

HERRAMIENTAS PARA LA DOMESTICACIÓN DE MACROPTILIUM LATHYROIDES

Abelendo, Yemina

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (UNL-CONICET)

Directora: Karina Ribichich
Codirector: Juan Marcelo Zabala

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: explantos de nudos cotiledonares, crecimiento indeterminado, leguminosa.

INTRODUCCION

Las leguminosas constituyen un recurso forrajero valioso como fuente mayoritaria de proteína para el ganado y de bajo costo debido a su capacidad de fijar de nitrógeno por su interacción con rizobios del suelo. Las leguminosas silvestres subtropicales del género *Macroptilium* tienen alto potencial por desarrollarse en ambientes ganaderos del centro norte de Argentina, donde la alfalfa es marginal. En particular, se destaca *Macroptilium lathyroides* por sus condiciones nutricionales similares a la alfalfa y tolerar suelos moderadamente salinos y anegados (Cameron, 2005; Marinoni et al, 2019). Sin embargo, la retención de ciertos caracteres silvestres como el crecimiento indeterminado y la dehiscencia explosiva, limita su adopción por parte de los productores. Lograr el crecimiento determinado y la indehiscencia son dos objetivos primordiales del mejoramiento genético (Kwak et al., 2012; Li y Olsen, 2016) para favorecer la cosecha mecánica y conseguir la uniformidad de cosecha.

Macroptilium lathyroides es una especie diploide (Frahm & Leliveld, 1965), lo que simplifica la obtención de homocigotas. Esta especie carece de genoma secuenciado, no hay mutantes u otras herramientas de manipulación genética. Entonces, es necesario conocer los fenotipos y genes relacionados con el proceso y obtener protocolos de regeneración y transformación in vitro.

Su cercanía filogenética con *Phaseolus vulgaris*, cuyo genoma ha sido secuenciado y se encuentra disponible en bases de datos permite utilizarlo como referencia para identificar y caracterizar secuencias codificantes de genes asociados a la domesticación. La conservación de las secuencias de interés permite proyectar la obtención favorable de herramientas moleculares. Además, se estima que el genoma de *M. lathyroides* es un 60% similar al de *P. vulgaris* (Ayonoadu, 1974), lo que sugiere menor costo y complejidad para su secuenciación con vistas a aplicar edición génica.

Dado el potencial valor del género *Macroptilium*, contar con un protocolo de transformación permitirá su aplicación en otras especies forrajeras y el estudio de otros genes que contribuyan en su conservación o utilización en programas de mejoramiento.

Título del proyecto: Desarrollo de herramientas biotecnológicas para introducir mejoras en especies vegetales de interés agronómico.

Instrumento: CAI+D.

Año de la convocatoria: 2020.

Organismo financiador: Universidad Nacional del Litoral.

Directora: Carolina Attallah.

OBJETIVOS

El objetivo general es desarrollar herramientas que permitan domesticar leguminosas forrajeras silvestres tomando como modelo de estudio *Macroptilium lathyroides* y utilizando protocolos establecidos de regeneración *in vitro* a partir de nudos cotiledonares. Dentro de las herramientas propuestas, se encuentra la aplicación de un protocolo de transformación estable optimizado para *Macroptilium lathyroides* utilizando una o más cepas virulentas de *Agrobacterium tumefaciens*, transformadas con plásmidos que expresen genes reporteros. En simultáneo, se propuso caracterizar genes relacionados a la domesticación, basándose en cercanía filogenética de con *Phaseolus vulgaris* para utilizarla como genoma de referencia. En particular, se plantea analizar el homólogo de TFL1, un gen que controla el hábito de crecimiento determinado en las especies estudiadas, entre las que se encuentran leguminosas como *P. vulgaris* y la especie modelo de dicotiledóneas *Arabidopsis thaliana*.

METODOLOGÍA

Para los ensayos se utilizaron semillas de dos entradas provenientes del Banco de Germoplasma de especies nativas “Ing. Agr. José Mario Alonso” (cultivar Mancebo) de las especies *Macroptilium lathyroides* y *Macroptilium erythroloma*. *M. erythroloma* es una especie perenne de interés, cuya domesticación podría acompañar la de *M. lathyroides*. Ambas semillas se germinaron *in vitro* y se realizaron protocolos de extracción de explantos de nudos cotiledonares, siguiendo el protocolo establecido por Chingolani et al. (2018), a partir de los cuales se induce la formación de callos. Como primera prueba, se evaluó la respuesta intrínseca de los explantos al antibiótico de plantas higromicina, marcador de selección para experimentos posteriores. Establecida la concentración óptima de antibiótico, se procedió a realizar la transformación de los explantos con *Agrobacterium tumefaciens* (cepa GV3101). La cepa mencionada fue transformada con un plásmido pCAMBIA modificado (Capella et al, 2015), en el que se armó una construcción para expresar la proteína reportera fluorescente eGFP, utilizando un protocolo adaptado de Rahimi-Ashtiani (2015).

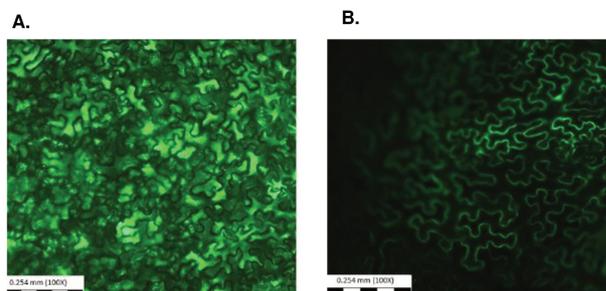
En simultáneo, utilizando plantas de *Macroptilium lathyroides* y *Phaseolus vulgaris*, se realizaron extracciones de ARN total de ápices vegetativos y reproductivos. Posteriormente, las muestras de ARNm se retro transcribieron para obtener la secuencia de ADN copia (ADNc) y amplificaron por PCR utilizando oligonucleótidos específicos para la secuencia codificante del gen homólogo a TFL-1 en estas especies (MITFL1 y PvTFL1). Los oligonucleótidos fueron diseñados realizando alineamientos múltiples de secuencias relacionadas filogenéticamente, seleccionando regiones conservadas y considerando posibles variaciones de nucleótidos. Las secuencias se clonaron en el plásmido pCAMBIA y se transformaron células competentes de DH5a. La confirmación de la inserción de la secuencia de interés se realizó mediante técnicas de PCR, corte por enzimas de restricción seguidos de electroforesis en gel y secuenciación. Además, se hicieron extracciones de ADN genómico y amplificaciones de las secuencias de los genes correspondientes por PCR.

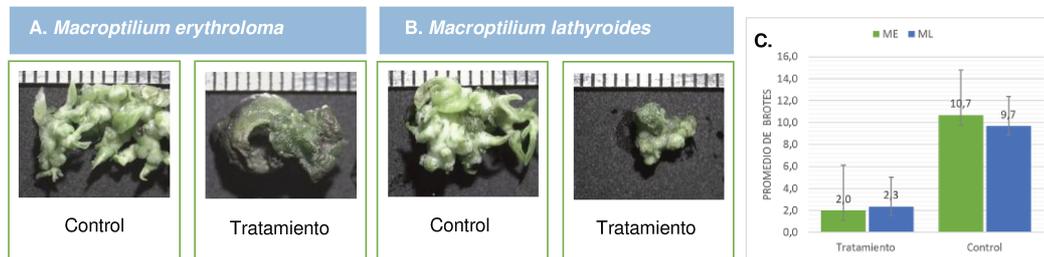
RESULTADOS/CONCLUSIONES

Los clones generados de la cepa GV3101 con el plásmido modificado que codifica eGFP, fueron testeados mediante expresión transitoria de hojas de *Nicotiana benthamiana* (Figura 1). Si bien se generaron clones de distintas cepas virulentas con este plásmido como EHA105, LBA4404 y AGL1, se seleccionó GV3101 para continuar con los ensayos, en función de sus características observadas (mejor crecimiento de bacterias y expresión de la proteína fluorescente de forma transitoria en tabaco).

En cuanto a los explantos, se seleccionó la concentración de 2 mg de higromicina/L de medio MS para continuar los repiques de callos y evaluar el porcentaje de brotes regenerados (% de BR). Hasta 50% de BR con el agente selectivo respecto del control, es un porcentaje deseable para iniciar un programa de transformación y selección. El recuento de brotes indicó 24 ± 11 y 19 ± 8 % de BR para *M. lathyroides* y *M. erythroloma* respectivamente (Figuras 2), por lo cual se decidió proseguir con los ensayos de transformación con *Agrobacterium* y realizar una primera selección con esta concentración de higromicina. Los ensayos de transformación de explantos con *Agrobacterium* se encuentran en curso. El clonado del ADNc y la reacción de secuenciación de la construcción pCAMBIA-PvTFL1, dio resultados positivos. Se obtuvieron dos clones, uno con idéntica secuencia a la usada por Repinsky et al (2012), quienes identificaron por primera vez la secuencia de PvTFL1 y otro con la secuencia de lo que podría ser en un nuevo alelo, que estimamos propio del cultivar utilizado. Contrariamente, no se obtuvieron clones positivos para pCAMBIA-MITFL1, lo cual creemos se debe a la baja expresión en el tejido meristemático. Por lo tanto, como se mencionó en la metodología, se procedió a la amplificación del ADN genómico y obtuvimos clones con amplicones del tamaño esperado, dos con pCambia-MITFL1 y uno con pCAMBIA-PvTFL. Las construcciones positivas obtenidas se usarán durante los ensayos de complementación de mutantes puntuales *tfl1* de *Arabidopsis thaliana* (*tfl-1* y *tfl-11*), ya propagadas cuya mutación fue verificada por secuenciación, para evaluar la homología funcional de MITFL1 comparada con la complementación del fenotipo producida por PvTFL1 usada como control.

Figuras 1. Imágenes de fluorescencia transitoria en *N. benthamiana*. Se muestra un ejemplo la construcción eGFP-pCAMBIA en la cepa GV3101 de *Agrobacterium*. En **A.** a campo claro y en **B.** con fluorescencia. Las imágenes fueron tomadas con microscopio Nikon de fluorescencia, a las 48 hs de la infiltración. Se puede observar en B la expresión de la proteína fluorescente en la membrana citoplasmática de las células de la hoja.





Figuras 2. En **A.** se muestran imágenes de los explantos de *Macroptilium erythroloma* y en **B.** los correspondientes a *Macroptilium lathyroides*. La primera columna de cada especie corresponde a un explanto creciendo en condiciones control, y su derecha se muestra un explanto expuesto al agente de selección higromicina con una concentración de 2 mg/L medio MS. Se observa una marcada reducción del tamaño y del número de brotes frente al tratamiento. En **C.** se grafica con barras los resultados de cuantificar el número de brotes generados por cada explanto en condiciones control y bajo el tratamiento de higromicina con una concentración de 2 mg/L de medio MS. En verde se muestra la especie ME: *Macroptilium erythroloma* y en azul ML: *Macroptilium lathyroides* y las barras de error calculadas con su desviación estándar.

BIBLIOGRAFÍA

- Ayonoadu UWU. 1974** Nuclear DNA variation in Phaseolus. Chromosoma 48: 41–49
- Cameron DG. 1985.** Tropical and subtropical legumes 8: Phasey bean (*Macroptilium lathyroides*). The predecessor of Siratro. Queensland Agric. J 111: 211-214.
- Capella M, Ribone PA, Arce AL, Chan RL. 2015.** Arabidopsis thaliana HomeoBox 1 (AtHB1), a HomeoDomain-Leucine Zipper I (HD-Zip I) transcription factor, is regulated by PHYTOCHROME-INTERACTING FACTOR 1 to promote hypocotyl elongation. New Phytol. 207(3):669-82.
- Chingolani F, Uberti N, Zabala JM. 2018.** Regeneración in vitro en el género *Macroptilium* (benth) urban. III Jornadas Regionales de Genética del Litoral, organizadas por la Sociedad Argentina de Genética y la Comisión Regional del Litoral de la SAG en la EEA INTA Rafaela
- Frahm-Leliveld JA. 1965.** Cytological observations in the genus Phaseolus L. Acta Bot. Neerlandica 14(1): 159-162
- Gioia T, Logozzo G, Kami J et al. 2012. Identification and Characterization of a Homologue to the Arabidopsis INDEHISCENT Gene in Common Bean. J Heredity 2013;104(2):273–286
- Kwak M, Toro O, Debouck DG and Gepts P. 2012.** Multiple origins of the determinate growth habit in domesticated common bean (*Phaseolus vulgaris*). Ann Bot 110:1573-1580.
- Repinsky SL, Kwak M, Gepts P et al. 2012.** The common bean growth habit gene PvTFL1y is a functional homolog of Arabidopsis TFL1. Theor Appl Genet 124:1539–1547
- Li LF and Olsen KM (2016)** To have and to hold: selection for seed and fruit retention during crop domestication. Curr Top Dev Biol 119:63-109.
- Rahimi-Ashtiani S, Sahab S, Panter S et al. 2015.** Clovers (*Trifolium* spp) Method Mol Biol 1223:325-35
- Marinoni L, Zabala JM, Taleisnik EL, Schrauf GE, Pensiero JF (2019)** Wild halophytic species as forage sources: key aspects for plant breeding, Grass For Sci. 74:321-344.