

Proyectos Nacionales de INTA en transgénesis de soja

Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo

Dr. Ezequiel Bossio

Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF),
C.I.C.V.y A.

“Soja en el Siglo XXI: a 15 años de la aprobación
del primer evento transgénico en Argentina”

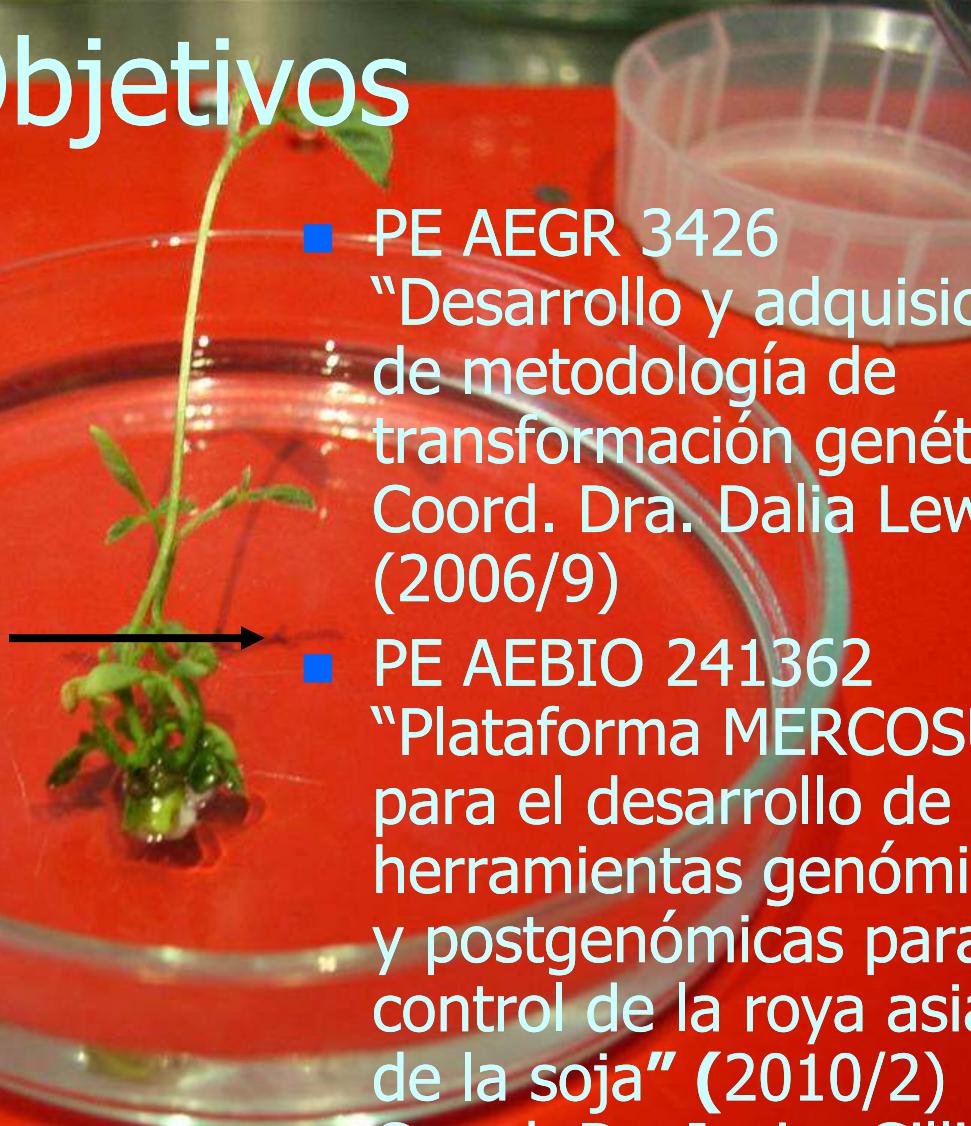
10 de mayo 2011

Transformación genética de soja

- Por qué?
 - Apoyo al programa de mejoramiento institucional
 - Generar capacidades para contribuir a la diversificación de las aplicaciones de soja

Objetivos

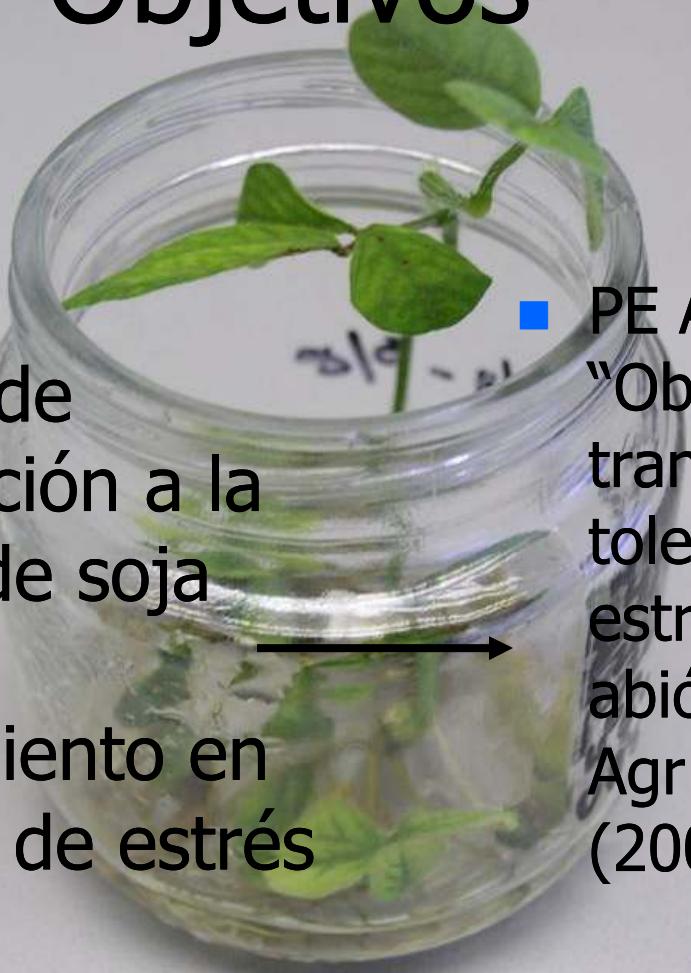
- **1.- Desarrollar protocolos de transformación genética**



- PE AEGR 3426
"Desarrollo y adquisición de metodología de transformación genética"
Coord. Dra. Dalia Lewi
(2006/9)
- PE AEBIO 241362
"Plataforma MERCOSUR para el desarrollo de herramientas genómicas y postgenómicas para el control de la roya asiática de la soja" (2010/2)
Coord. Dr. Javier Gilli

Objetivos

- 2.- Aplicar protocolos de transformación a la obtención de soja con mejor comportamiento en situaciones de estrés
- PE AERG 233251
“Obtención de plantas transgénicas con tolerancia a factores de estrés bióticos y abióticos” Coord. Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo (2009/12)



Morfogénesis en soja



- Considerada por muchos años especie “recalcitrante” para el cultivo *in vitro*
- La regeneración depende del tejido de partida (explante) y el genotipo

Tejidos con respuesta morfogénica

- cotiledón inmaduro
- nudo cotiledonar
- ápice
- tercio superior del hipocótille



Respuesta Morfogénica

Cotiledón inmaduro → Embriones somáticos



Nudo cotiledón
maduro
Ápice semilla



Tallos



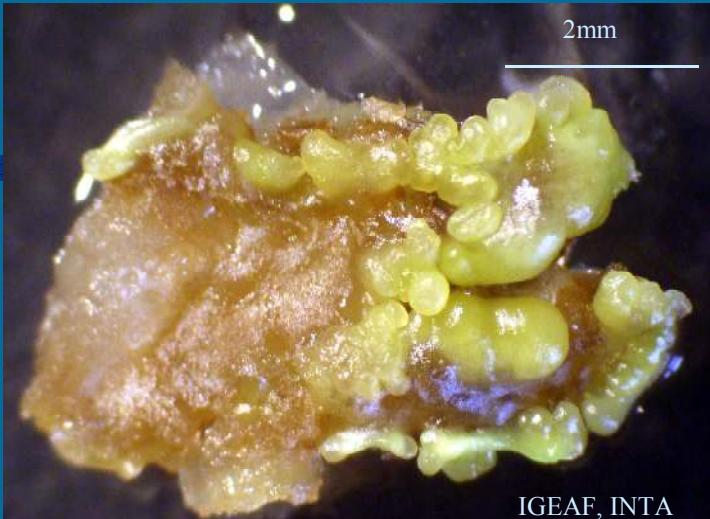
Año	Explante Blanco	Método de Transferencia	Publicación
1988	ápice	acelerador de microproyectiles	McCabe et al. Nature Biotech. 6, 923
1988	nudo cotiledonar	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Hinchee et al. Nature Biotech. 6: 915-922
1991	suspensiones embriogénicas	acelerador de microproyectiles	Finer McMullen In Vitro Cel Dev Biol 27P: 175- 182
1997	suspensiones embriogénicas/cotiledones inmaduros	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Trick and Finer Transgenic Research 6: 329-336
1999	embriones somáticos	acelerador de microproyectiles	Santarém, J. Finer In Vitro Cel Dev Biol 35: 451 –455
2004	ápice	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	Liu et al. Planta 219: 1042–1049

Manipulación de Embiones Somáticos con Transformación a través del P.I.G.

- J. Finer. 1988. Plant Cell Rep. 7: 238-241
- Finer, McMullen. 1991. In Vitro Cel Dev Biol 27P, 175 - 182
- E. Santarém, J. Finer. 1999. In Vitro Cel Dev Biol 35: 451 - 455



Emбриogénesis somática

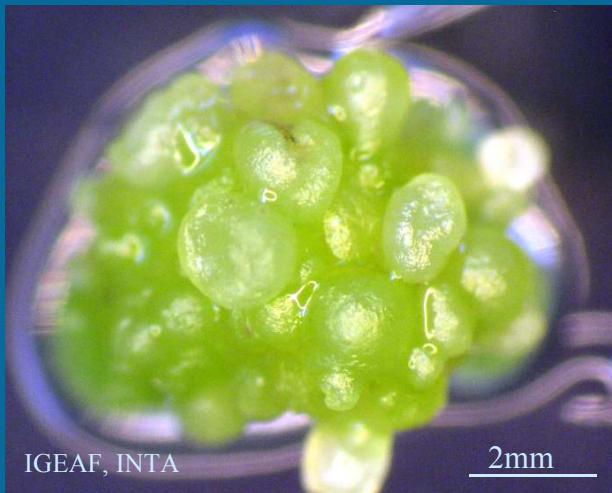
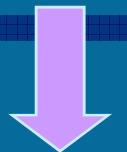


Formación de embriones
en medio D40



Desarrollo de Embriones Somáticos

Transferencia génica y selección (medio líquido o sólido)



Multiplicación en estado globular en medio D20

Selección con higromicina o geneticina

Desarrollo en medio M60

Maduración de Embriones Somáticos



IGEAF, INTA



Deshidratación

Germinación de Embriones Somáticos



IGEAF, INTA



IGEAF, INTA

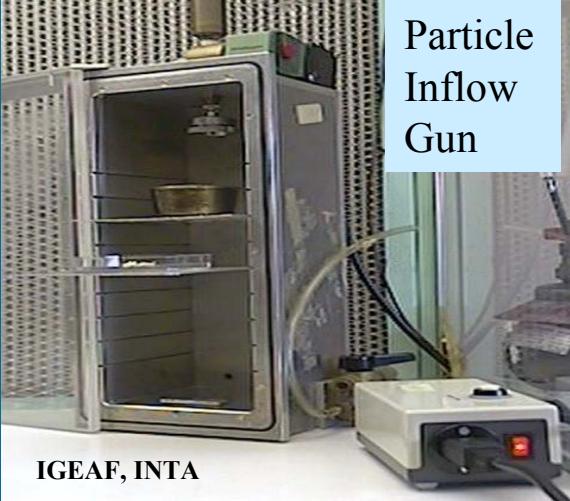


IGEAF, INTA

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Características de la transformación de ES



- Alta eficiencia (en términos de plantas transformadas/bombardeo y plantas transformadas/operador)
↗
- Tiempos prolongados de preparación del material blanco de transformación
↘
- Presencia de copias múltiples de los transgenes de interés
↘
- Las plantas transgénicas recuperadas son genéticamente iguales en cada célula constituyente.
↗



Nudo Cotiledonar

Preparación de explantes I



Nudo Cotiledonar

Preparación de explantes II



- Corte y daño sobre el cotiledón



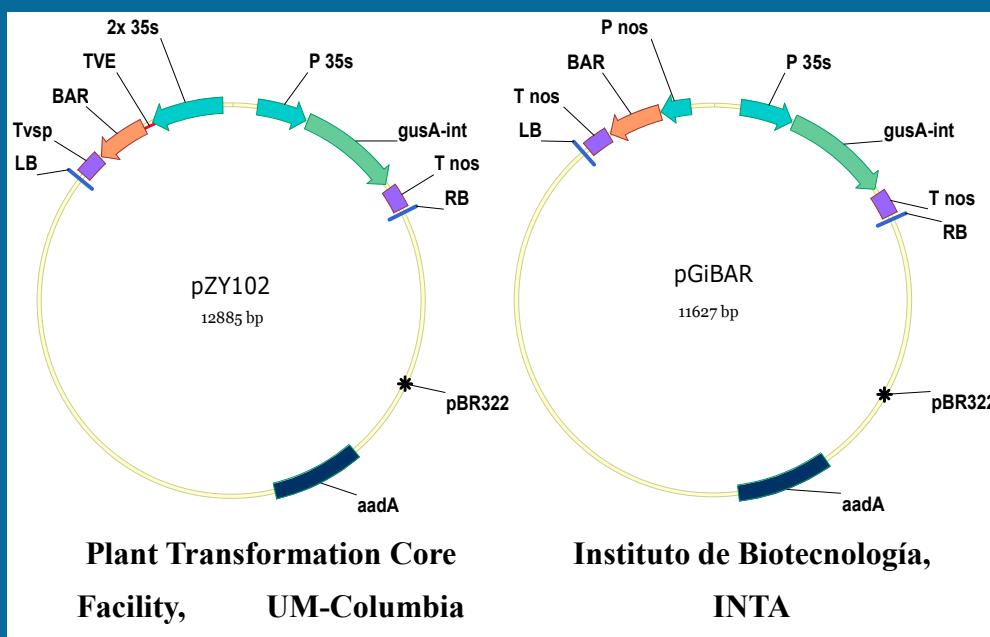
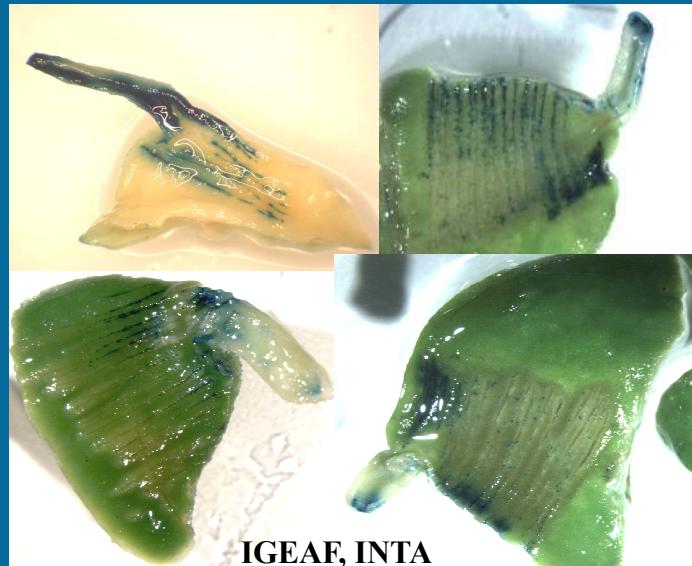
IGEAF, INTA

Infección



- A. t. EHA 101/ EHA 105
- Soja: var. Jack

Co-Cultivo



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Inducción de tallos



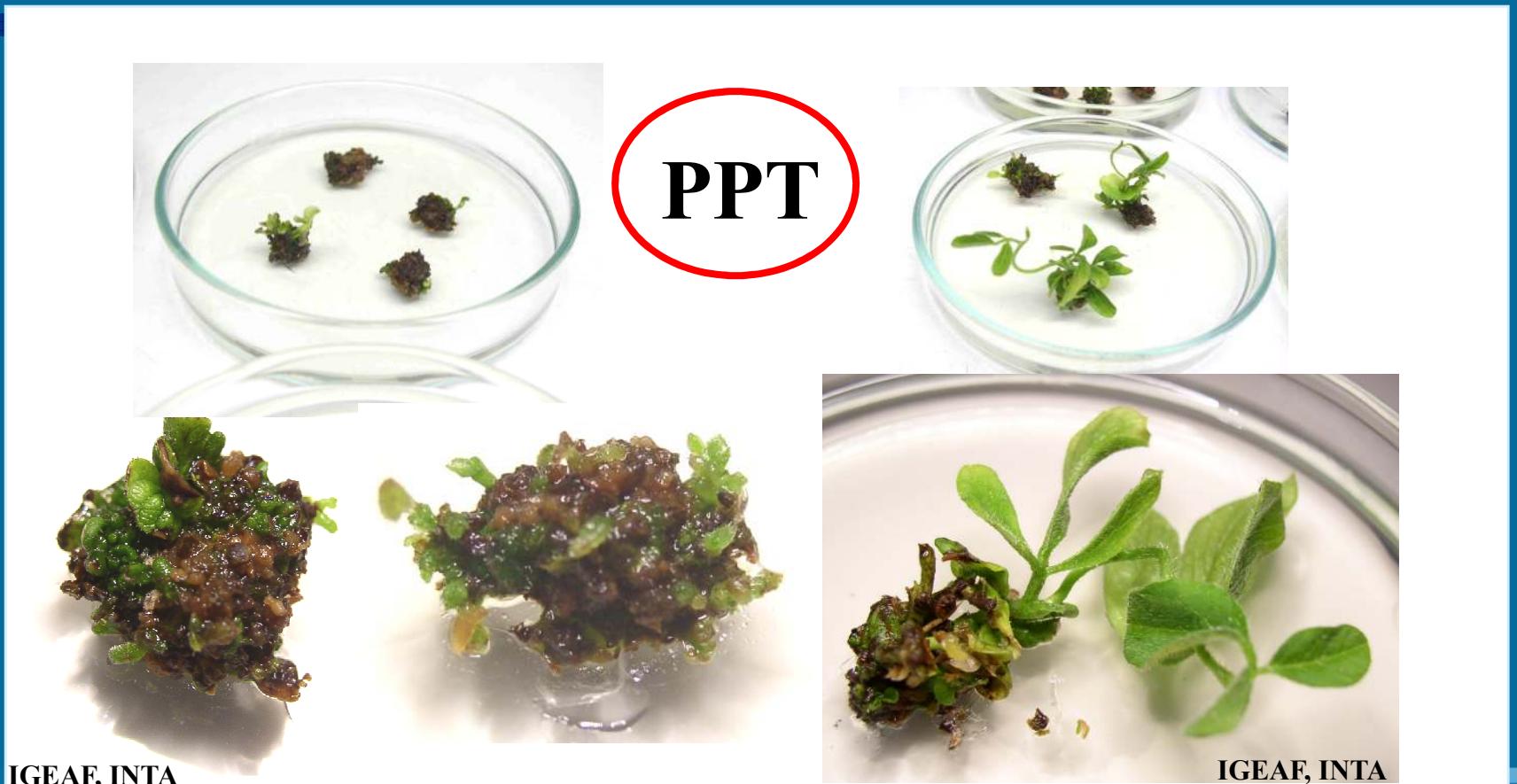
1
mes



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Elongación y selección



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Enraizamiento y rustificación



1
mes



IGEAE, INTA

Indicadores de la transformación

■ *Germinación e Infección*

5 % contaminación en semilla.

420 cotiledones infectados con Agro por semana

■ *Transferencia génica*

98 % de los cotiledones muestran tinción gus +

■ *Inducción*

85 % de los cotiledones infectados inducen explantes seleccionables

■ *Enraizamiento*

89% de los tallos enraizan

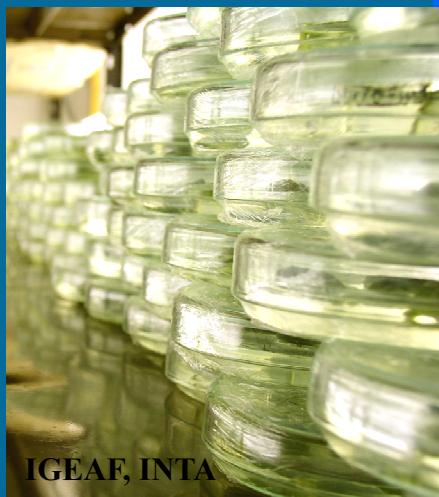
67% de las plantas enraizadas son bar+ por PCR

1,2 plantas *in vitro* transgénicas /100 cotiledones infectados con EHA101pGiBAR

4,4 plantas *in vitro* transgénicas /100 cotiledones infectados con EHA101pZY102

Características del método del nudo cotiledonar

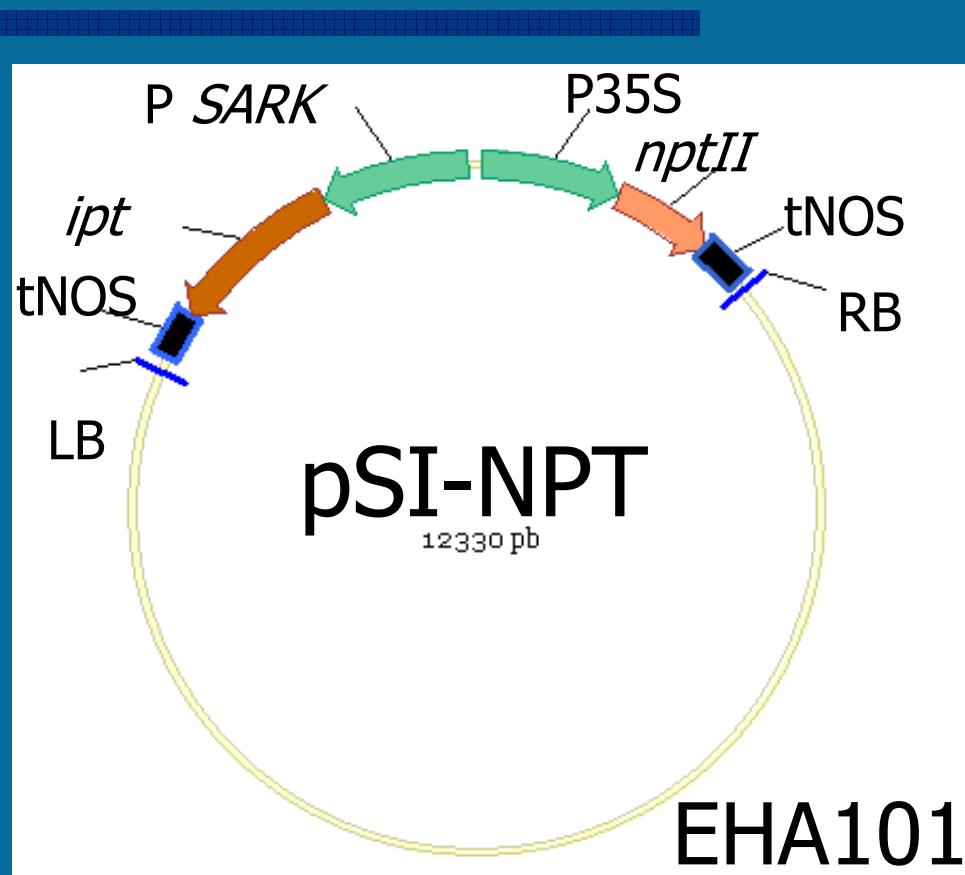
- Muy demandante en trabajo calificado 
- Se integran pocas copias de transgenes de interés 
- Posibilidad de obtener plantas químicas. 



Déficit hídrico y senescencia

- Prueba de concepto sobre la posibilidad de aumentar la tolerancia a d.h. a través de la alteración del programa de senescencia
- Colaboración con el Dr. Eduardo Blumwald (UC, Davies)

Déficit hídrico y senescencia



- Promotor del gen **SARK** (*Senescence Associated Receptor Kinase*) de poroto controla la expresión autoregulada de la **región codificadora** del gen ***ipt*** de *Agrobacterium tumefaciens*

Participantes transformación de soja en el IGEAF

- Dr. Ezequiel Bossio



- Sra. Sara Ameijeiras



- Ing. Agr. Antonio Díaz
Paleo



MUCHAS GRACIAS