrobacterium es una bacteria fitopatogénica capaz de causar tumores en plantas infestadas, la bacteria transfiere segmentos propios de ADN al núcleo de la célula vegetal el cual forma parte integral del genoma. Por esta habilidad natural, *Agrobacterium* es usado en ingeniería genética para introducir genes específicos en plantas.

Las cepas patogénicas de *A. tumefaciens* poseen el plásmido Ti y *A. rhizogenes* el plásmido Ri. Ambas pueden transferir el plásmido a la planta en los eventos de transformación. La región transferida del plásmido corresponde al ADN de transferencia y está delimitada por dos secuencias repetidas de 25 pares de bases a cada lado de la región (borde izquierdo y derecho). Esto es de gran utilidad ya que permite sustituir la información contenida en esta región por otra de interés. Por otra parte encontramos la región de virulencia, también como componente del plásmido, donde se codifican las proteínas involucradas en el proceso de transferencia.

Es importante mencionar la importancia de *A. tumefaciens* en la transformación, ya que la transferencia de los genes es altamente eficiente y su aplicación no es dificultosa. La afinidad de *Agrobacterium* por determinadas especies puede ser en muchos casos un inconveniente, siendo este método más efectivo cuando se trata de dicotiledóneas. Se deben tener en cuenta dos aspectos cuando nos referimos a la bacteria y su huésped: la eficiencia para transferir el ADN a la planta y la capacidad que tiene la planta de proliferar luego de la transferencia. Debido a esta razón es que existen diferencias en los sistemas de transformación, ya que ambos aspectos deben ocurrir para obtener una buena transformación.

Se han desarrollado métodos para la generación de plantas transgénicas en leguminosas forrajeras vía *Agrobacterium tumefaciens* o *A. rhizogenes* para *Lotus angustissimus*, *L. corniculatus*, *L. japonicus*, *Medicago arborea*, *M. sativa*, *M. truncatula*, *Onobrychis viciifolia*, *Stylosanthes humilis*, *S. guianensis*, *Trifolium pratense*, *T. repens* y *T. subterraneum*. La transformación mediada por biolística y protoplastos se usó en *Medicago* sp., pero no ha sido muy adoptada. (varios autores citados por Spangenberg, 1997).

Si bien, la respuesta de un cultivar dependiente ha sido observada para *A. tumefaciens* (Du *et al.*, 1994; Samac, 1995) y *A. rhizogenes* (Golds *et al.*, 1991), la transformación mediada por *Agrobacterium* se ha vuelto rutinaria para la mayoría de las especies de leguminosas, por ejemplo alfalfa, trébol blanco y trébol subterráneo.

Es importante mencionar que existen diferencias entre cepas de *A. tumefaciens*. Se estudió la velocidad en el inicio de la formación de tumor y en el tamaño del callo en garbanzo, observándose que la cepa C58 (LBA4404) era más lenta en el inicio de la formación de callo y a su vez éste era de tamaño menor al producido por las otras cepas estudiadas (A281, A6 y A348) (Islam *et al.*, 1994). Sin embargo, White y Greenwood, 1987, comparando LBA4404 con la cepa GV3850 en la infección de trébol blanco, observaron que el porcentaje de segmentos inoculados resistentes a Kanamicina fue mayor para LBA4404 que para GV3850, comprobando la gran variabilidad de infección entre cepas y entre especies. Faria *et al.*, (1997), en su trabajo de regeneración de tallos adventicios de frambuesa transformados con *Agrobacterium*, testearon siete cepas salvajes de esta bacteria determinando que la precursora de LBA4404 (C58) fue la más virulenta.

II.2.3.2 Transformación directa

La biolística o bombardeo de microproyectiles es un método físico que emplea partículas metálicas a alta velocidad para liberar ADN en células, pudiendo resultar esto en una transformación estable. Esto se logró en numerosas especies de plantas, donde los microproyectiles son capaces de transportar ADN a las células e integrarse.

A través del bombardeo con microproyectiles a células y tejidos de plantas, se ha logrado la producción de plantas transgénicas, evitando las barreras de la especificidad de *Agrobacterium* con determinadas especies y también la posibilidad de cultivo y regeneración de protoplastos luego de la transformación. Por esto ha sido muy exitoso este método en plantas donde el cultivo de tejidos se dificulta. Como blancos para la transformación efectiva mediante biolística se usan cultivos embriogénicos en suspensión, compuestos generalmente por células preembriogénicas o grupos de células meristemáticas.

Cabe mencionar la importancia del método en cuanto a la facilidad que otorga en la transferencia de genes a células totipotenciales de embriones, meristemas, etc. y a la gran aplicabilidad que tiene debido a que es un método físico, a diferencia de los métodos de naturaleza biológica como lo es la transformación mediada por *Agrobacterium*. La biolística ha demostrado ser un método muy efectivo en la producción de transgénicos.

II.2.4 Aplicaciones y perspectivas

En años recientes se han hecho progresos significativos en la manipulación genética de gramíneas y leguminosas forrajeras. Actualmente se aplican estas tecnologías para generar germoplasmas nuevos e incorporar eficientemente éstos en los programas de mejoramiento para el desarrollo de cultivares.

La calidad forrajera, resistencia a daños y pestes, tolerancia a estreses abióticos, capacidad fijadora de nitrógeno, manipulación del crecimiento y desarrollo, así como la producción de proteínas foráneas de relevancia industrial, representan las características blanco para el mejoramiento molecular de pasturas.

Las aproximaciones biotecnológicas para superar las limitantes en calidad forrajera incluyen la modificación del perfil de lignina para mejorar la digestibilidad, expresión de proteínas sobrepasantes del rumen y así aumentar los aminoácidos esenciales, y la eliminación o reducción de la incidencia de factores anti-calidad. Se pueden identificar enzimas determinadas, aislar los genes correspondientes y manipular sus expresiones en pasturas transgénicas, ya que la mayoría de los parámetros de calidad y anti-calidad están asociados con vías metabólicas específicas.

Está siendo explorado el mejoramiento molecular basado en la modificación del perfil de digestibilidad de la lignina por regulación negativa a través de supresión anti sentido y sentido en plantas transgénicas y la expresión de genes que codifican enzimas involucradas en la biosíntesis de lignina.

Un objetivo alternativo para mejorar la digestibilidad y el valor nutritivo de las pasturas ha sido la manipulación de metabolitos de fructanos a través de la expresión de los genes de fructosyl-transferasa para incrementar los niveles de carbohidratos solubles y contrarrestar el decaimiento en la digestibilidad debido a la lignificación (Ye *et al.*, com. pers.). Esta modificación tiene potencial para realzar la performance bajo estrés por sequía (Pilon-Smits *et al.*, 1995).

Diferentes proteínas sobrepasantes ricas en aminoácidos azufrados han sido expresadas en leguminosas forrajeras (Schroeder *et al.*, 1991; Ealing *et al.*, 1994; Khan

et al., 1996) para desarrollar materiales que suplanten la limitante de aminoácidos esenciales en la nutrición animal. Han sido generadas plantas transgénicas de alfalfa y trébol blanco que expresan genes quiméricos de albúminas de pollo y poroto respectivamente (Schroeder *et al.*, 1991; Ealing *et al.*, 1994). De todas formas, se requiere aún optimizar la expresión de los transgenes de modo de alcanzar niveles nutricionales relevantes de acumulación de proteínas sobrepasantes que influyan en la producción animal.

En alfalfa, trébol blanco y trébol rojo puede ser controlada la propensión al meteorismo a través de la expresión de la vía de biosíntesis de taninos en el tejido foliar. Se han publicado ensayos biotecnológicos basados en hibridación somática, para transferir esta característica de especies de leguminosas con niveles altos de taninos, como *Onobrychis* y *Lotus*, a leguminosas libres de taninos como *Trifolium* y *Medicago* (Li *et al.*, 1993). Estudios que comprendan la regulación de la biosíntesis de taninos permitirán llevar a cabo estrategias basadas en tecnologías de genes para modificar la cantidad, estructura y distribución en el tejido de taninos condensados (Morris y Robbins, 1997).

Han sido desarrollados y testados a lo largo de la última década numerosos genes y estrategias para la ingeniería en plantas transgénicas con resistencia a pestes: toxinas de *Bacillus thuringiensis* (Bt), inhibidores de proteasas, inhibidores de alfa amilasa, glucanasas, quitinasas, productos defensivos de plantas, fitoalexinas, proteínas inactivadoras de ribosomas, proteínas de cápside, etc. Algunas de ellas han sido aplicadas para el mejoramiento de pasturas para aumentar la resistencia a pestes.

Las técnicas moleculares proporcionan herramientas para analizar parte por parte las bases moleculares de adaptación de plantas a su medio ambiente, para valorar el vínculo entre cambios bioquímicos específicos y el fenotipo de la planta, y para contribuir al mejoramiento de la planta a la tolerancia a estrés abióticos.

Se han producido gramíneas y leguminosas forrajeras transgénicas resistentes a herbicidas, para uso de la característica *per se* o debido a los genes marcadores elegidos para la selección de transformantes *in vitro* (Deak *et al.*, 1986; D'Halluin *et al.*, 1990; Wang *et al.*, 1992; Khan *et al.*, 1994).

La fijación del nitrógeno por leguminosas forrajeras ha sido estudiada en gran detalle a nivel bioquímico y molecular. Debido a la complejidad de la simbiosis, que requiere la consideración de múltiples genes de dos organismos por separado (bacteria y leguminosa), no se ha publicado ningún caso en que intervenga la ingeniería genética en la fijación biológica de nitrógeno (Vance, 1997).

El uso de marcadores moleculares para poder identificar más precisamente individuos superiores y aumentar la eficiencia de selección tiene gran impacto en la manipulación de caracteres cuantitativos en el mejoramiento de pasturas. Los esfuerzos futuros en el desarrollo y despliegue de la tecnología de marcadores en pasturas estará orientado en la identificación y localización de loci de caracteres cuantitativos a través de la presencia de uno o más marcadores ligados. El uso combinado de ingeniería genética y marcadores moleculares ha sido señalado como una de las bases del mejoramiento genético futuro de especies forrajeras (Spangenberg, com. pers.).

II.3 INGENIERÍA GENÉTICA EN TRÉBOL ROJO

Es indispensable generar un método eficiente de regeneración para que los eventos de transformación puedan expresarse. Si bien los procesos de regeneración y transformación son independientes, ambos son necesarios para poder obtener una planta transgénica. La mayoría de los métodos de transformación requieren la regeneración de una planta entera a partir de una célula transformada, es decir que la regeneración en cultivo de tejidos debe recuperar las células transformadas. Estos métodos por sí solos no permiten obtener una planta transformada, lo que indica lo imprescindible de la ocurrencia de ambos para recuperar dicha planta en un evento de transformación.

II.3.2 Regeneración

En el caso particular de trébol rojo se vio que existe una baja frecuencia de regeneración de los diferentes genotipos a partir de explantes no meristemáticos (5% o menor), siendo la frecuencia levemente mayor cuando se trata de explantes meristemáticos. Esto genera problemas en la selección *in vitro*, ya que es necesario utilizar grandes cantidades de explantes iniciales debido a los bajos porcentajes de regeneración. A su vez al ser trébol rojo una especie alógama, lo que implica una gran variabilidad de genotipos, el número de explantes deberá ser aún mayor. Es importante entonces considerar el abarcar la mayor cantidad de explantes, de forma de evitar el escape de genotipos de buena regeneración, para luego poder aplicar métodos de transformación (Keyes *et al.*, 1980; Myers *et al.*, 1989; Taylor *et al.*, 1989; Quesenberry y Smith, 1993; McLean y Nowak, 1998).

Con el fin de incrementar la frecuencia de regeneración Quesenberry y Smith (1993) realizaron ciclos de selección recurrente en trébol rojo, con lo que, luego de 5 ciclos, obtuvieron porcentajes de 72% partiendo de valores de 4% en ausencia de ciclos de selección. Adicionalmente aumentó el número de plantas regeneradas a partir de un explante pasando de 1 ó 2 en la población inicial, a 100 plantas por explante luego de los ciclos de selección. De esta forma, queda demostrado que la regeneración *in vitro* de trébol rojo es genotipo dependiente.

McLean y Nowak (1998), seleccionaron genotipos capaces de generar embriones somáticos y realizaron una importante revisión sobre la heredabilidad de esta característica. Ellos concluyen que la embriogénesis somática en trébol rojo está controlada por dos loci complementarios y proponen una designación para estos genes (Rn1 y Rn2). También sugieren que esta característica es altamente heredable y fácilmente incorporable a otros genotipos de trébol rojo.

II.3.3 Transformación

Para poder llevar a cabo una transformación es necesario ajustar las condiciones para que ésta pueda realizarse generando un protocolo de transformación eficiente y reproducible. En el trabajo basado en el artículo "Production of Red Clover Transgenic for Neomycin Phosphotransferase II Using *Agrobacterium*", Quesenberry *et al.*, (1996) logran obtener plantas transgénicas de trébol rojo usando el sistema de *Agrobacterium*. Debido a la baja regeneración que presenta esta leguminosa estos autores debieron realizar, previo a la transformación, varios ciclos de selección de forma de obtener altos valores de regeneración. Se evaluaron los efectos de los genotipos de trébol rojo y de las cepas de *Agrobacterium* en los eventos de transformación.

Quesenberry *et al.*, (1996) evaluaron la respuesta de peciolo de trébol rojo a los antibióticos Carbenicilina y Kanamicina en medio de cultivo B5. Observaron que se producía sólo una pequeña reducción en el crecimiento de los explantes con cantidades de Carbenicilina superiores a 340 mg/lit. y que para Kanamicina la reducción se produjo a partir de 12.5 mg/lit. Con esto se demostró que la Carbenicilina prácticamente no afecta a los explantes de trébol rojo y que éstos sí se ven afectados por la Kanamicina. Es importante señalar que estos niveles de antibióticos que inhiben el crecimiento de tejidos de plantas normales varían entre y dentro de especies.

Se vio también que las distintas cepas de *Agrobacterium* mostraban variación entre especies en relación a la efectividad de la infección y transformación. Dentro de especies los diferentes genotipos mostraban variación en la respuesta a la transformación por cepas específicas de *Agrobacterium*. Cabe destacar la importancia que tienen las interacciones del genotipo de la planta con la cepa de *Agrobacterium* en trébol rojo por presentar una gran diversidad de genotipos dentro de poblaciones.

Una limitante en el sistema de incorporación de ADN en la planta es la identificación de las células o plantas que han sido transformadas. Para los sistemas de *Agrobacterium* se utilizaron el marcador selectivo nptII que confiere resistencia a Kanamicina y el gen reportero GUS con buenos resultados en el monitoreo de los eventos de transformación.

Larkin *et al.*, (1996) en su artículo "Transgenic white clover. Studies with the auxin-responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development" utilizaron el sistema de *Agrobacterium* para transformar trébol blanco a partir de cotiledones de semillas maduras, resultando en un método eficiente para esta especie, ya que es posible obtener plantas transgénicas en más del 50% de los cotiledones tratados. Ellos aprovecharon la capacidad regenerativa de este tipo de explantes, superior a la de los explantes de peciolo utilizados por Quesenberry *et al.*, (1996). Los cotiledones de trébol blanco mostraron una alta capacidad de producir organogénesis directa y de regenerar una planta entera. La alta frecuencia de transformación y la rapidez con que el proceso se da, hace a este método de gran utilidad para transformar trébol blanco. El sistema de transformación fue usado para generar un transgénico con el gen promotor GH3 fusionado con el gen reportero GUS.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

III.1 MATERIALES

Este trabajo se desarrolló en la Unidad de Biotecnología del Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria, INIA Las Brujas.

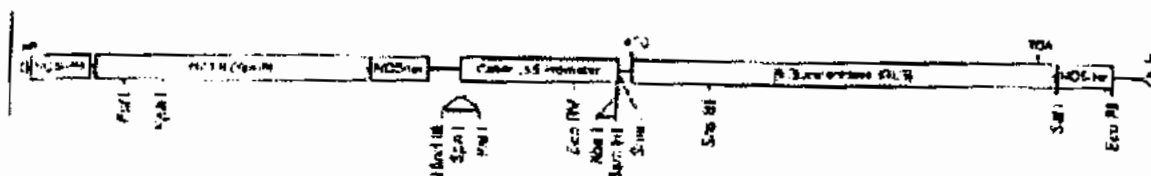
Como material vegetal se usaron distintos tipos de explantes (pecíolos, folíolos y cotiledones) de *Trifolium pratense*, trébol rojo. Esta especie se caracteriza por ser alógama de polinización entomófila y presentar gran variabilidad genotípica dentro de una población.

Por una parte se utilizaron pecíolos y folíolos de 25 clones de trébol rojo seleccionados en el INIA La Estanzuela: 2-1, 9-1, 13-1, 27-2, 34-2, 46-1, 47-1, 47-2, 51-2, 52-1, 55-1, 58-1, 62-1, 70-1, 74-2, 78-1, 78-3, 82-1, -82-2, 83-1, 90-2, 91-1, 91-2, 92-1, 103-2, e introducidos *in vitro* por cultivo de meristemas en el INIA Las Brujas. Esto permitió obtener los clones libres de los virus White Clover Mosaic Virus (WCMV), Alfalfa Mosaic Virus (AMV) y Potyvirus ("indexing" en el laboratorio de fitopatología del INIA Las Brujas).

Paralelamente se trabajó con cotiledones de semilla comercial de la variedad de trébol rojo LE 116, originada de la selección de materiales introducidos de Nueva Zelanda. Esta es una variedad diploide, bianual, de porte semierecto y floración temprana que se destaca por su excelente implantación, precocidad y producción total e invernal. (García *et al.*, 1991)

Para realizar la transformación se usó la cepa de bacteria *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, con el plásmido pBI121 conteniendo el gen marcador nptII que confiere resistencia a Kanamicina y el gen reportero GUS (ver Figura nº2). Esta cepa de *Agrobacterium tumefaciens* presenta resistencia a Rifampicina en su cromosoma, a Streptomycin tanto en el cromosoma como en el plásmido y a Kanamicina solo en el plásmido pBI121.

Figura nº2: Diagrama del plásmido pBI121. Contiene el promotor 35S de Cauliflower mosaic virus, el gen reportero GUS y el gen nptII.



Los medios de cultivo utilizados fueron siete: B5IC, B5IE y B5DE (Gamborg *et al.*, 1968, modificado por Quesenberry y Smith, 1993); B5PB (Gamborg *et al.*, 1968, modificado por Larkin *et al.*, 1996), RIB (Phillips y Collins, 1984, modificado por Larkin *et al.*, 1996) y MSd y MSe (Murashige y Skoog, 1962, citado por George *et al.*, 1987 modificado por Spangenberg, com. pers.), donde se desarrollaron los diferentes tipos de explantes según el experimento (ver Anexo nº1).

Los explantes se desarrollaron en cámara de crecimiento o biotró. La cámara de crecimiento se mantuvo a 24 °C con humedad controlada y 2000 luxes de fotoperíodo con 16 h luz llegando ésta de forma perpendicular a los explantes. En el biotró la temperatura fue de 24 °C sin control de humedad y con fotoperíodo de 16 h luz llegando ésta desde todas direcciones.

Para la localización histoquímica de la actividad de la B-glucuronidasa en células y tejidos, uno de los mejores sustratos generalmente usados es X-Gluc. Este sustrato da buenos resultados, formando un precipitado azul en el sitio donde hay actividad enzimática (Jefferson, 1987). Como testigo para verificar la viabilidad de la solución con X-Gluc en los ensayos de transformación, se utilizó tejido foliar de *Solanum tuberosum* transformado con la misma bacteria y el mismo plásmido (LBA4404 + pBI121).

III.2 MÉTODOS

A los efectos de evaluar parámetros relevantes para la transformación genética de materiales locales de trébol rojo, se realizó una serie de 8 experimentos (ver Cuadro nº2) basados en protocolos descritos en la literatura, comunicaciones personales y otros desarrollados en este trabajo. Cada tratamiento se llevó a cabo con distintas variables que incluyeron:

- genotipo
- tipo de explante
- medio de cultivo
- método de esterilización
- lugar de cultivo

Estos experimentos se desarrollaron en módulos, donde cada uno corresponde a un ensayo de transformación y cinco de estos tratamientos tuvieron repeticiones, lo que da un total de catorce módulos (ver Cuadro nº2). Los módulos tuvieron un diseño común para todos los experimentos, usándose tratamientos iguales, controles positivos y controles negativos (ver Cuadro nº1).

Cuadro n°1: Diseño de un módulo tipo de transformación y número de explantes
LBA4404 + pBI121: *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con el
plásmido pBI121; LBA4404: *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404

	LBA4404 + pBI121	LBA4404	Control
Carbenicilina (300mg/l)	100	20	20
Kanamicina (60mg/l)			
Carbenicilina (300mg/l)	20	20	20

Por una parte se sembraron tres tubos con *A. tumefaciens* LBA4404 conteniendo el plásmido pBI121 que contenían 6 ml de medio líquido MGL cada uno (ver Anexo n°2), conteniendo 100 mg/l tanto de Rifampicina como de Streptomina y Kanamicina se cultivaron “over night” a 28 °C. Alicuotas de 6 ml se utilizaron para infestar los dos tratamientos correspondientes (ver Cuadro n°1). Simultáneamente se sembró en medio MGL con 100 mg/l de Rifampicina e igual cantidad de Streptomina y bajo las mismas condiciones *A. tumefaciens* LBA4404 pero sin el plásmido, con el fin de evaluar el efecto causado por LBA 4404 en el desarrollo de los explantes. También se cultivaron explantes sin haber sido infestados por LBA4404 (control positivo).

La función del agente bacteriostático Carbenicilina es inhibir el desarrollo de LBA4404 y la Kanamicina se usa como agente selectivo para que sólo se desarrollen en el medio aquellas plantas que contengan el gen de resistencia a este antibiótico contenido en el plásmido (pBI121).

Se usaron tres técnicas de transformación que tienen diferentes sistemas de regeneración de explantes, uno de Embriogénesis Somática (Quesenberry *et al.*, 1996) y los dos restantes de Organogénesis Directa (Larkin *et al.*, 1996 y Larkin *et al.*, 1996, modificado por Spangenberg, com. pers.).

En el protocolo de Embriogénesis Somática se usaron 25 clones provenientes de materiales seleccionados (ver III.1). Se trabajó con 100 explantes de cada clon, 50 explantes de peciolo y 50 explantes de foliolo.

Para los dos protocolos de Organogénesis Directa se usó como material vegetal semillas de trébol rojo de la variedad LE 116 (ver III.1). Como el trébol rojo es una especie alógama, cada semilla es un genotipo en particular.

Cuadro n°2: Experimentos y módulos desarrollados. En este cuadro se aprecian las diferencias entre experimentos y número de repeticiones que se le realizó a cada uno (módulos).

Experimento	Módulo	Medio de cultivo (*)	Tipo de explante	Método de esterilización	Lugar de cultivo
I	QTp1 QTf1	B5IC B5IE B5DE	Peciolos-Foliolos	Cultivo <i>in vitro</i>	Biotrón
II	QTp2 QTf2	B5IC B5IE B5DE	Peciolos-Foliolos	Cultivo <i>in vitro</i>	Cámara de crec.
III	LT1	B5PB RIB	Cotiledones	NaClO	Biotrón
	LT2	B5PB RIB	Cotiledones	NaClO	Biotrón
IV	LT3	B5PB+strep. RIB	Cotiledones	NaClO	Biotrón
	LT4	B5PB+strep. RIB	Cotiledones	NaClO	Biotrón
V	ST1	MSd+strep. MSe	Cotiledones	NaClO	Biotrón
	ST2	MSd+strep. MSe	Cotiledones	NaClO	Biotrón
VI	ST3	MSd MSe	Cotiledones	NaClO	Biotrón
	ST4	MSd MSe	Cotiledones	NaClO	Biotrón
VII	ST5	MSd MSe	Cotiledones	NaClO	Cámara de crec.
VIII	ST6	MSd MSe	Cotiledones	HgCl ₂	Cámara de crec.
	ST7	MSd MSe	Cotiledones	HgCl ₂	Cámara de crec.
	ST8	MSd MSe	Cotiledones	HgCl ₂	Cámara de crec.

QTp: módulo de transformación de Quesenberry *et al*, (1996), para peciolo.

QTf: módulo de transformación de Quesenberry *et al*, (1996), para folíolo.

LT: módulo de transformación de Larkin *et al*, (1996)

ST: módulo de transformación de Larkin *et al*, (1996), modificado por Spangenberg (com. pers.)

B5IC: medio de cultivo B5 para inducción de callo

B5IE: medio de cultivo B5 para inducción de embrión

B5DE: medio de cultivo B5 para desarrollo de embrión

B5PB: medio de cultivo B5 con picloram y BAP

RIB: medio de cultivo L2 con IBA

MSd: medio de cultivo MS de desarrollo

MSe: medio de cultivo MS de enraizamiento

Strep: Streptomycin

NaClO: hipoclorito de sodio

HgCl₂: bicloruro de mercurio

(*) Ver Anexo n°1

III.2.1 Embriogénesis Somática

Los trabajos de embriogénesis somática se realizaron a partir de peciolos y folíolos de plantas de trébol rojo siguiendo los protocolos descritos por Quesenberry y Smith (1993) y Quesenberry *et al*, (1996). Esta actividad se realizó en dos partes, la primera consistió en el análisis de la capacidad regenerativa de diferentes genotipos (clones) y la selección de aquel genotipo que mostró un mejor desempeño en la regeneración, medida a través de los porcentaje de formación de callo, organogénesis y formación de núcleos premeristemáticos. En la segunda parte se

realizaron experimentos de transformación usando como material vegetal el clon seleccionado.

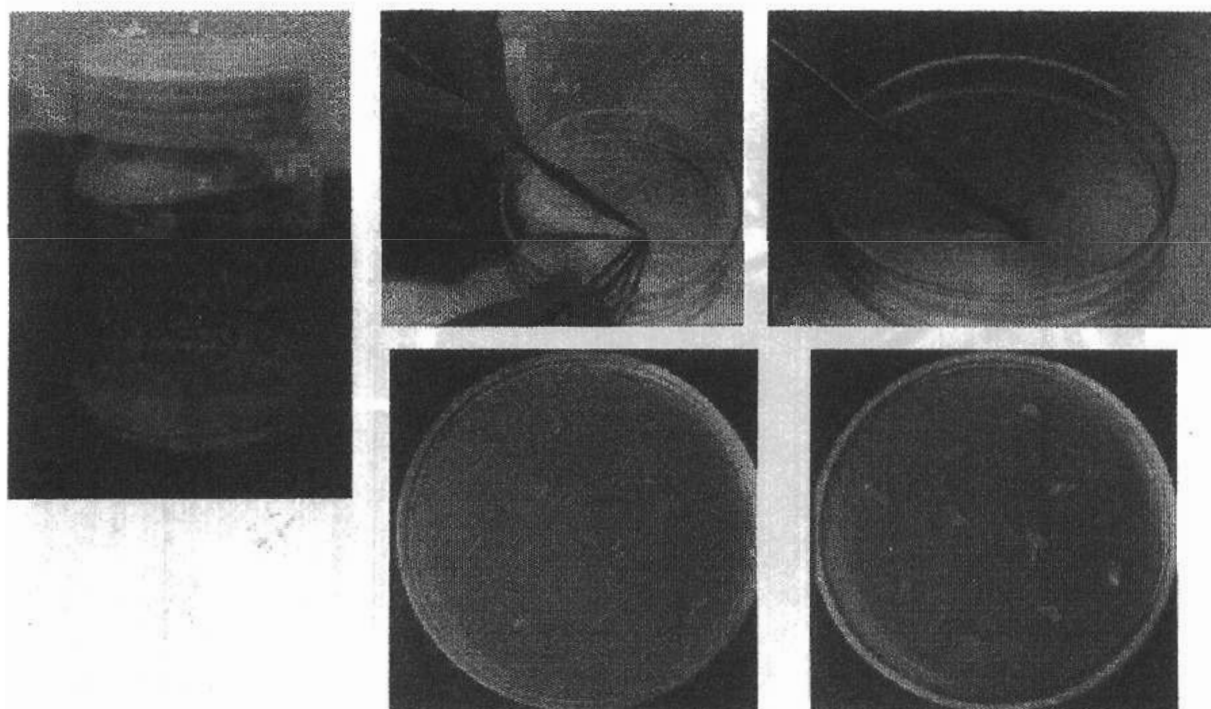
Como ya vimos se trabajó con 25 clones que se identificaron con un número y un subnúmero, el número indica materiales diferentes y el subnúmero indica diferentes meristemas del mismo material. Por ej: 91-1 y 91-2 se originan en dos meristemas distintos (el 1 y el 2) pertenecientes a un mismo clon (el 91).

III.2.1.1 Regeneración y selección

Los materiales provinieron del INIA La Estanzuela y se introdujeron *in vitro* por cultivo de meristemas en el INIA Las Brujas. Se utilizaron 25 clones de trébol rojo libres de virus. Los explantes utilizados fueron folíolos y pecíolos obtenidos directamente de las plantas *in vitro*. Se cortaron segmentos de pecíolo de aproximadamente 1 cm y los folíolos se dividieron al medio con cortes longitudinales por la nervadura central (ver Figura nº3). Se colocaron ambos explantes por separado en placas de Petri con medio de cultivo B5IC, para inducción de callo durante 4 semanas. Se dispusieron 10 explantes por placa separados equidistantemente. Luego de este período se cambian a medio B5IE de inducción de embriones por 4 semanas más y transcurrido este tiempo se volvieron a cambiar a medio de cultivo B5DE para desarrollo de embriones. Estos medios solo difirieron en las cantidades de hormonas utilizadas (auxinas: ANA y 2,4-D; citoquininas: kinetina y adenina), de manera de lograr el objetivo deseado en cada caso (ver Anexo nº1) (Quesenberry y Smith, 1993).

Los cultivos crecieron en cámara de crecimiento a 24 °C y 2000 luxes de fotoperíodo con 16 h luz, recibiendo la luz desde arriba.

Figura nº3: Pasos para la obtención de explantes de pecíolos y folíolos.



III.2.1.2 Transformación

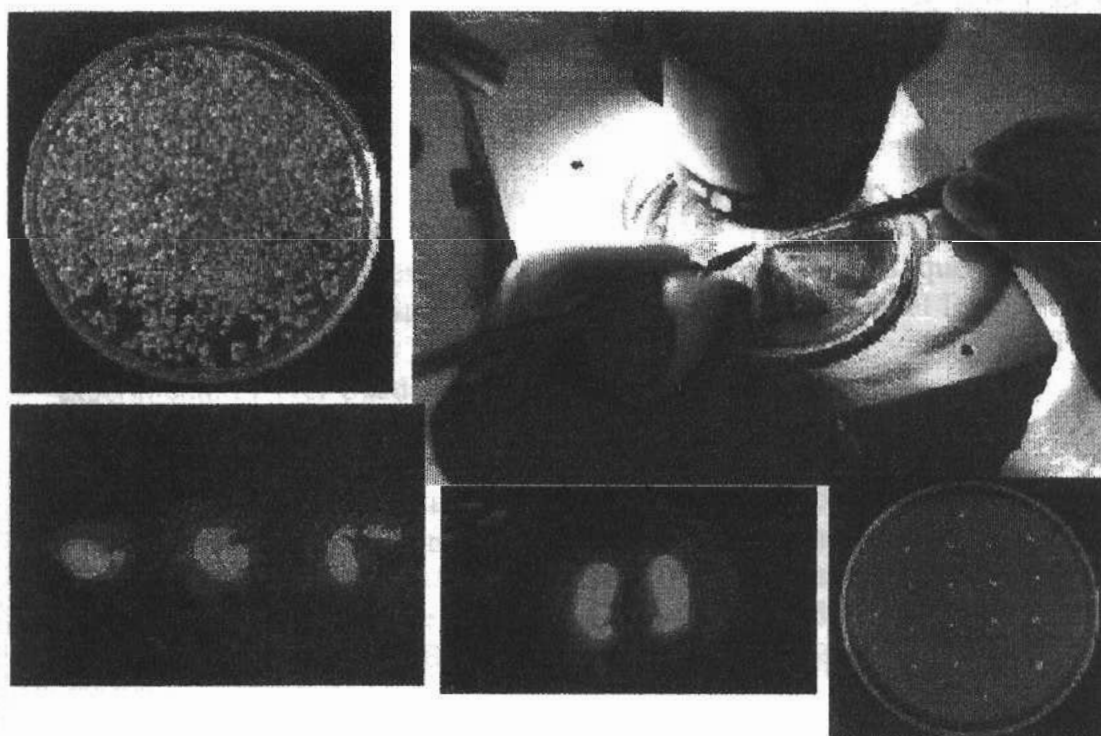
Para la transformación, los explantes fueron seccionados de igual manera que para la regeneración y selección. Se cocultivaron, con la bacteria obtenida de la siembra en MGL (ver III.2) durante 40 min en agitación. Luego se transfirieron para cocultivo en medio B5IC por 48 h, previo secado en papel de filtro estéril. Transcurrido este tiempo se cultivaron en medio B5IC según los tratamientos con antibióticos correspondientes (ver Cuadro n°1). Pasado un periodo de 4 semanas se realizó la reacción de X-Gluc a los callos formados. (Quesenberry *et al.*, 1996).

Con este protocolo se realizaron dos módulos diferentes. El módulo QT1 se colocó en biotrón, a 24 °C y fotoperiodo de 16 h luz, con luz proveniente de todas direcciones. No fue posible controlar la humedad dentro de esta cámara. En el módulo QT2 se colocó en la cámara de crecimiento, con luz que llegaba desde arriba al explante (ver Cuadro n°2).

III.2.2 Organogénesis Directa

Se usaron otros dos protocolos que se caracterizaron por promover la formación directa de órganos a partir de cotiledones preemergentes. Semillas comerciales de trébol rojo de la variedad LE 116 esterilizadas fueron embebidas en agua destilada estéril en oscuridad durante 17 h a temperatura ambiente. Estas semillas fueron disectadas bajo lupa estereoscópica para separar la testa y los cotiledones, éstos a su vez se separaron al medio obteniéndose dos explantes consistentes cada uno en un cotiledón, incluyendo una pequeña porción del hipocótilo (1,5 mm) (ver Figura n°4).

Figura n°4: Pasos para la obtención de explantes de cotiledones.



- Esterilización. Se utilizaron dos métodos diferentes de esterilización: uno con etanol e hipoclorito de sodio (NaClO) y el otro con etanol y bicloruro de mercurio (HgCl₂). En el primero se colocaron las semillas en una placa de Petri con etanol 70% durante 3 min, se retiró el etanol y se agregó NaClO 20% en solución de agua destilada con 3 gotas de Tween 20. Se agitó suavemente por 40 min, se retiró y se agregó nuevamente etanol por 3 min, luego se realizaron 6 enjuagues con agua destilada estéril durante 1 h (Larkin *et al.*, 1996). En el segundo método se usó etanol 70% por 3 min, se retiró el etanol y se colocaron 50 ml de una solución de HgCl₂ 0,2% y 5 ml de HCl/L. Se agitó durante 5 min, se retiró la solución y se realizaron 6 enjuagues con agua destilada estéril durante 1 h (Pagliano, 1985).

Debido a que se detectó una bacteria endógena en las semillas esterilizadas con etanol y NaClO, se procedió a su aislamiento y se realizó un antibiograma. Éste consistió en la siembra de la bacteria en una placa de Petri con medio MG (ver Anexo nº1). Se colocaron trozos de papel de filtro previamente esterilizados y saturados con 50 mg/l de Streptomicina ó 10 mg/l de Spectinomicina ó 20 mg/l de Ampicilina, debidamente identificados, sobre el medio de cultivo sembrado. La presencia de una bacteria endógena en trébol rojo ha sido comunicada por varios autores (Ana Peralta, com. pers.).

No se realizó una curva de calibración de los explantes de trébol rojo a Streptomicina, por lo que no se pudo determinar el impacto que pudo haber tenido en el posterior desarrollo de los explantes la inclusión de Streptomicina en el medio de cultivo.

- Calibración de la concentración de Kanamicina. Con el fin de estimar aquella concentración de Kanamicina a la cual se inhibe el crecimiento y desarrollo de los cotiledones de trébol rojo, se realizó una calibración de Kanamicina. Se colocaron los cotiledones en placas de Petri con medio de cultivo B5PB conteniendo cantidades crecientes de este antibiótico: 0, 20, 40, 60,80 y 100 mg/l. Se cultivaron 20 cotiledones por placa distribuidos equidistantemente y se mantuvieron en cámara de crecimiento a 24 °C y con 16 h de luz.

III.2.2.1 Protocolo de transformación de Larkin *et al.*, (1996).

Para este protocolo se realizaron dos experimentos que difirieron en la presencia o ausencia de Streptomicina en el medio de cultivo, el III y el IV, con dos módulos cada uno: LT1 y LT2 para el experimento III y LT3 y LT4 para el experimento IV (ver Cuadro nº2).

Los cotiledones y las bacterias con y sin plásmido en la etapa óptima de crecimiento, se colocaron juntos en una placa de Petri conteniendo medio MGL y se agitaron suavemente durante 40 min, con el fin de aumentar el contacto explante-bacteria. Luego de estos 40 min se secaron los explantes en papel de filtro estéril para retirar el remanente de medio y se colocaron equidistantemente 20 cotiledones por placa, en medio B5PB. Se dejaron cocultivar durante 72 h a 24 °C y luz

permanente, para que se realizara la infección por parte de *Agrobacterium*. Luego de estos tres días los cotiledones fueron colectados y lavados con agua estéril, secados en papel de filtro estéril y colocados en medio B5PB conteniendo 300 mg/l de Carbenicilina y sin o con Kanamicina 60 mg/l según cada tratamiento (ver Cuadro n°1). En el experimento IV, módulos LT3 y LT4, se incluyó en el medio B5PB el antibiótico Streptomycin 50 mg/l (ver Cuadro n°2).

Según estudios realizados en el laboratorio de biotecnología del INIA Las Brujas por Bonnacarrere y Mazzolla (com. pers.), la concentración óptima de Carbenicilina para inhibir el crecimiento de LBA4404 con y sin plásmido es 300 mg/l. No se realizó curva de calibración de Carbenicilina para cotiledones de LE 116. Para Kanamicina se usaron 60 mg/l, dato que se obtuvo como resultado de la curva de calibración de Kanamicina previamente descrita.

Los explantes permanecieron en medio de cultivo B5PB por 3 semanas, luego de las cuales se repicaron los cotiledones con pequeños tallos verdes al mismo medio y tratamiento con Kanamicina del cual provenían, permaneciendo allí por 3 semanas más. Luego de este período los tallos verdes se transfirieron separados del explante original a un medio de enraizamiento (RIB) por 3 semanas (ver Anexo n°1). Al concluir este tiempo se realizó la confirmación de la transformación a través de la reacción de X-Gluc.

III.2.2.2 Protocolo de transformación de Larkin *et al.*, (1996), modificado por Spangenberg (com. pers.)

Este protocolo se basó en el anterior, pero se le modificaron las variables: medio de cultivo, método de esterilización y lugar de crecimiento. El material vegetal, la forma de obtención de los explantes, el cultivo de la bacteria con y sin plásmido y la técnica de transformación fueron los mismos que en el protocolo anterior. Para esto se realizaron cuatro experimentos V, VI, VII y VIII en ocho módulos (ST1, ST2, ST3, ST4, ST5, ST6, ST7, ST8) (ver Cuadro n°2).

Como medio de cultivo se usó MSd y MSe (Murashige y Skoog, 1962, citado por George *et al.*, 1987 modificado por Spangenberg, com pers.) para desarrollo y enraizamiento respectivamente (ver Anexo n°1). Los dos métodos de esterilización usados fueron el NaClO y HgCl₂, previo tratamiento con etanol como se describe en III.2.2-Esterilización. Los explantes crecieron en el biotróo o en la cámara de crecimiento descritos en III.1.

El experimento V, constituido por los módulos ST1 y ST2, se desarrolló en MSd con 50 mg/l de Streptomycin y posteriormente en MSe, en el biotróo y el material vegetal fue esterilizado con etanol seguido de NaClO. El experimento VI, módulos ST3 y ST4, se desarrolló en medio de cultivo MSd y MSe, en biotróo. El material vegetal fue esterilizado con etanol seguido de NaClO. El experimento VII, módulo ST5, se desarrolló en medio de cultivo MSd y MSe, en cámara de crecimiento y fue esterilizado con NaClO. Por último el experimento VIII, módulo

ST6, ST7 y ST8, se desarrolló en medio de cultivo MSd y MSe, en cámara de crecimiento y fue esterilizado con HgCl_2 (ver Cuadro nº2).

Una vez que se obtuvieron las plántulas de trébol rojo, regeneradas a partir de los explantes que fueron infectados con LBA4404 + pBI121 y que lograron desarrollarse en medio conteniendo Kanamicina, se les realizó la reacción de X-Gluc.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

IV.1 EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

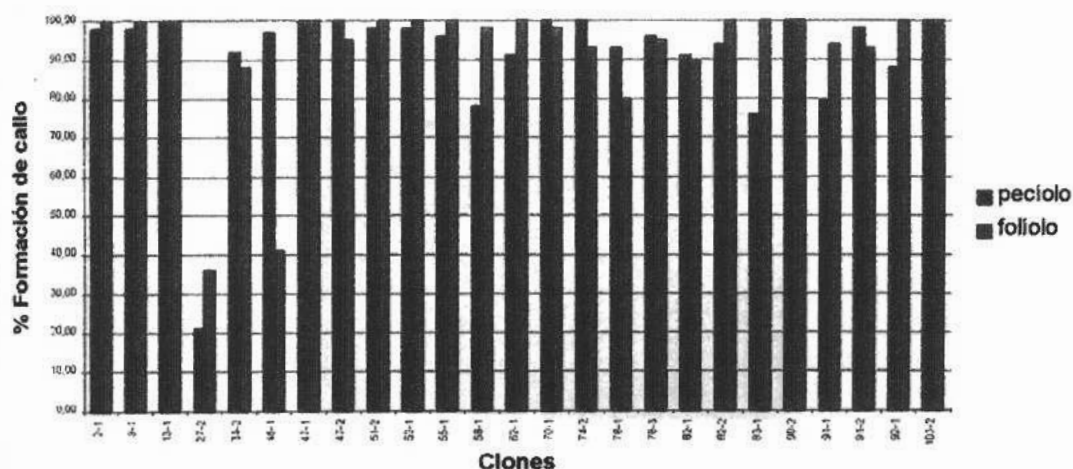
IV.1.1 Regeneración

IV.1.1.1 Formación de callo

Se trabajó con 25 clones provenientes de materiales seleccionados por el INIA La Estanzuela introducidos *in vitro* en el laboratorio de Biotecnología del INIA Las Brujas. Estos clones eran los únicos que se encontraban disponibles libres de virus.

El 100% de los clones analizados formó callo, tanto para los explantes de peciolo como para folíolos. Sin embargo se vieron diferencias en la cantidad de explantes por clon que formaron callo, la velocidad de formación y volumen de callo formado. La media de formación de callo en los clones para peciolo fue de 91,63 % y para folíolo de 92,35 % (ver Figura n°5).

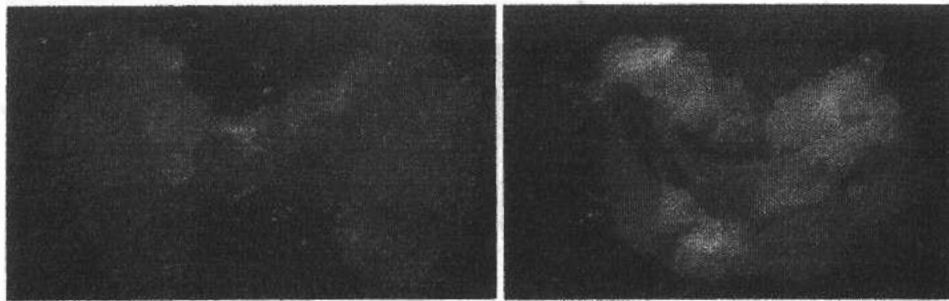
Figura n°5: Porcentaje de formación de callo para los 25 clones tanto en peciolo (barras azules) como folíolo (barras rojas). (Ver Anexo n°3)



Se observó que la formación de callos comenzaba en zonas de heridas, aumentando hacia el centro del explante hasta cubrirlo totalmente al cabo de 4 semanas.

Se presentaron dos formas de callo, uno de forma más definida con límites bien marcados de color crema y consistente; el otro de color blanco, con células hialinas y dispersas. Estos tipos de callos se encontraron en un mismo explante simultáneamente o bien se presentó uno o el otro tipo, no existiendo diferencias entre folíolos y peciolo. Posteriormente no se observaron diferencias en su evolución. (ver Figura n°6).

Figura n°6: Formación de callo en pecíolo y folíolo.



IV.1.1.2 Morfogénesis

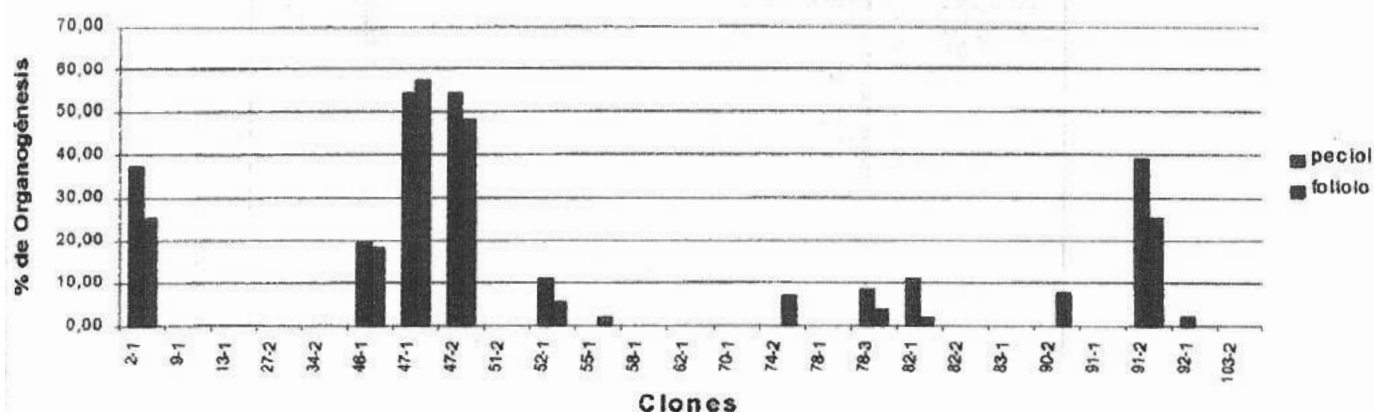
Para el caso de morfogénesis se observó que desde dentro del callo emergían estructuras de tejido consistente, de forma definida semejantes a raíces y de color crema, encontrándose varias por callo (ver Figura n°7). Estas estructuras no evolucionaron por lo que no fue posible regenerar plantas enteras bajo estas condiciones. Sería posible obtener plantas a partir de estas estructuras en condiciones diferentes a las aquí descritas, otros medios de cultivo y tipo y concentración de reguladores del crecimiento.

Figura n°7: Ejemplo de morfogénesis generada a partir de explantes de pecíolos y folíolos.



Se observó que el 48% de los clones presentó morfogénesis. El 32% de éstos presentó morfogénesis a partir de ambos tipos de explantes, mientras que el 12% lo hizo sólo a partir de folíolos y el 4% sólo a partir de pecíolos. De los clones que presentaron morfogénesis en pecíolos y folíolos, se observó mayor porcentaje de morfogénesis en los explantes de pecíolo (ver Figura n°8).

Figura n°8: Porcentaje de morfogénesis para los 25 clones: pecíolo (azul) y foliolo (rojo). Se muestra la morfogénesis para dos tipos de explantes (pecíolos y folíolos) en los 25 clones estudiados. (Ver Anexo n°3).



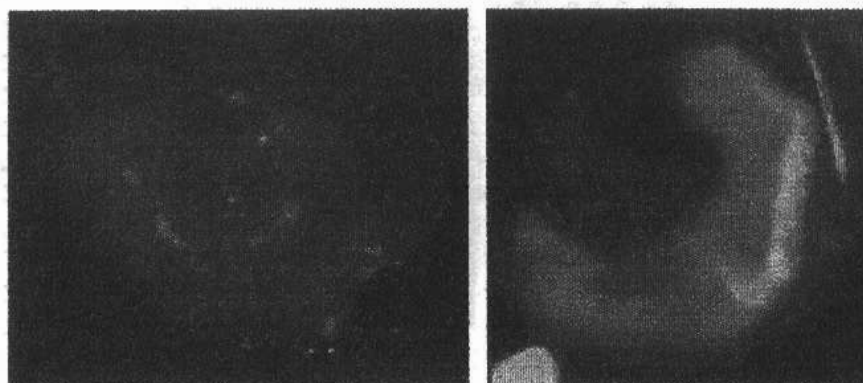
Las diferencias en el comportamiento se deben a que son distintos genotipos. Aquellos que correspondían al mismo clon y que provenían de meristemas diferentes, en general mostraron desempeños similares, como se esperaba por pertenecer al mismo genotipo. Este fue el caso de los clones 47-1, 47-2 y 82-1, 82-2, mientras que entre los clones 91-1 y 91-2 se observaron variaciones notorias. Cabe destacar que previo a trabajar con el clon 91-1, se detectaron dificultades en el desarrollo *in vitro* del mismo, presentando problemas en la regeneración a partir del meristema y lentitud en el crecimiento.

Es importante señalar que no se esperaba la aparición de estas estructuras debido a que no fueron descritas en el protocolo desarrollado (Quesenberry *et al.*, 1993), lo que supone la degeneración de las raíces por no estar en un medio adecuado para su desarrollo.

IV.1.1.3 Formación de núcleos organogénéticos

Se observó dentro de algunos callos la formación de estructuras circulares pequeñas de color verde, que se visualizaron a simple vista. Observando al microscopio se detectó una masa de células verdes con límite bien definido con forma globular y de torpedo, por lo que se supuso en una primera instancia que eran embriones somáticos (ver Figura n°9). Realizando un seguimiento de estos núcleos se observó que evolucionaron a raíces, determinado esto por la morfología y hábito de crecimiento en el medio de cultivo. Parrot (com. pers.), en un trabajo similar realizado en el Departamento de Ciencias de Cultivos y Suelos de la Universidad de Georgia, EE.UU., observó el mismo tipo de estructura.

Figura n°9: Ejemplo de núcleos organogenéticos en callo y bajo lupa estereoscópica.



Debido a la variabilidad obtenida tanto en la presencia-ausencia como en el número de núcleos organogenéticos formados en cada callo, se realizó una escala, que aparece abajo, para el mejor análisis de los resultados.

NÚMERO DE NÚCLEOS ORGANOGÉNÉTICOS	CLASE
Sin núcleos organogenéticos	I
1-5 núcleos organogenéticos	II
6-10 núcleos organogenéticos	III
>10 núcleos organogenéticos	IV

El 72 % de los clones presentó estas estructuras considerando ambos tipos de explantes. El 96% de estos clones desarrolló núcleos organogenéticos en los dos tipos de explantes. Se observaron diferencias en la formación de estos núcleos según el tipo de explante utilizado, siendo los folíolos los que presentaron mayor proporción de clases altas, sin ser esta diferencia significativa, ya que en general se dio la misma tendencia para ambos tipos de explantes en cada material (ver Figura n°10 y n°11).

Figura n°10: Porcentaje de formación de núcleos organogenéticos en PECÍOLOS
(Ver Anexo n°3)

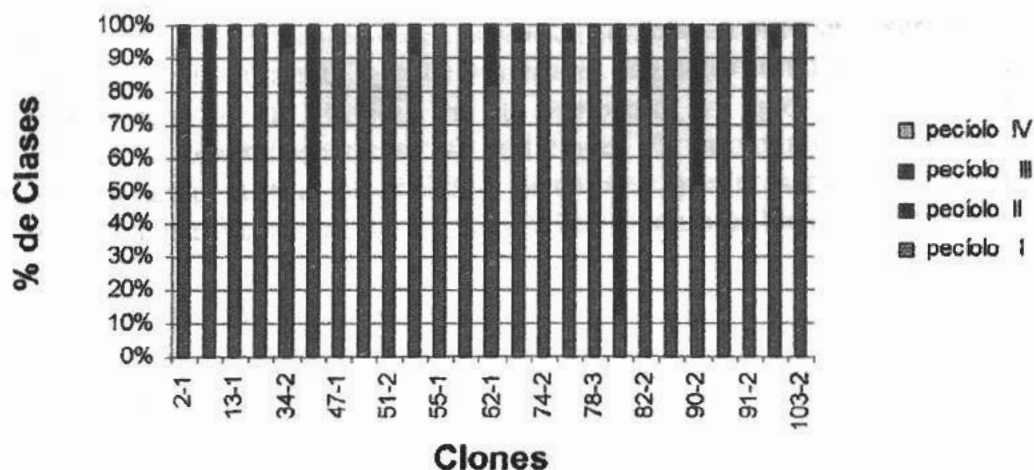
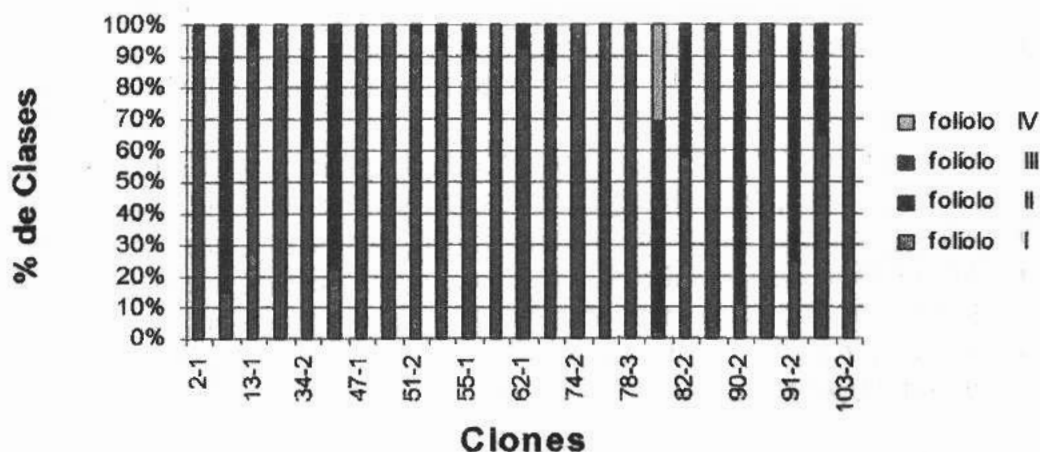


Figura N°11: Porcentaje de formación de núcleos organogenéticos en FOLIÓLOS
(Ver Anexo n°3)



No se vieron diferencias entre los clones 47-1, 47-2, lo que se esperaba por presentar igual genotipo, debido a que ninguno formó este tipo de estructuras. Es importante hacer notar las diferencias en el desempeño que presentó este genotipo en formar distintas estructuras, mostró buena capacidad morfogenética (ver IV.1.1.2) mientras que para formación de núcleos organogenéticos su capacidad fue nula. Los clones 78-1, 78-3, 82-1 y 82-2 presentaron diferencias pero la tendencia se mantuvo (ver Figura n°10 y n°11). Nuevamente, como ocurrió en morfogénesis, se vio que los clones 91-1, 91-2 presentaron grandes diferencias en su comportamiento, por lo que se pensó que el problema era del material original, es decir del meristema a partir del cual se obtuvieron esas plantas *in vitro*.

Con respecto a la regeneración y obtención de plantas enteras, se vio que pudo existir un efecto de los genotipos utilizados que no pudieron regenerar bajo estas condiciones, debido a que se aplicó la técnica como se describe en el protocolo. Se debe tener en cuenta que los materiales vegetales son distintos a los utilizados por Quesenberry *et al.*, (1996) en su protocolo, ya que se trabajó con materiales nacionales adaptados a nuestras condiciones. El bajo número de genotipos utilizados, considerando la alta variabilidad genotípica que presenta esta especie, fue bajo, debido a que fueron los únicos materiales disponibles libres de virus.

IV.1.2 Selección

Para los casos de morfogénesis y núcleos organogenéticos las respuestas fueron diferentes para los distintos genotipos, mientras que para formación de callo esta dependencia no se observó ya que todos los genotipos produjeron callo (ver Anexo nº3).

Según la literatura, algunas de las características o aspectos que se pueden observar en cultivo de tejidos *in vitro* son altamente heredables, como son formación de callo, producción de clorofila, iniciación de raíz y embriogénesis. Esto indica que el mejoramiento de la frecuencia de formación de callo puede ser efectiva mediante la selección directa, debido a la importancia de la varianza genética aditiva para estas características (Keyes *et al.*, 1980).

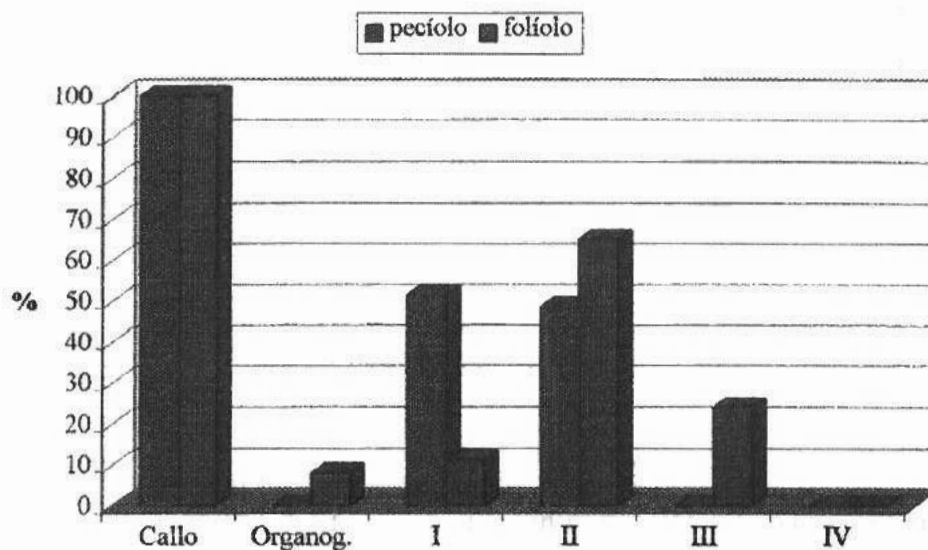
En base a los resultados obtenidos en IV.1.1 se realizó la selección de aquel clon que presentó características morfogénicas superiores para las tres variables consideradas: porcentaje de formación de callo, porcentaje de morfogénesis y porcentaje de núcleos organogenéticos. Por los datos recabados se concluyó que la variable más importante para la etapa de regeneración es el porcentaje de formación de callo, ya que éste es el punto de partida de los dos patrones de crecimiento restantes. Sólo a partir de un callo formado fue posible llegar a obtener morfogénesis y núcleos organogenéticos.

El clon 90-2 se destacó en que el 100% de los 100 explantes (50 de pecíolo y 50 de foliolo) formaron callo y por otra parte correspondía a las clases altas (II y III) de formación de núcleos organogenéticos (ver Figura nº12). Éstos presentaron clorofila siendo esto de gran importancia ya que los hace autótrofos y no dependientes del medio. Por estas razones se eligió para transformar el clon 90-2 por presentar mejor desempeño en la regeneración en general.

Se seleccionó sólo un clon debido a que el objetivo era analizar la técnica de transformación y obtener un callo transformado, puesto que ya se había visto que no era posible regenerar plantas enteras. Este clon fue seleccionado de un grupo de cinco clones superiores, 9-1, 46-1, 82-1, 90-2 y 91-2, para las tres características analizadas. Si bien los restantes clones presentaron buen desempeño, ninguno formó callo en el 100% de sus explantes tanto para pecíolo como para foliolo. Además de las tres características aquí evaluadas se tuvieron en cuenta para la selección, el

volumen de callo generado y la velocidad de crecimiento del callo, características que no fueron cuantificadas.

Figura n°12: Clon 90-2. Porcentaje de formación de callo, porcentaje de organogénesis y clases de formación de núcleos organogenéticos en porcentaje (I a IV), para pecíolo (azul) y folíolo (rojo) (ver IV.1.1.3). En este diagrama se aprecia el desempeño del clon 90-2 en las tres características morfogénicas analizadas. (Ver Anexo n°3).

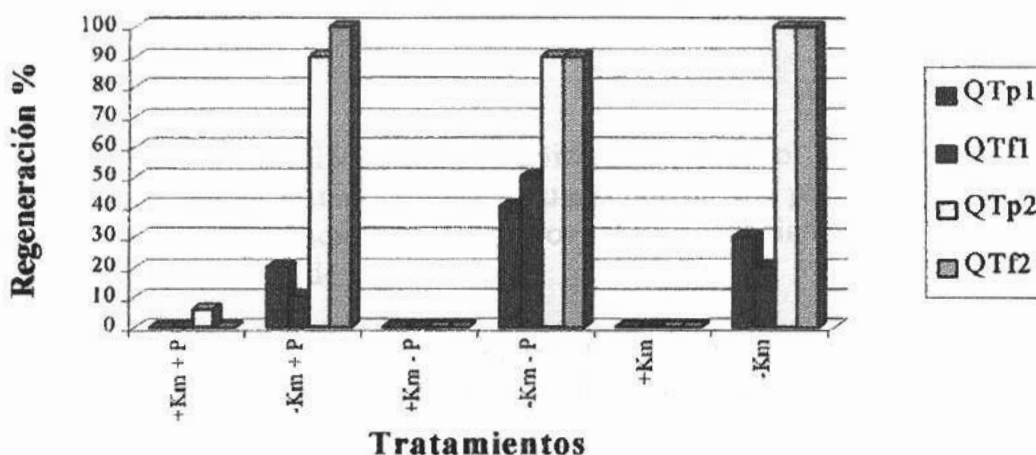


IV.1.3 Transformación

Se realizó la transformación al clon seleccionado 90-2, con la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 con el plásmido pBI121, siguiendo los tratamientos de un módulo tipo de transformación (ver Cuadro n°1).

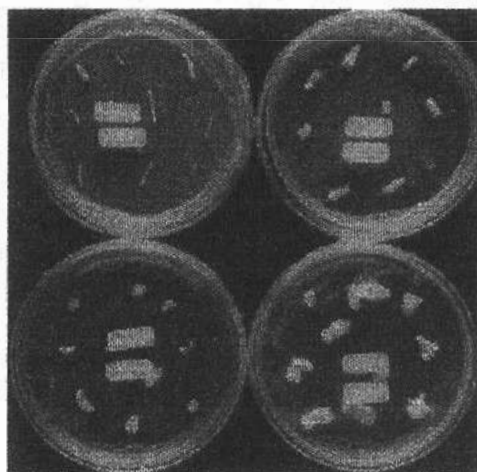
Se descartó la existencia de fallas en el protocolo de regeneración puesto que los controles dieron el porcentaje esperado, 100% de regeneración de los explantes de pecíolo y folíolo (ver Figura n°14). Se observó 100% de regeneración para ambos explantes en el módulo QT2 (QTp2 y QTf2). En el módulo QT1 no se obtuvieron los resultados esperados (30% de regeneración en pecíolo y 20% de regeneración en folíolo, en el control), (ver Figura n°13) por suponer la existencia de problemas con la iluminación y humedad en el lugar de crecimiento durante todo el periodo de desarrollo de los explantes, puesto que éste se llevó a cabo en el biotró. Ésta fue la única variable (lugar de cultivo) en que se diferenciaron los experimentos I y II, módulos QT1 y QT2 respectivamente (ver Cuadro n°2). Los controles positivos del módulo QT2 desarrollados en cámara de crecimiento regeneraron según lo esperado con los resultados arrojados en esta tesis.

Figura n°13: Porcentajes de regeneración en la transformación de explantes de peciolo y foliolo. En este diagrama se muestran los porcentajes de regeneración de cada módulo (QTp1, QTf1, QTp2, QTf2), según los tratamientos. Km: Kanamicina; P: *A. tumefaciens* LBA4404, +/- pBI121. (Ver Anexo n°4).



Se realizó la reacción histológica del clon 90-2 de la enzima B-glucuronidasa con el sustrato X-Gluc, en los explantes que fueron expuestos a la bacteria LBA4404 + pBI121 y que se desarrollaron en medio con y sin Kanamicina, para comprobar la inserción del gen Gus o al menos detectar el sitio donde ocurre la actividad enzimática. No se observó reacción positiva en los callos formados. La regeneración de los explantes en medio B5IC con Kanamicina y tratados con la bacteria y el plásmido fue nula, a excepción del tratamiento QTp2 en que hubo un 5% de regeneración (ver Figura n°13), con volúmenes de callo muy inferiores a los observados en los controles y que se necrosaron rápidamente.

Figura n°14: Tratamientos de transformación según Quesenberry *et al.*, (1996)



El no haber logrado un evento de transformación con este método pudo deberse a la afinidad bacteria-planta, característica que se puede mejorar con la inclusión en el medio de cultivo de ciertas sustancias como Acetosiringona. (Tcacenco, 1996) y también a la cepa de *Agrobacterium* utilizada.

IV.2 PROTOCOLO ORGANOGÉNESIS DIRECTA

IV.2.1 Esterilización

Las primeras esterilizaciones se realizaron con etanol y NaClO y se pudo observar que no era un método eficiente, puesto que un alto porcentaje de explantes presentó contaminación bacteriana. Esto provocó la contaminación de toda la placa afectando la regeneración de los explantes.

Como estrategias para combatir la bacteria endógena presente en trébol rojo, se optó por el uso de antibióticos y la sustitución del método de esterilización con NaClO por HgCl₂.

Se realizó un antibiograma y se observaron colonias aisladas de 1 a 2 mm entre sí, de color ocre, borde nítido, translúcido con centro opaco. Se vio un halo de inhibición muy fuerte (0.8-1 cm) en torno al trozo de papel que contenía Streptomycin; en Spectinomycin el halo de inhibición fue menor (0.2-0.3 cm) y con Ampicilina no hubo inhibición.

De esto se dedujo que la bacteria es muy sensible a Streptomycin, medianamente resistente a Spectinomycin y resistente a Ampicilina.

Como consecuencia de lo anterior se decidió la incorporación de 50 mg/l de Streptomycin en algunos medios de cultivo (ver Cuadro n°2). Realizando un seguimiento de los explantes cultivados en medio conteniendo Streptomycin y sin este antibiótico se observó una tendencia a enlentecer el desarrollo de los explantes.

Con respecto a la segunda estrategia de esterilización, se observó que el HgCl₂ es eficiente y no afecta la regeneración de los explantes. Por esto se decidió que este método era el más indicado para los trabajos posteriores con este tipo de explante (ver Cuadro n°3).

Por otra parte también se observaron diferencias en el desarrollo de la bacteria en cuanto al medio de cultivo utilizado (ver Cuadro n°3). Se vio que la bacteria se desarrollaba mejor en medio de cultivo MG, lo cual era predecible ya que es un medio utilizado para el cultivo de bacterias (ver Anexo n°2).

Cuadro nº3: Porcentajes de explantes no contaminados luego de los métodos de esterilización. En este cuadro se pueden comparar las diferencias en el desarrollo de la bacteria endógena según el método de esterilización (NaClO y HgCl₂) y el medio de cultivo (MG y MSd) utilizados.

Medio de Cultivo	NaClO	HgCl ₂
MG	15%	100%
MSd	35%	100%

MG: medio de cultivo MG

MSd: medio de cultivo MS para desarrollo

NaClO: hipoclorito de sodio

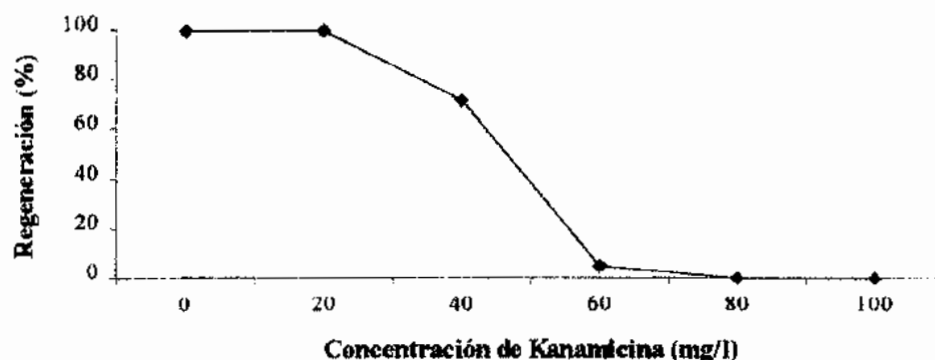
HgCl₂: bicloruro de mercurio

IV.2.2 Calibración de Kanamicina

Se realizó una curva de calibración de Kanamicina con el fin de poder evaluar el efecto que causan dosis crecientes de este antibiótico sobre el desarrollo de los cotiledones de trébol rojo y usarlo como agente selectivo en los tratamientos de transformación.

Se vio que para una concentración de hasta 20 mg/l de Kanamicina la regeneración de los cotiledones no fue afectada. A partir de esta concentración la regeneración comienza a decaer, produciéndose el mayor descenso entre los 40 y 60 mg/l de Kanamicina. Para la concentración de 60 mg/l de Kanamicina se observó una alta presión de selección (el 95% de los explantes no creció) y con concentraciones mayores a 80 mg/l no hubo desarrollo de los cotiledones. (ver Figura nº15).

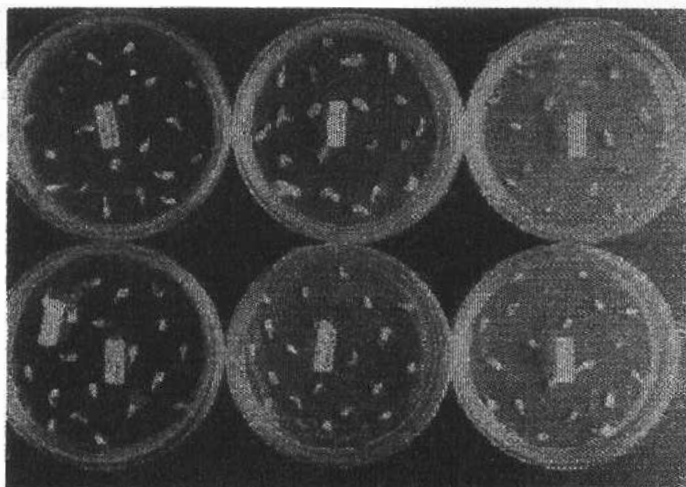
Figura nº15: Porcentaje de regeneración de cotiledones en condiciones crecientes de Kanamicina.



Se decidió trabajar con una proporción de escape del 5%, es decir la observada al incluir en el medio de cultivo 60 mg/l de Kanamicina, de forma de no

afectar severamente el crecimiento de las células transformadas y que su desarrollo no se viera afectado por encontrarse dentro de una masa de células muertas (ver Figura nº16).

Figura nº16: Calibración de Kanamicina



IV.2.3 Protocolo de Larkin *et al.*, 1996

El protocolo fue diseñado para *Trifolium repens*, trébol blanco y en este trabajo se adaptó para trébol rojo, con algunas variaciones como el método de esterilización con HgCl_2 , la cepa de la bacteria usada y el plásmido (LBA4404 + pBI121). El protocolo abarcó los experimentos III y IV, que comprenden los módulos LT1 y LT2, y LT3 y LT4 respectivamente (ver Cuadro nº2). Como material vegetal se usaron cotiledones de semilla comercial de la variedad LE 116.

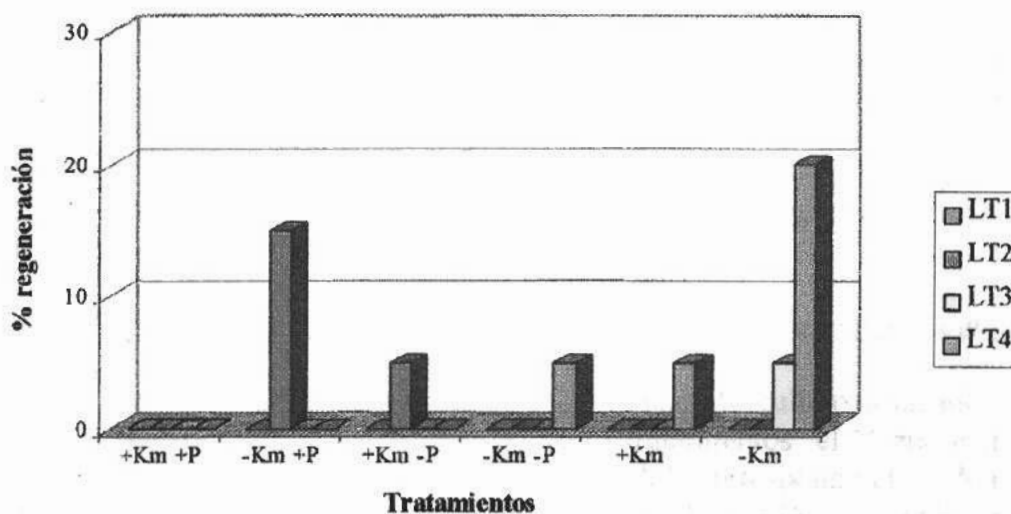
Entre los experimentos III (módulos LT1 y LT2) y IV (módulos LT3 y LT4), se observaron diferencias en la regeneración de los cotiledones, siendo mayor la regeneración observada en el experimento IV, (ver Figura nº17). Es posible que esta variación se deba a la presencia de Streptomycin en el medio de cultivo del experimento IV (ver Cuadro nº2), que inhibe el desarrollo de la bacteria endógena, responsable de la mala regeneración de los cotiledones.

En los módulos LT1 y LT2 se observaron problemas en la regeneración (ver Figura nº17) debido principalmente a que el método de esterilización utilizado (NaClO) no fue efectivo en el control de la contaminación (bacteria endógena) y a las condiciones ambientales dadas en el biotró. Esto no solo ocurrió en los tratamientos III y IV sino que para los tratamientos I, V y VI (pertenecientes a otros protocolos), que también fueron colocados en el biotró (ver Cuadro nº2), los explantes quedaron albinos, evidenciando un problema en la calidad de la luz que provenía de todas direcciones. En el módulo LT2 se observó una regeneración del 15% en explantes tratados con LBA 4404 + pBI121 pero desarrollados en medio no

selectivo (sin Kanamicina). A estas plántulas se les realizó la reacción de X-Gluc la cual dio negativa, por esto se descartó la posibilidad de estar frente a algún evento de transformación. También se constató la presencia de escapes, dentro de los valores previstos (5%) (ver Figura n°17)

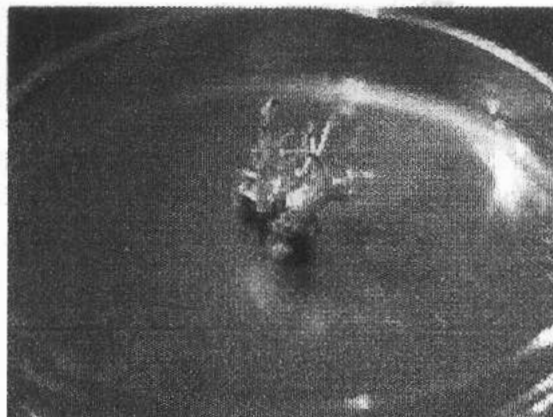
En los módulos LT3 y LT4 (experimento IV), con la inclusión de Streptomicina en el medio de cultivo, se logró bajar los niveles de contaminación pero también se vio que el desarrollo de los cotiledones era menor. Es posible que el bajo número de plantas regeneradas para este experimento se deba a la inclusión de Streptomicina. En este experimento se detectaron escapes, lo que era previsible, debido a la concentración utilizada de Kanamicina, 60 mg/l (ver Figura n°17).

Figura n°17: Porcentaje de regeneración en módulos del protocolo de Larkin *et al.*, (1996). En esta representación se observan los porcentajes de regeneración de cada módulo (LT1, LT2, LT3 y LT4) según cada tratamiento. Km: kanamicina; P: *A. tumefaciens* LBA4404, +/- pBI121. (Ver Anexo n°4).



Con este protocolo fue posible completar un ciclo de regeneración para trébol rojo, a pesar de que el protocolo original fue diseñado para trébol blanco (ver Figura n°18). El bajo porcentaje de regeneración obtenido puede deberse a las condiciones particulares en que este protocolo fue desarrollado: método de esterilización con NaClO, Streptomicina en el medio de cultivo y crecimiento de los explantes en el biotró.

Figura n°18: Regeneración a partir de un explante de cotiledón siguiendo el protocolo de Larkin *et al.*, (1996).



El no haber podido obtener un evento transgénico puede deberse en parte a los inconvenientes anteriormente mencionados y en parte a fallas en las condiciones de transformación, o ambas a la vez. Esto último pudo haberse debido a que el crecimiento de la bacteria no fue el óptimo, por lo que es posible que ésta no estuviera en las concentraciones adecuadas en el medio de cultivo como para realizar una infección efectiva. Por otra parte el número de cotiledones expuestos a la infección (120 cotiledones por módulo) fue escaso, ya que los materiales ensayados (controles positivos) mostraron una baja frecuencia de regeneración, 18% en el mejor de los casos. Sin embargo pudieron identificarse algunos cotiledones con una capacidad de regeneración importante, hecho relacionado seguramente con la gran variabilidad genotípica existente dentro de esta especie.

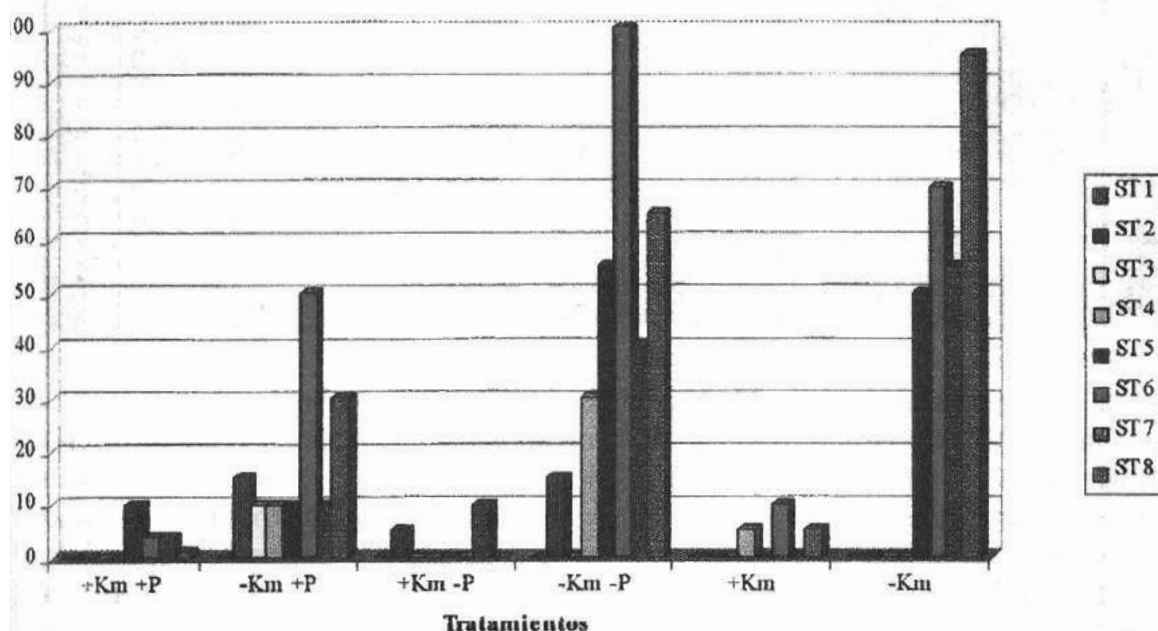
IV.2.4 Protocolo de Larkin *et al.*, (1996), modificado por Spangenberg (com. pers.)

Este protocolo difiere del anterior en el medio de cultivo utilizado (MSd y MSe). Para llevarlo a cabo se realizaron cuatro tratamientos: el V que incluye los módulos ST1 y ST2, el VI incluye ST3 y ST4, el VII corresponde al módulo ST5 y por último el tratamiento VIII con los módulos ST6, ST7 y ST8 (ver Cuadro n°2).

En este protocolo, en general, se observó una mejor performance de los cotiledones que en el protocolo anterior y se llegó hasta la etapa de adaptación en invernáculo (ver Figura n°20). Los primeros módulos (ST1 y ST2) presentaron bajos porcentajes de regeneración, debido a que fueron expuestos a las mismas condiciones descritas para el protocolo anterior (crecimiento en biotróp, esterilización con NaClO y medio de cultivo con Streptomycin). A los explantes del módulo ST2 regenerados en el tratamiento con LBA4404 + pBI121, desarrollados en medio no selectivo, se les colocó en solución X-Gluc y no se percibió coloración azul, por lo que se descartó que estuvieran transformados (ver Figura n°19). Para este módulo se apreciaron escapes, debido a la concentración de Kanamicina utilizada en el medio de cultivo (60 mg/l), la cual ejerció un 95% de presión de selección (ver Figura n°15). Es

importante destacar que no hubo ningún tipo de regeneración en los controles positivos, lo cual llevó a pensar que otras variables estuvieron afectando negativamente el desarrollo, como Streptomicina en el medio de cultivo, esterilización con NaClO y crecimiento en el biotró.

Figura n°19: Porcentajes de regeneración de distintos módulos usando el protocolo de Larkin *et al.*, (1996), modificado por Spangenberg (com. pers.). En esta representación se muestran los porcentajes de regeneración de cada módulo (ST1-ST8) según cada tratamiento. Km: Kanamicina; P: *A. tumefaciens* LBA4404, +/- pBI121. (Ver Anexo n°4)

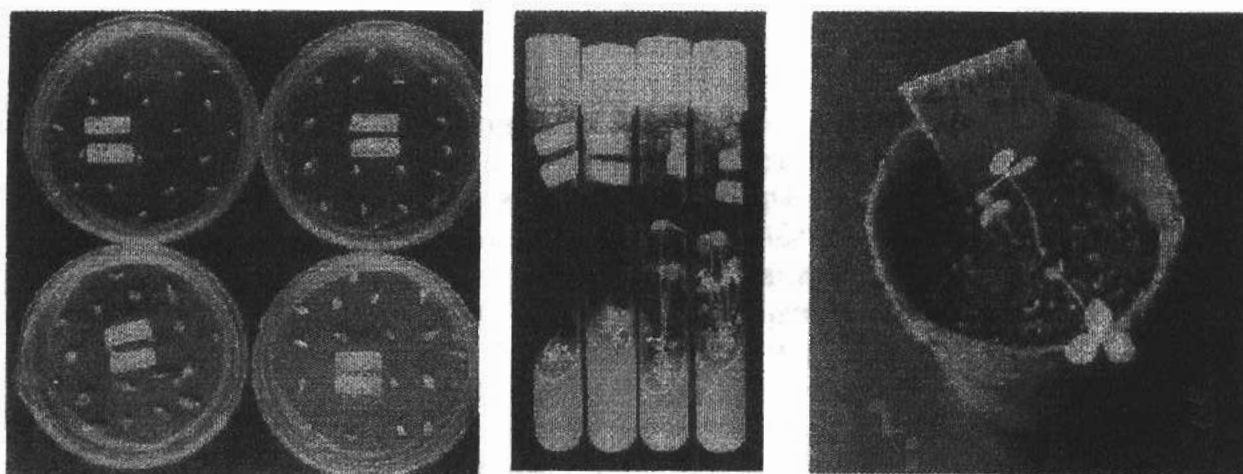


En el experimento VI (módulos ST3 y ST4) se decidió no incluir Streptomicina en los medios, lo que llevó a un pequeño aumento en la regeneración de los cotiledones. Se realizó la reacción histológica de X-Gluc a los cotiledones del tratamiento con LBA4404 + pBI121 en medio no selectivo, no presentándose dicha reacción. Se volvió a observar escapes siempre dentro de los rangos esperados y nuevamente los controles positivos no se desarrollaron. No se obtuvo ninguna planta transformada pero sí se logró regenerar plantas enteras.

A partir del módulo ST5 (experimento VII) se comenzó a cultivar los explantes en cámara de crecimiento e inmediatamente se observó un cambio en el color de los cotiledones, presentándose verdes. Esto permitió concluir que las condiciones de luz y ambiente de la cámara de crecimiento fueron las adecuadas para el desarrollo de los cotiledones. Se presentó para este módulo una muy buena regeneración en todos los tratamientos que no incluyeron agente selectivo en el medio, a excepción del tratamiento LBA4404 + pBI121 que logró regenerar. Esto supone la presencia de algún evento de transformación, evidenciado, en un caso, por

dar positiva la reacción X-Gluc. Esta reacción también se realizó al tratamiento con LBA4404 + pBI121 que no tenía Kanamicina en el medio de cultivo y dio resultado negativo para todas las plantas regeneradas. El porcentaje de regeneración no fue tan alto tal vez debido al efecto producido por la bacteria endógena, no debidamente eliminada a causa del método de esterilización utilizado.

Figura n°20: Etapas de la regeneración de explantes de cotiledones siguiendo el protocolo de Larkin *et al.*, (1996) modificado por Spangenberg (com. pers.)



Para los módulos ST6, ST7 y ST8 ya habían sido ajustados el método de esterilización y el lugar de crecimiento, no incorporándose más Streptomycin al medio de cultivo (ver Cuadro n°2). Se observó que al ajustar estas variables se produjo un incremento importante en el porcentaje de explantes que regeneraron plantas (57%) en los cotiledones que se desarrollaron en medio no selectivo. (ver Figura n°19). Se detectó la presencia de escapes en los módulos ST6 y ST7, en valores mayores a los esperados (10%). Por otra parte se lograron regenerar plantas en medios selectivos, que habían sido tratadas con LBA4404 + pBI121 (ver Figura n°19). Al hacerles la reacción X-Gluc se observó que tres de ellas presentaron coloración azul, posiblemente correspondientes a eventos de transformación.

Usando este protocolo fue posible completar un ciclo de regeneración en los medios de cultivos no selectivos (sin Kanamicina). También se regeneraron plantas en medio selectivo infestadas con LBA4404 + pBI121, que a su vez unas pocas de éstas presentaron coloración azul debido a la reacción con X-Gluc.

Observando los resultados del control positivo usado, papa (ver III.1), se concluyó que la solución con X-Gluc era reactiva, ya que éste se tiñó de azul. En el trabajo se observaron diferencias en la cantidad de área coloreada de los explantes con respecto al testigo (mayor en papa), lo que posiblemente se debió a menores niveles de actividad del GUS en trébol rojo. Aida y Shibata, (1996), trabajando con la especie *Kalanchoe blossfeldiana* y la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404-pBI121, obtuvieron distintos niveles de actividad del GUS: alta, baja y

cercana a cero. Ellos concluyeron que la efectividad de la transformación no estaba correlacionada con esta actividad.

Los resultados obtenidos en esta tesis no permiten asegurar la existencia de plantas transgénicas, ya que no se realizaron estudios posteriores basados en la identificación de los genes introducidos en el ADN genómico de la planta.

IV.3 CONSIDERACIONES GENERALES

IV.3.1 Variable bacteria

En este trabajo se utilizó la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, ya que se encontraba a disposición en el laboratorio. En la revisión bibliográfica no se encontraron trabajos en los que se usara esta cepa para transformar trébol rojo. Existen trabajos sobre el comportamiento de LBA4404 y su efectividad en diferentes especies de plantas. Consideramos que una de las variables a mejorar es la eficiencia en la infestación por parte de la bacteria, ya que según la cepa, existe alto grado de variabilidad para esta característica, (Qazi *et al.*, 1997). Esto es logable utilizando otras cepas de *A. tumefaciens* más virulentas. Se encuentran disponibles a nivel comercial varias cepas de *A. tumefaciens*, las que difieren entre sí en su capacidad de infestación y agresividad. También presentan cierto grado de afinidad con respecto a determinados genotipos. Esta interacción entre la cepa de *Agrobacterium* y el genotipo de la planta tiene particular importancia en trébol rojo ya que se parte de una población genéticamente heterogénea (Quesenberry *et al.*, 1996).

IV.3.2 Afinidad bacteria-planta

Hay algunos métodos que permiten aumentar la eficiencia de transformación por la bacteria. Uno de estos métodos se basa en la inclusión de ciertas sustancias (compuestos fenólicos de las plantas), en el medio de cocultivo de las bacterias (Khan *et al.*, 1994), que activan la transferencia e incorporación de ADN por parte de las células bacterianas. En este sentido, acetosiringona es un compuesto frecuentemente usado para este fin, puesto que varios ensayos han demostrado que es un inductor de los genes *vir* de *Agrobacterium* generando una mayor virulencia, al igual que coumaryl alcohol y sinapyl alcohol (Nan *et al.*, 1997; Mohri *et al.*, 1997). Normalmente se utiliza un medio ácido, con pH entorno a 5,2, para aumentar más la virulencia de las bacterias (Tcacenco, 1996). En este trabajo no se usaron estos mecanismos para promover la infección y se planteó la duda, de poder haber aumentado la efectividad de la infección y lograr un mayor número de plantas transgénicas, en caso de haberlos utilizado.

IV.3.3 Variable genotipo

El trébol rojo es una especie alógama y por lo tanto posee una gran diversidad de genotipos. Esto implica que existe una gran variabilidad dentro de una misma variedad, y por esto cobra importancia la selección de materiales con alta capacidad

regenerativa. Esto tendría más significado si los explantes utilizados fueran meristemáticos. Por otro lado se desprende la importancia de utilizar un número importante de explantes de forma de encontrar en ellos la mayor cantidad de genotipos posibles y poder seleccionar los mejores materiales para utilizarlos en trabajos posteriores

En este trabajo se usaron dos grupos de materiales vegetales, uno de genotipo fijo (protocolo embriogénesis somática) y otro de genotipo variable (protocolos de organogénesis directa). El primero tuvo como ventaja que partió de un genotipo conocido (clon 90-2) seleccionado por su alta respuesta a la regeneración. Es un protocolo fácil de llevar a cabo y la manipulación no es difícil.

Faltaría evaluar en trabajos posteriores la incidencia que puede llegar a tener en la formación de callo, en morfogénesis y en la formación de núcleos organogenéticos la zona de la planta de la cual se extraen los folíolos y pecíolos (si son basales o apicales) y la forma en que el explante es colocado en el medio de cultivo (haz o envés en contacto con el medio).

En los protocolos de organogénesis directa se presenta la ventaja de que poseen mayor capacidad organogenética de por sí, ya que los cotiledones utilizados están formados por células con mayor competencia para organogénesis. Como desventajas se vio que son protocolos de difícil manipulación ya que consume mucho tiempo la obtención del explante, y que cada genotipo tiene una respuesta determinada a la regeneración, por lo que es necesario trabajar con un gran número de explantes.

La selección de materiales con alta capacidad de regeneración es un punto atractivo para la generación de un nuevo material sintético en trébol rojo, para ser usado en trabajos de ingeniería genética.

V. CONCLUSIONES

- Fue posible en condiciones in vitro regenerar plantas de *Trifolium pratense*, trébol rojo, a partir de materiales nacionales, utilizando como explantes cotiledones y siguiendo la técnica descrita en los protocolos de Organogénesis Directa. En el protocolo de Embriogénesis Somatica, utilizando como explantes pecíolos y folíolos, fue posible llegar hasta la etapa de callo pero no se logró regenerar una planta entera.

- Existe variación en la capacidad regenerativa de cada material vegetal de trébol rojo analizado, debido a la gran variabilidad genotípica que posee esta especie por ser alógama. Esto permitiría seleccionar materiales superiores en capacidad regenerativa.

- Se constató la presencia de una bacteria endógena en las semillas de trébol rojo de la variedad LE 116, la cual es sensible a Streptomycin y puede ser controlada con el método de esterilización que incluye $HgCl_2$.

- Se obtuvieron cuatro materiales de trébol rojo desarrollados en medio selectivo y positivos a la reacción de X-Gluc.

- Este trabajo mostró que utilizando las técnicas aquí descritas, es posible generar plantas modificadas genéticamente con características de interés agronómico, paso previo para la obtención de cultivares de mayor potencial productivo.

VI. RESUMEN

La modificación genética de plantas es una herramienta que comienza a incluirse dentro de los planes de mejoramiento vegetal. La introducción de genes vía *Agrobacterium tumefaciens* en células vegetales es una técnica natural que permite la obtención de plantas genéticamente modificadas. Simultáneamente, se han desarrollado técnicas eficientes en la regeneración de plantas enteras a partir de una célula vegetal.

En este trabajo se analizaron las condiciones para transformar y regenerar *Trifolium pratense* vía Organogénesis directa y Embriogénesis somática, observando que para estas condiciones la regeneración vía Organogénesis directa presentó mejor desempeño. Se transformaron explantes de peciolo, folíolos y cotiledones con *Agrobacterium*, conteniendo el plásmido pBI121 que posee el gen reportero GUS y el agente selectivo nptII.

Se obtuvieron cuatro plantas que se desarrollaron en medio selectivo y que presentaron coloración azul.

VII. SUMMARY

The genetic modification of plants is being include as a tool in plant breeding. A natural technique that allow the obtention of genetically modified vegetal material is the introduction of genes mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Simultaneasly, within these techniques, efficient methods has been developed in the regeneration of plants starting with a single cell,.

In this work has been analized the conditions to transform and regenerate *Trifolium pratense* by direct organogenesis and somatic embriogenesis , where the direct organogenesis showed better regeneration. Petiols, leafs and cotyledonary explants were transformed *Agrobacterium* mediated with the plasmid pBI121, that contains the reporter gene GUS and the selective gene nptII.

It has been obtained four plants that regenerated on selective medium and present blue tissue.

VIII. BIBLIOGRAFIA

- 1- AIDA, R.; SHIBATA, M. 1996. Transformation of *Kalanchoe blossfeldiana* mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and transgene silencing. Plant Science Limerick 121: 175-185. CAB International. 1996-7/1997
- 2- ALTIER, N. 1988. Enfermedades de plantas forrajeras. In: Jornada de Forrajeras (1988, Colonia del Sacramento, Uruguay). Resumen de los trabajos presentados. CIAAB, Est. Exp. La Estanzuela. P. 4-10.
- 3- _____. 1995. Enfermedades de leguminosas forrajeras: diagnóstico, epidemiología y control. In: Curso de Actualización: Manejo de enfermedades en cereales de invierno y pasturas. INIA La Estanzuela
- 4- _____. 1996. Impacto de las enfermedades en la producción de pasturas. Producción y manejo de pasturas. Serie técnica 80:47-56.
- 5- _____. REBUFFO, M. 1996. Mejoramiento genético de *Lotus corniculatus* L. por persistencia. Serie técnica 80:145-150.
- 6- _____. REBUFFO, M. 1996. Mejoramiento genético de trébol rojo. Producción y manejo de pasturas. Serie técnica 80:151-154.
- 7- ARCIONI, S., DAMIANI, F.; MARIANI, A.; PUPILLI, F. 1997. Somatic hybridization and embryo rescue for the introduction of wild germplasm. B.D. McKersie and D.C.W. Brown, eds. Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes 61-89. CAB International. 1998.
- 8- BARNETT, O.W.; GIBSON, P.B.; SEO, A. 1975. A comparison of heat treatment, cold treatment, and meristem-tip culture for obtaining virus-free plants of *Trifolium repens*. Plant Dis. Rep. 59:834-837.
- 9- CARAMBULA, M. 1977. Producción y manejo de pasturas sembradas; las leguminosas. Uruguay, Hemisferio Sur. 464p.
- 10- _____. MILLOT, J.; GARCIA, J. 1979. Producción forrajera sobre suelos profundos del litoral. 2a Reunión Técnica de la Facultad de Agronomía, P16.
- 11- CASTRO, J. L.; M. DE ZAMUZ, E.; BARBOZA, S. 1981. Fertilización de pasturas en el litoral oeste del Uruguay. Investigaciones Agronómicas, 2: 56-67

- 12- _____. 1989. Trabajo en Pasturas. In: I Jornada ganadera en basalto. MAP-CIAAB. Est. Experimental del Norte, Gencloe. P30-47.
- 13- D'HALLUIN, K.; BOTTERMAN, J.; GREEF, W.D. 1990. Engineering of herbicide-resistant alfalfa and evaluation under field conditions. *Crop Sci.* 30:866-871.
- 14- DU, S.; ERICKSON, L.; BOWLEY, S.R. 1994. Effect of plant genotype on the transformation of cultivated alfalfa (*Medicago sativa*) by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Rep.* 13:330-334.
- 15- DEAK, M.; KISS, G.B.; KONCZ, C.; DUDITS, D. 1986. Transformation of *Medicago* by *Agrobacterium* mediated gene transfer. *Plant Cell Rep.* 5:97-100.
- 16- EALING, P.M.; HANCOCK, K.R.; WHITE, D.W.R. 1994. Expression of the pea albumin 1 gene in transgenic white clover and tobacco. *Transgenic Res.* 3:344-354.
- 17- FARIA, M. J. S. S.; DONNELLY, D. J.; COUSINEAU, J. C. 1997. Adventitious shoot regeneration and *Agrobacterium*-mediated transformation of red raspberry. *Arquivos de Biologia e Tecnologia* 40:518-529. CAB International. 7/1997-1998.
- 18- GARCIA, J. A. 1989. The impact of renovation and phosphate fertilization on the productivity of pastures in Uruguay. In International Grassland Congress (18°, 1989, Nice, Francia) Proceedings. pp. 93-94
- 19- _____. REBUFFO, M.; FORMOSO, F. 1991. Las forrajeras de La Estanzuela. *Boletín de Divulgación* 7:11.
- 20- _____. 1992. Persistencia de leguminosas. *Rev. INIA Inv. Agr.* 1(II)143-156.
- 21- GEORGE, E. F.; PUTTOCK, D. J. M.; GEORGE, H. J. 1987. *Plant Culture Media Formulation and uses.* 1:354.
- 22- GOLDS, T.J.; LES, J.Y.; GHOSE, T.K.; DAVEY, M.R. 1991. *Agrobacterium rhizogenes* mediated transformation of the forage legumes *Medicago sativa* and *Onobrychis viciifolia*. *J. Exper. Bot.* 42:1147-1157.
- 23- HONKANEN, J.; RYOPPY, P. 1989. Somatic hybridization in *Trifolium*. P 397-409. In Y.P.S. Bajaj, ed. *Plant protoplasts and genetic engineering, Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol 8.* Springer, Berlin Heidelberg.

- 24- ISLAM, R.; MALIK, T.; HUSNAIN, T.; RIAZUDDIN, S. 1994. Stain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-chickpea interaction. *Plant Cell Reports*. 13:561-563.
- 25- JEFFERSON, R.A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: the Gus gene fusion system. *Plan Molecular Biology Reporter*. 5:387-405.
- 26- KHAN, M.R.I.; TABE, L.M.; HEATH, L.C.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. 1994. *Agrobacterium*-mediated transformation of subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Plant Physiol*. 105:81-88.
- 27- _____. CERIOTTI, A.; TABE, L.; ARYAN, A.; MCNABB, W.; MOORE, A.; CRAIG, S.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. 1996. Accumulation of a sulphur-rich seed albumin from sunflower in the leaves of transgenic subterranean clover (*Trifolium subterraneum* L.). *Transgenic Res*. 5:179-185.
- 28- KEYES, G.J.; COLLINS, G.B.; TAYLOR, N.L. 1980. Genetic variation in tissue cultures of red clover. *Theor. Appl. Genet*. 58: 265-271.
- 29- LARKIN, P.J.; GIBSON, J.M.; MATHESIU, U.; WEINMAN, J.J.; GARTNER, E.; HALL, E.; TANNER, G.J.; ROLFE, B.G.; DJORDJEVIC, M.A. 1996. Transgenic white clover. Studies with auxin responsive promoter, GH3, in root gravitropism and lateral root development. *Transgenic Res*. 5:1-11.
- 30- LI, Y.G.; TANNER, G.J.; DELVES, A.C.; LARKIN, P.J. 1993. Asymmetric somatic hybrid plants between *Medicago sativa* L. (alfalfa, lucerne) and *Onobrychis viciifolia* Scop. (sainfoin). *Theor. Appl. Genet*. 87:455-463.
- 31- McLEAN, N.L.; NOWAK, J. 1998. Inheritance of somatic embryogenesis in red clover (*Trifolium pratense* L.). *Theor. Appl. Genet*. 97: 557-562
- 32- MEYERS, J.R.; GROSSER, J.W.; TAYLOR, N.L.; COLLINS, G.B. 1989. Genotype-dependent whole plant regeneration from protoplasts of red clover (*Trifolium pratense* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 113-127.
- 33- MOHRI, T.; MUKAI, Y.; SHINOHARA, K. 1997. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of Japanese white birch (*Betula platyphylla* var. Japonica). *Plant Science Limerick*. 127:53-60. CAB International. 1997-7/1998.
- 34- MORRIS, P.; ROBBINS, M.P. 1997. Manipulating condensed tannins in forage

- legumes. B.D. McKersie and D.C.W. Brown, eds. Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes 147-173. CAB International. 1997-7/1998.
- 35- McKERSIE, B.D.; BROWN, D.C.W. 1997. Somatic embryogenesis and artificial seeds. B.D. McKersie and D.C.W. Brown, eds. Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes 111-143. CAB International. 1997-7/1998.
- 36- NAN, G. L.; TANG, C. S.; KUEHNLE, A. R.; KADO, C. I. 1997. *Dendrobium orchids* contain an inducer of *Agrobacterium* virulence genes. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 51:391-399. CAB International. 1997-7/1998.
- 37- PAGLIANO, D. 1985. Caracterización y evaluación simbiótica de cepas de *Rhizobium trifolii* aisladas de mejoramientos forrajeros con características de persistencia. Tesis Ing. Agr. Montevideo, Uruguay, Facultad de Agronomía. 292p.
- 38- PHILLIPS, G.C.; COLLINS, G.B. 1979. In vitro tissue culture of selected legumes and plant regeneration from callus cultures of red clover. *Crop. Sci* 19: 59-64.
- 39- _____. COLLINS, G.B. 1984. Red clover and other forage legumes. *Handbook of Plant Cell Culture*. 2:169-179.
- 40- PILON-SMITS, E.A.H.; EBSKAMP, M.J.M.; PAUL, M.J.; JEUKEN, M.J.W.; WEISBEEK, P.J.; SMEEKENS, S.C.M. 1995. Improved performance of transgenic fructan-accumulating tobacco under drought stress. *Plant Physiol.* 107:125-130.
- 41- QAZI, S. H. A.; SHAHIDA-HASNAIN; HASNAIN, S. 1997. Host range and host specificity spectrum of indigenous *Agrobacterium tumefaciens* strains from Pakistan. *Pakistan Journal of Zoology* 29:113-122. CAB International. 1997-7/1998.
- 42- QUESENBERRY, K.H.; SMITH, R.R. 1993. Recurrent selection for plant regeneration from red clover tissue culture. *Crop Sci.* 33:585-589
- 43- _____. WAFFORD, D.S.; SMITH, R.L.; KROTTJE, P.A.; TCACENCO, F. 1996. Production of red clover transgenic for neomycin phosphotransferase II using *Agrobacterium*. *Crop Sci.* 36:1045-1048
- 44- SAMAC, D.A. 1995. Strain specificity in transformation of alfalfa by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 43:271-277.

- 45- SCHROEDER, H.E.; KHAN, M.R.I.; KNIBB, W.R.; SPENCER, D.; HIGGINS, T.J.V. 1991. Expression of a chicken ovalbumin gene in three lucerne cultivars. *Aust. J. Plant Physiol.* 18:495-505.
- 46- SHEATH, G. W.; POTTINGER, R. P.; CONFORTH, I. S. 1988. Informe de consultoría sobre la estabilidad de las pasturas. Plan Agropecuario, MGAP, mimeografiado.
- 47- SPANGENBERG, G. 1997. Biotechnology in pasture plant improvement: methods and prospect. In International Grassland Congress (18º, 1997, Canada). Proceedings
- 48- TCACENCO, F.A. 1996. Melhoramento genético de trevo vermelho para resistência a vírus por meio de biotecnologia. *Agrop. Catarinense* 9: 11-15.
- 49- VANCE, C.P. 1997. Nitrogen fixation capacity. Pages 375-407 in B.D. McKersie and D.C.W. Brown, eds. *Biotechnology and the Improvement of Forage Legumes*. CAB International. 1997-7/1998.
- 50- WHITE, D. W. R.; GREENWOOD, D. 1987. Transformation of forage legume *Trifolium repens* L. using binary *Agrobacterium* vectors. *Plant Molecular Biology* 8:461-469.
- 51- WANG, Z.Y.; TAKAMIZO, T.; IGLESIAS, V.A.; OSUSKY, M.; NAGEL, J.; POTRYKUS, I.; SPANGENBERG, G. 1992. Transgenic plants of tall fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) obtained by direct gene transfer to protoplasts. *Bio/Technology* 10:691-696.

IX. ANEXOS

Anexo nº1: Composición química de los medios de cultivos utilizados para los distintos protocolos y materiales vegetales.

COMPOSICIÓN QUÍMICA DE MEDIOS (mg/l)							
	BSIC *	BSIE *	B5DE *	BSPB **	RIB **	MSd ***	MSe ***
Macronutrientes							
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	134	134	134	0	0	0
(NH ₄)NO ₃					1000	1650	825
KNO ₃	2500	2500	2500	2500	2100	1900	950
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150	150	150	150	600	440	220
MgSO ₄ ·7H ₂ O	250	250	250	250	435	370	185
KH ₂ PO ₄					325	170	85
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150	150	150	150	85	0	0
Micronutrientes							
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,8	27,8	27,8	27,8	25	27,8	13,9
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3	37,3	0	37,3	18,65
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0	0	0	0	0	22,3	11,15
MnSO ₄ ·H ₂ O	10	10	10	10	15	0	0
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2	2	2	2	5	8,6	4,3
H ₃ BO ₃	3	3	3	3	5	6,2	3,1
KI	0,75	0,75	0,75	0,75	1	0,83	0,415
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	0,25	0,25	0,4	0,25	0,125
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,1	0,025	0,0125
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,025	0,025	0,025	0,1	0,025	0,0125
Vitaminas							
Myo-inositol	100	100	100	100	250	100	50
Ac. Nicotínico	1	1	1	1	0	0,5	0,25
Pyridoxina·HCL	1	1	1	1	0,5	0,5	0,25
Tiamina HCL	10	20	20	20	2	0,1	0,05
Aminoácidos							
Glicina	0	0	0	0	0	2	1
Hormonas							
Kinetina	2,12	0	0	0	0	0	0
Adenina	0	2	0	0	0	0	0
2,4-D	2,25	0	0	0	0	0	0
AIA	0	0	0	0	0	0	0
ANA	2	2	0,2	0	0	0,093	0
Picloran	0	0	0	0,003	0	0	0
BAP	0	0	0	0,496	0	0	0
TDZ	0	0	0	0	0	1	0
IBA	0	0	0	0	0,244	0	0,24

Otros							
Sacarosa	20000	20000	20000	20000	25000	30000	30000
Agar	8000	8000	8000	7000	8000	8000	8000
pH	5,5	5,5	5,5	5,5	5,8	5,75	5,75

Autoclavar por 20 min a 15 p.s.i. a 120 °C.

* Quesenberry y Smith, (1993).

** Larkin *et al.*, (1996).

*** Murashige y Skoog, (1962).

Anexo n°2: Medio de cultivo para desarrollo de bacterias.

MEDIO DE CULTIVO PARA AGROBACTERIUM

MGL solución stock (100 X)

K ₂ PO ₄	2,5 g
NaCl	1,0 g
MgSO ₄ .7H ₂ O	1,0 g
H ₂ O	100 ml

MGL	1 litro
Tryptona	5,0 g
Ext. Levadura	2,5 g
Ac.L-Glutámico	1,15 g
Mannitol	5,0 g
MGL stock (100 X)	10 ml

Ajustar pH a 7,0 con NaOH

Autoclavar por 20 min a 15 p.s.i. a 120° C.

Anexo nº3: Porcentaje de formación de callo, porcentaje de organogénesis y porcentaje de formación de núcleos organogenéticos según explante, para cada clon.

CLON	% FORMAC.CALLO		% ORGANOGÉNESIS		% DE NÚCLEOS ORGANOGÉNÉTICOS por clases							
	Pecíolo	Folículo	Pecíolo	Folículo	Pecíolo				Folículo			
					I	II	III	IV	I	II	III	IV
2-1	98	100	37,1	25	94	6	0	0	97,4	2,6	0	0
9-1	98	100	0	0	63,6	36,4	0	0	14,8	77,4	7,8	0
13-1	100	100	0	0	98,8	1,2	0	0	93,2	6,8	0	0
27-2	21	36	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
34-2	92	88	0	0	93,7	5,6	0,7	0	61,4	28,4	10,2	0
46-1	97	41	19,4	18,2	50,9	46,7	2,4	0	21,8	72,7	5,5	0
47-1	100	100	54,5	57,6	100	0	0	0	100	0	0	0
47-2	100	95	54,5	48,1	100	0	0	0	100	0	0	0
51-2	98	100	0	0	95,5	4,5	0	0	97,3	2,7	0	0
52-1	98	100	10,9	5,4	90,9	9,1	0	0	91,8	8,2	0	0
55-1	96	100	0	1,8	100	0	0	0	91	9	0	0
58-1	78	98	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
62-1	91	100	0	0	82	18	0	0	93	7	0	0
70-1	100	98	0	0	95	5	0	0	87	13	0	0
74-2	100	93	0	6,8	100	0	0	0	100	0	0	0
78-1	93	80	0	0	95	5	0	0	100	0	0	0
78-3	96	95	8,4	3,4	99,4	0,6	0	0	97,7	2,3	0	0
82-1	91	90	10,9	1,8	12,7	65,4	21,8	0	1,8	36,4	30,9	30,9
82-2	94	100	0	0	77,3	22,7	0	0	58	39	3	0
83-1	76	100	0	0	99	1	0	0	98	2	0	0
90-2	100	100	0	7,8	51,5	48,5	0	0	11	65	24	0
91-1	79,5	94	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
91-2	98	93	39,1	25	64,5	34,6	0,9	0	25	68,2	6,8	0
92-1	88	100	2	0	93	7	0	0	65	35	0	0
103-2	100	100	0	0	100	0	0	0	100	0	0	0
Prome dio	91,63	92,35	11,2	9,94	86,8	12,2	0,99	0	77,12	18,30	3,39	1,19
Desvio	16,02	16,6	19,23	18,02	21,5	18,52	4,27	0	33,39	25,89	7,7	6,06
C.V.	17,48	17,98	171	181,21	24,77	151,73	430,72	0	43,29	141,53	226,96	509,9

Anexo n°4: Número y porcentaje de explantes regenerados según experimentos, tratamientos y módulos.

Módul	<i>A. tumefaciens</i> 4404 + pBI121				<i>A. tumefaciens</i> 4404				Control			
	+Km +Cb		-Km +Cb		+Km +Cb		-Km +Cb		+Km +Cb		-Km +Cb	
	Nº expl.	% expl.	º expl.	% expl.	º expl.	% expl.	º expl.	% expl.	º expl.	% expl.	º expl.	% expl.
	regener	regener	regener	regener	regener	regener	regener	regener	regener	regener	regener	regener
LT1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LT2	0	0	3	15	1	5	0	0	0	0	0	0
LT3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	5
LT4	0	0	0	0	0	0	1	5	1	5	4	20
ST1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
ST2	0	0	3	15	1	5	3	15	0	0	0	0
ST3	0	0	2	10	0	0	0	0	0	0	0	0
ST4	0	0	2	10	0	0	6	30	1	5	0	0
ST5	10	10	2	10	0	0	11	55	0	0	10	50
ST6	4	4	10	50	0	0	20	100	2	10	14	70
ST7	4	4	2	10	2	10	8	40	0	0	11	55
ST8	1	1	6	30	0	0	13	65	1	5	19	95
QTp1	0	0	2	20	0	0	4	40	0	0	3	30
QTf1	0	0	1	10	0	0	5	50	0	0	2	20
QTp2	3	6	9	90	0	0	9	90	0	0	10	100
QTf2	0	0	10	100	0	0	9	90	0	0	10	100