

### **Optimización de un sistema de modificación genética de álamos para la incorporación de genes inductores de floración temprana y androesterilidad.**

BRIONES M.V.<sup>1</sup>; HOENICKA H.<sup>2</sup>; FLADUNG M.<sup>2</sup>; GARCIA ML.<sup>3</sup>; GALARCO S.<sup>4</sup>; SHARRY S.<sup>5</sup>.

1. Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología (INBIOTEC)-CONICET. Mar del Plata (7600), Argentina. E-mail: brionesforestal@gmail.com

2. Thünen Institute of Forest Genetics, D-22927 Grosshansdorf, Germany. E-mail: hans.hoenicka@thuenen.de

3. Instituto de Biotecnología y Biología Molecular (IBBM) -UNLP-CONICET. La Plata (1900), Argentina. E-mail: garcia\_m@biol.unlp.edu.ar

4. LIMAD. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP. CC31 La Plata (1900), Argentina. E-mail: sebastiangalarco@gmail.com

5. LIMAD. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales-UNLP; UNRN Sede Viedma; CICPBA. CC31 La Plata (1900), Argentina. E-mail: [silviculturam@gmail.com](mailto:silviculturam@gmail.com)

#### **Resumen**

Las especies de árboles forestales alcanzan la madurez reproductiva después de muchos años o incluso décadas de crecimiento juvenil. Los tratamientos especiales, basados en hormonas vegetales, inhibidores del crecimiento, manipulación del ambiente de crecimiento o métodos físicos, han promovido el desarrollo de flores en plantas juveniles de varias especies de árboles forestales, pero no en álamo. Sólo la ingeniería genética ha permitido que la floración temprana sea inducida en plantas juveniles de álamo. La liberación al medio de álamos genéticamente modificados (GM) tiene limitantes, tanto desde el punto de vista ambiental, como comercial y de percepción pública. La obtención de álamos GM estériles facilitarían la liberación de los mismos al medio de forma segura. El objetivo general de este trabajo fue optimizar un sistema de modificación genética de *Populus* sp. para la incorporación, en simultáneo, de genes de floración temprana y androesterilidad, acelerando el tiempo de obtención de líneas transgénicas dobles. Se logró ajustar un método eficiente de regeneración de plantas *in vitro* de clones recalcitrantes de *Populus deltoides* y clones del híbrido *Populus x canadensis*. Se obtuvieron líneas transgénicas dobles de *P. tremula* L., conteniendo en simultáneo los genes inductores de la floración temprana y la androesterilidad. También se obtuvieron líneas transgénicas simples de *P. deltoides* y *P. x euramericana*, portadoras del gen inductor de la floración temprana. Todas las líneas obtenidas regeneraron en plantas completas donde pudo confirmarse, con técnicas moleculares, la presencia de los transgenes. Se evaluó el desarrollo de la floración precoz inducida por el constructo HSP::*AtFT*, al mismo tiempo que la androesterilidad, inducida por la expresión del constructo XY::*barnase* en plantas crecidas en invernáculo de *Populus tremula* L. transgénicas. Este estudio representa un gran avance en la transformación del *P. deltoides* y *P. euramericana* siendo éstos los primeros álamos de estas dos especies con la característica de floración temprana. Confirmamos que el sistema HSP::*AtFT* en álamos combina una inducción de la floración temprana con un normal crecimiento vegetativo y que el sistema XY::*barnase* es efectivo para obtener álamos masculinos transgénicos estériles. Disponer de este protocolo eficiente de transformación con genes de androesterilidad permitirá en un futuro modificar genéticamente clones de álamo de interés local para introducir, junto con esta característica, caracteres de importancia silvicultural, de forma controlada. También se podrán desarrollar clones de álamos con floración temprana para incorporar a los programas de mejora genética convencional.

**Palabras clave:** álamo transgénico, floración temprana, androesterilidad, bioseguridad.

## Introducción

La madera de álamo es muy preciada a nivel mundial debido a su alta versatilidad y a sus principales propiedades, tales como liviandad, color claro, facilidad para ser descortezada, encolada y todas aquellas tareas de remanufactura final (Castro, 2006). El uso de la madera de álamo es muy variado, desde la industria maderera, hasta usos medioambientales y de agroforestación (Calderón, 2006). Argentina cuenta con más 120000 ha. de plantaciones de Salicáceas, siendo el delta del Paraná la región más importante de este cultivo con aproximadamente 57.539 ha. (MinAgri, 2012). Las plantaciones comerciales están constituídas principalmente por cuatro clones de *Populus deltoides*: ‘Australiano 129/60’, ‘Australiano 106/60’, ‘Stoneville 67’ y ‘Carabelas INTA’; y un clon de *P. x canadensis*, el ‘Ragonese 22 INTA’ (EX 568-1). Estos clones muestran buenos rendimientos volumétricos y son resistentes tanto a la roya como a la cancrrosis.

Existe la necesidad de mejorar e incrementar las plantaciones forestales para contribuir a satisfacer la creciente demanda de madera. Esto es parte de las estrategias nacionales y mundiales de ordenación forestal. La biotecnología moderna ofrece alternativas tecnológicas para superar las limitaciones del mejoramiento tradicional de especies forestales y contribuir a cumplir los dos objetivos básicos y clásicos de la gestión forestal: el mantenimiento y la ordenación de la diversidad de los bosques naturales, y la mejora genética de las plantaciones forestales. Los beneficios potenciales de la biotecnología son aún mayores en la silvicultura que en la agricultura, ya que puede permitir acortar el tiempo requerido para realizar cruces con las proles obtenidas de cruzamientos con árboles. Las especies de árboles forestales alcanzan la madurez reproductiva después de muchos años o incluso décadas de crecimiento juvenil. Esto ha limitado en gran medida las posibilidades de mejoramiento genético de especies forestales.

La modificación de la floración (promoción, inhibición) tiene un alto potencial para acelerar el mejoramiento genético de especies leñosas. Los tratamientos especiales, basados en hormonas vegetales, inhibidores del crecimiento, manipulación del ambiente de crecimiento o métodos físicos, han promovido el desarrollo de flores en plantas juveniles de varias especies de árboles forestales, pero no en álamos. Sólo la ingeniería genética ha permitido que la floración temprana sea inducida en plantas juveniles de álamo. Por otro lado, el cultivo de álamos genéticamente modificados (GM) es limitado por objeciones de índole ecológica y la oposición de la opinión pública en muchos países. La obtención de álamos GM estériles facilitarían la liberación de los mismos al medio de forma segura. El desarrollo de una estrategia de “contención de genes” utilizando ingeniería genética es una solución promisoría para evitar el flujo genético desde árboles GM. Esta estrategia también podría ser muy útil para evitar el creciente flujo genético proveniente de especies no nativas introducidas con fines comerciales en plantaciones forestales y parques en todo el mundo. La incorporación de genes de esterilidad en líneas de árboles transgénicos fue propuesta para reducir o abolir el flujo de genes de las transgénicas a las no transgénicas (Brunner *et al.* 2007; Strauss *et al.*, 1995). Una ventaja adicional de árboles estériles podría ser la reducción del costo energético necesario para desarrollar las estructuras reproductivas (Brunner *et al.*, 1998, Mouradov *et al.*, 1998). Varios constructos de genes de esterilidad han sido probados con diferentes niveles de éxito en cultivos, como por ejemplo, la expresión de genes deletéreos en órganos de flores, como *barnase* (García-Sogo *et al.*, 2010; Mariani *et al.* 1990, Paddon & Hartley 1986). Los últimos avances en transformación genética de árboles tienen el foco en la liberación segura al medio de estos organismos (bioseguridad), para luego poder insertar otros genes de interés y evitar la transferencia de polen al medio. En este sentido, se han probado estrategias para promover la floración precoz y acortar los tiempos de los árboles para alcanzar la fase reproductiva no sólo para poder acelerar los programas convencionales de mejoramiento, sino también evaluar la transferencia vertical de genes para estudios de bioseguridad.

El objetivo general de este trabajo fue optimizar un sistema de modificación genética de álamos para la incorporación, en simultáneo, de genes de floración temprana y androesterilidad, acelerando el tiempo de obtención de líneas transgénicas dobles.

## Materiales y métodos

En este trabajo diferentes especies de álamo e híbridos fueron utilizados:

-*Populus. deltoides* (clones D6, D7 and D25), híbridos de *P. x canadensis* (clones DN1 and DN5)

-*Populus tremula* L. (clone W52) y *P. tremula* L. x *P. tremuloides* Michx (clone T89)

Cultivos *in vitro* de los clones e híbridos de *P. tremula* fueron proveídos por el Instituto Thünen (Großhansdorf/Alemania). Los cultivos *in vitro* de los clones de *P. deltoides* fueron preparados con material colectado en el Arboretum del Instituto Thünen.

Método de desinfección (*P. deltoides* e híbridos): El material vegetal de partida fueron yemas vegetativas apicales y secciones nodales. a – Lavado con hipoclorito de sodio 12 M (10%) con 3 gotas de tween 80, durante 10 minutos; b- Lavado con agua de la canilla esterilizada (cada yema y sección nodal individual) y remoción de la corteza externa de los explantos utilizando el binocular, con la ayuda de una pinza y bisturí nº5; c- Lavado con hipoclorito de sodio 12 M al 5 % durante 5 minutos; d- Repetición punto b.

Medio de cultivo: el medio WPM (McCown Woody Plant medium) fue utilizado para la regeneración de los tejidos de álamo. Fue suplementado con Thidiazuron (N-fenil-N-1,2,3, tiodiazol-5-il-urea). Esta fitohormona fue utilizada ya que tiene un efecto similar a las citoquininas (Lu 1993) y promueve el desarrollo de múltiples brotes en álamos (Bonga & von Aderkas 1992, Huetteman & Preece 1993).

-Vector de transformación A113. Constructo: HSP::*AtFT*. Cepa de agrobacteria (*Agrobacterium tumefaciens*): EHA105. Selección de plantas transformadas con kanamicina (NPT). Vector pK2GW7: promotor 35S-, promotor inducible con calor HSP-; terminador -35S (Gateway binary vector Karimi et al., 2002).

-Vector de transformación A249. Constructo: XY::*barnase*. Cepa de agrobacteria (*Agrobacterium tumefaciens*): GV2260. Selección en plantas kanamicina (NPTII). Vector PBI101:promotor XY específico de las anteras, promotor constitutivo nos-; terminador -nos.

Se realizaron 7 transformaciones genéticas dobles con *P. tremula*, utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* A113 (HSP::*AtFT*) y la agrobacteria A249 (XY::*barnase*) de forma simultánea en la etapa de co-cultivo.

Se realizaron 12 transformaciones genéticas dobles con *P. deltoides* y *P. x canadensis*, utilizando la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* A113 (HSP::*AtFT*) y la agrobacteria A249 (XY::*barnase*) de forma simultánea en la etapa de co-cultivo.

Las líneas transgénicas obtenidas fueron analizadas con PCR y Southern-Blots, previa extracción del ADN.

La inducción de la floración precoz se llevó a cabo con el constructo HSP::*AtFT*. Este sistema de floración precoz ha mostrado buenos resultados en álamos (Hoenicka et al., 2012, Zhang et al., 2010). Es por ello que para inducir el promotor, los álamos HSP::*AtFT* fueron sometidos a un tratamiento con calor “heat shock” (40°C durante 90 min/día), en cámaras climáticas (Hoenicka et al., 2016). Todas las plantas que igualaron o superaron una altura de 30cm y que se encontraban sanas en el invernadero fueron sometidas a este tratamiento, para la inducción de la floración.

El tratamiento con calor fue limitado hasta la aparición de las primeras estructuras florales. En promedio esto requiere de 4 a 6 semanas. Luego del tratamiento con calor, una vez obtenida la floración precoz, se aplicó el tratamiento de bajas temperaturas (11°/7° -día/noche), durante unas 4 a 8 semanas, con el fin de obtener un desarrollo normal de los granos de polen (Hoenicka et al., 2016). Se ha demostrado que las bajas temperaturas son el factor clave para el desarrollo de las flores fértiles en los álamos con floración precoz (Hoenicka et al., 2016).

Las anteras obtenidas en floración precoz se observaron bajo el microscopio óptico de fluorescencia (Olympus BH-2, Tokyo, Japan) para confirmar la presencia o ausencia de los granos de polen. Para evaluar y estimar la viabilidad de las microsporas se realizaron las pruebas FDA, realizando las tinciones con diacetato de fluoresceína (Wildholm, 1972).

## Resultados y discusión

El método de desinfección utilizado permitió obtener explantes libres de contaminantes para todos los clones de Deltoides y sus híbridos (Tabla 1).

Clones	Yemas			Secciones nodales		
	Total	Brotos		Total	Brotos	
DN 1	1	1	100%	34	27	79%
DN5	0	0	0%	21	5	23.8%
D6	1	1	100%	27	1	3.7%
D7	6	4	66.6%	54	0	0%
D25	1	1	100%	50	5	20.8%

Tabla 1. Resultado de la brotación In vitro de los diferentes clones de *P. deltoides* e híbridos.

Los mejores resultados fueron obtenidos a partir de secciones nodales, excepto en el caso de *P. deltoides* D7. Ha habido muy pocas publicaciones reportando datos de cultivo *in vitro* de híbridos de *P. deltoides* ya que esta especie de álamo y sus híbridos interespecíficos son conocidos por ser especialmente recalcitrantes a la regeneración *in vitro*. (Coleman and Ernst 1990; Sellmer *et al.*, 1989).

El 37% de las secciones nodales del clon D6 mostraron oxidación, mientras que para el caso de D7 el porcentaje fue de 35,2%. Sólo el 8% de las secciones nodales del clon D25 se oxidaron y en el caso de los clones DN1 y DN5 no se observó oxidación. Los clones D6 y D7 mostraron baja o nula brotación de los explantes desinfectados. Los brotes fueron individualizados y se colocaron en un nuevo medio para su enraizamiento.

El 90% de los brotes enraizaron en el medio 460 (WPM sin reguladores de crecimiento) a partir de los 25 días de cultivo. Los brotes cultivados en el medio 601 ¼, mostraron un 70% de enraizamiento, pero luego de los 30 días de cultivo. De esta manera se logró ajustar un método eficiente de regeneración de plantas *in vitro* de clones recalcitrantes de *Populus deltoides* y clones del híbrido *Populus x canadensis*. A partir de estas plantas regeneradas y cultivadas *in vitro*, se obtuvo el material necesario para realizar parte de las transformaciones genéticas posteriores.

Transformaciones con *P. tremula* L: De las 7 transformaciones de *P. tremula* L utilizando los constructos HSP::*AtFT* y XY::*Barnase*, se obtuvieron 121 líneas que crecieron en medio de selección. Los análisis con PCR confirmaron la obtención de 83 líneas transgénicas. De estas líneas 73 contienen sólo el gen de la floración, una línea contiene el gen *barnase* y 9 son líneas transgénicas dobles (Tabla 2): gen *FT* + gen *barnase*, incorporados de forma simultánea en la misma transformación.

Las plantas transformadas pasaron entre 3 y 5 meses en el invernáculo, hasta superar la altura de 30cm y poder ser trasladadas a las cámaras de crecimiento para inducir flores fértiles. La expresión del gen *AtFT* regulada por el promotor inducible con calor, permitió la inducción de la floración y el desarrollo normal de las plantas. Luego del tratamiento con calor, se obtuvieron flores en las plantas control-HSP::*AtFT*, cómo en las líneas con doble transformación (HSP::*AtFt* y XY::*barnase*). Por el contrario, como era de esperar, los controles negativos (plantas sin transformar), no presentaron floración alguna.

Luego del tratamiento con frío se evaluó la presencia o ausencia de polen en los controles y en las líneas transgénicas que contienen el constructo de floración temprana y el de constructo de androesterilidad. Se sometieron a este tratamiento 1 planta de la línea N430-11; 20 plantas de la línea N435.15; 2 plantas de la línea N430-11, 6 plantas de la línea N441-21, 2 plantas de N441-15 y los controles (líneas con el constructo de floración temprana: HSP::*AtFT*). Se pudo confirmar la presencia de polen en las anteras de los controles, mientras que las líneas

transgénicas dobles, portadoras del gen de androesterilidad tenían flores estériles. Es decir, carecían de polen o sólo tenían pocos granos de polen y a menudo deformados.

Clon	Línea	<i>AtFT</i>	HSP	<i>Barnase</i>	XY
W52	N430-4	+	+	+	+
W52	N430-11	+	+	+	+
W52	N430-19	+	+	+	+
W52	N435-15	+	+	+	+
W52	N435-33	+	+	+	+
W52	N441-1	+	+	+	+
W52	N441-7	+	+	+	+
W52	N441-15	+	+	+	+
W52	N441-21	+	+	+	+

Tabla 2. Resultados de las PCR de líneas transgénicas, con primers específicos para los genes *AtFT* y *barnase* y los promotores HSP y XY.

Clon	Línea	<i>AtFT</i>	<i>nptII</i>	<i>Barnase</i>	XY
DN1	N449-3	+	+	-	-
DN1	N449-5	+	+	-	-
D25	N452-2	+	+	-	-
D25	N452-3	+	+	-	-
D25	N452-4	+	+	-	-
DN1	N459-1	+	+	-	-
DN1	N459-3	+	+	-	-
DN1	N459-5	+	+	-	-
DN1	N459-6	+	+	-	-

Tabla 3. Resultados de las PCR de líneas transgénicas, con primers específicos para los genes *AtFT*, *nptII* y *barnase* y el promotor XY.

Transformaciones con *P. deltoides* e híbridos: De las 12 transformaciones dobles (*AtFT* + *barnase*) con *P. deltoides* y *P. x canadensis* se obtuvieron 21 regenerantes. De esas líneas, 9 fueron positivas en las PCR para el gen *AtFT* y el gen de selección (*nptII*) (Tabla 3). Todas las líneas obtenidas se desarrollaron normalmente. Los análisis moleculares pudieron confirmar la presencia de transgenes (Tabla 3). La evaluación de estas plantas todavía no ha finalizado. Flores en las plantas.

### Conclusiones

- La inducción temprana de la floración utilizando el constructo HSP::*AtFT* tiene un gran potencial para acelerar el mejoramiento genético de *P. tremula* y *P. deltoides*.

-Se pudo confirmar que el sistema HSP::*AtFT* permite evaluar rápidamente la funcionalidad de constructos genéticos para la reducción del flujo genético en álamos.