



NUEVAS METODOLOGÍAS APLICABLES A LA MEJORA DE LA ADAPTACIÓN DE LA VID AL ESTRÉS HÍDRICO

M.C. CUTANDA, P. CHATELET, A. BOUQUET¹, G. LOPEZ¹, P. IOCCO², M. THOMAS², O. BOTELLA³, F.J. MONTERO³ y L. TORREGROSA¹

¹UMR 1098 BEPC. Campus Agro-M/INRA. 2, place Pierre Viala. 34060 Montpellier 01 France

²CSIRO Plant Industry, GPO Box 350 Glen Osmond, SA 5064 Australia;

³Departamento de Producción Vegetal y Tecnología Agraria. E.T.S. Ingenieros Agrónomos. Universidad de Castilla-La Mancha. Campus Universitario s/n 02071-Albacete, Spain.

RESUMEN

La transformación genética de la vid podría ser una valiosa herramienta tanto para los estudios funcionales del genoma como para el cultivo de plantas, pero esta tecnología depende en gran medida del genotipo. El objetivo de este trabajo es, por tanto, adaptar la metodología existente de la transformación genética a las características de dos variedades de importantes vinos españoles como son el "Macabeo" y el "Tempranillo". Hemos enfocado nuestra atención a dos aspectos, que son el establecimiento de las condiciones óptimas de cultivo para obtener cultivos de células embriogénicas estables de anteras y regenerar plantas transformadas, y la construcción de vectores binarios de diferente resistencia y reporte de genes para evaluar la eficacia de la transformación. Para mejorar la formación del calli embriogénicos, se tuvieron en cuenta varios factores: el estado de desarrollo de las anteras, (tétradas o micro esporas uninucleares tempranas), el efecto de un tratamiento frío aplicado a la inflorescencia antes de la extracción de la antera, y tipo de medio de inducción que se diferencia principalmente en el nivel de los microelementos y las citocininas. Por otra parte, se crearon dos plásmidos que contenían los genes de resistencia kanamicina, hygromicina y eutipina con genes de reporte bien GUS o GFP, todo bajo el control de 2x35S CaMV, para comprobar la eficacia de la transformación genética. Se presentan los mapas de vectores binarios, los resultados relativos al porcentaje de anteras productoras de calis embriogénicos, el porcentaje de embrio-germinación y los tejidos transformados genéticamente.

ABSTRACT

Grapevine genetic transformation could be a valuable tool for both functional genomic studies and plant breeding, but this technology is highly dependant on genotype. The aim of this work is therefore to adapt the existing genetic transformation methodology to the characteristics of two important Spanish wine cultivars as 'Macabeo' and 'Tempranillo'. We have focused on two aspects, i.e. the establishment of optimal culture conditions to obtain stable embryogenic cell cultures from anthers and to regenerate transformed plants, and the construction of binary vectors with different resistance and reporter genes to test the efficiency of transformation. To improve the formation of embryogenic calli, several factors were evaluated: stage of anther development (tetrads or early uninucleate microspores), effect of a cold treatment applied to the inflorescence before anther extraction, and type of induction media differing mainly at microelements and cytokinins level. On the other hand, two plasmids which contain the kanamycin, hygromycin and eutypine resistance genes with either GUS or GFP reporter genes, all under the control of 2x35S CaMV promoter, were constructed to test genetic transformation efficacy. The maps of binary vectors and results concerning percentage of anthers producing embryogenic calli, the percentage of embryo germination, and genetically transformed tissues are shown.



Palabras Claves: *V. vinifera*, transgenic plants, *Agrobacterium*.

Keywords: *V. vinifera*, transgenic plants, *Agrobacterium*.

INTRODUCCIÓN

Estudios recientes sobre la vulnerabilidad de los ecosistemas al Cambio Climático en Europa, pronostican entre otros efectos, un aumento general de la temperatura y un descenso en la disponibilidad de agua, especialmente importante en la región Mediterránea (Schröter et al., 2005). Estos cambios pueden afectar negativamente a la actividad agraria de esta zona, y en particular, a un sector tan importante como el vitivinícola. En este contexto, el mantenimiento de la calidad exigirá la mejora de la adaptación del material vegetal a estas condiciones, y para conseguirlo, resultará necesario profundizar en el conocimiento de la respuesta al estrés hídrico en *V. vinifera*, y avanzar en la puesta a punto de metodologías que permitan integrar ese conocimiento en los programas de mejora, de una manera rápida y eficiente. La biología molecular y la biotecnología ofrecen nuevas herramientas para abordar estos estudios, y entre ellas, la transformación genética puede resultar útil tanto en la caracterización funcional de genes relacionados con la tolerancia al estrés hídrico en vid (Cramer et al., 2006; Tesniere et al., 2006), como en los programas de mejora (Legrand et al., 2003; Vidal et al., 2006). Sin embargo, esta técnica presenta ciertas especificidades en la vid, como que la producción de callos embriogénicos y la eficiencia de transformación son altamente dependientes del genotipo (Perrin et al., 2004; Torregrosa et al., 2002). El objetivo de este trabajo es la adaptación de la metodología existente, para la obtención de plantas transgénicas de dos cultivares de vid españolas, Macabeo y Tempranillo, como paso preliminar en un proyecto de caracterización molecular de la respuesta al estrés hídrico en vid. El estudio se ha focalizado en dos aspectos, el establecimiento de las condiciones óptimas para obtener una alta eficiencia en la iniciación y regeneración de callos embriogénicos a partir de anteras, y la construcción de vectores binarios con diferentes genes de resistencia y genes reporteros para evaluar la eficiencia de transformación por *Agrobacterium*. Se presentarán los mapas de los nuevos vectores, los porcentajes de anteras que producen callos embriogénicos, el porcentaje de germinación de embriones y los primeros resultados de transformación genética.

MATERIAL Y MÉTODOS

Sarmientos de *Vitis Vinifera* L. cv. Macabeo (cl. 630) y cv. Tempranillo (cl. 771), obtenidos del ENTAV (Grau-du-Roi, France), fueron procesados según el método descrito en Torregrosa (1998) para obtener inflorescencias inmaduras. Cuando las primeras inflorescencias mostraron flores separadas (6 semanas), se verificó el estado de desarrollo de las anteras mediante tinción con carmín-acético. El estado de tétradas se consideró como estado de desarrollo D1, y la microspora unicelular recién formada como estado de desarrollo D2. Las inflorescencias fueron esterilizadas en grupos de 8 a 10 y tras la esterilización se dividieron en dos partes. Una parte se dedicó al cultivo directo de las anteras y la otra se mantuvo a 4°C durante 48h antes de la siembra. Para testar la reproducibilidad del experimento se repitió la siembra una semana después. Las anteras se extrajeron con el filamento, y se colocaron con la cara abaxial sobre los medios de inducción C₁^P (Torregrosa, 1998) ó B2 (Perrin et al., 2004). La unidad experimental fue una placa Petri de 55x10 mm, con 10 ml de medio de cultivo, 25 anteras, sellada con scellofrais® e incubada a 26 ± 1°C en la oscuridad. Cada tratamiento estuvo representado por 10 placas (250 anteras). Los explantes se mantuvieron sobre el mismo medio durante el proceso de inducción (45 días). Una vez obtenidos los callos embriogénicos todos se subcultivaron en medio C₁^P cada 4-5 semanas para su estabilización y mantenimiento (Torregrosa, 1998). Para la regeneración de plantas, los callos embriogénicos se transfirieron a medio GS1CA sin IAA (Franks et al., 1998) y se mantuvieron hasta la obtención de embriones individuales en

estado de torpedo-corazón. En Macabeo este proceso se completa en 4-5 semanas, mientras que en Tempranillo son necesarias entre 8-10 semanas y un subcultivo en medio GS1CA fresco. Una vez alcanzado este estado, los embriones fueron transferidos a medio MS/2 y cultivados según Torregrosa (1998) hasta el desarrollo de plantas de aspecto normal. Esta última etapa se desarrolla de manera similar en los dos cultivares.

Dos nuevos vectores binarios, p1302HKE and p1305.1HKE, se construyeron a partir de pCAMBIA-1302 y pCAMBIA-1305.1 (CAMBIA, Canberra, Australia) respectivamente (Fig. 1). La cassette NOS-NPTII-NOS fue extraída del plásmido pBINm-gfp-5ER (Haseloff et al., 1997) y subclonada en el sitio de restricción BstXI. De manera similar, la cassette 2x35S-VRERE-Tnos, que contiene el gen de resistencia a la eutipina de *Vigna radiata*, fue extraída del plásmido pBC35S2-VRERE-Tnos (Legrand *et al.*, 2003) y subclonada en el sitio de restricción HindIII. La cepa EHA105 de *Agrobacterium* se transformó por electroporación con estos vectores para obtener las cepas EHA105 p1302HKE y EHA105 p1305.1HKE respectivamente. Los primeros ensayos de transformación genética de Macabeo con estas cepas se realizaron siguiendo el protocolo optimizado para el cultivar Portan (Torregrosa et al., 2002).

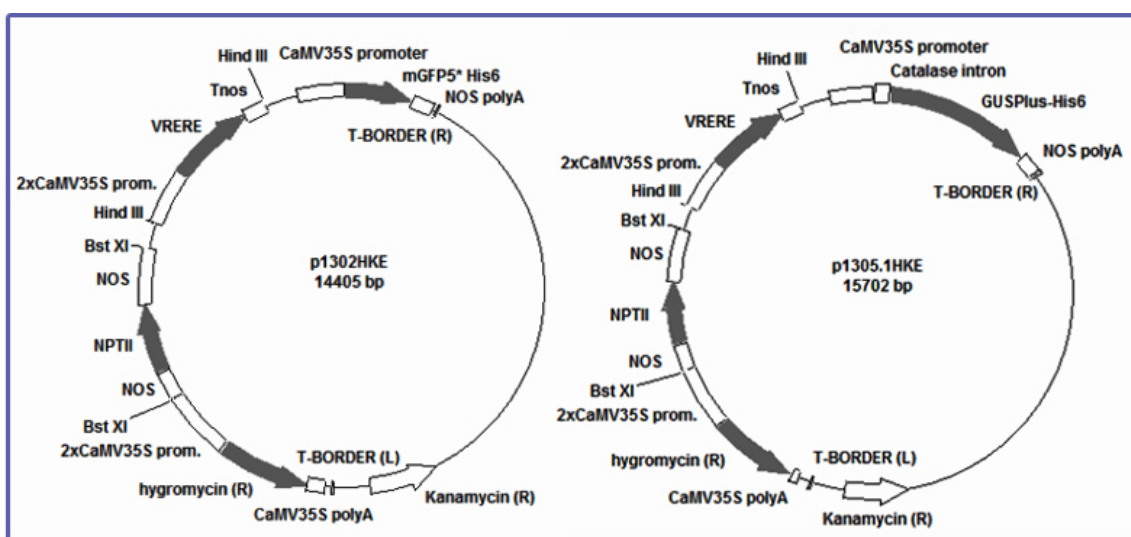


Figura 1. Nuevos vectores binarios p1302HKE y p1305.1HKE para la transformación genética estable de plantas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La figura 2 muestra la respuesta de las anteras ante las diferentes condiciones de cultivo evaluadas. En general, el tratamiento de frío aplicado a las inflorescencias no mejora la embriogénesis, pero si es necesario aplicarlo, los mejores resultados de ambos genotipos se obtienen sembrando las anteras en medio de inducción B2. Sin embargo, un porcentaje mayor o igual de callos embriogénicos se obtienen sembrando las anteras directamente en medio de inducción C₁^P. Este medio presenta una ventaja importante porque sirve tanto para la inducción de como para el mantenimiento de los callos embriogénicos. En los dos cultivares, el porcentaje total de callos no mostró una correlación directa con el porcentaje de callos embriogénicos en las mismas condiciones. Curiosamente, mientras el porcentaje de callos obtenidos fue similar en la repetición, realizada a partir de nuevas inflorescencias obtenidas del mismo material una semana después, la embriogénesis descendió significativamente, sobretodo en Tempranillo. Esto sugiere la selección de las primeras inflorescencia que se desarrollan, al menos cuando se utiliza este sistema. Aparte de estas observaciones generales, Tempranillo ha resultado mucho más recalcitrante que Macabeo sobretodo en la

producción de callos embriogénicos bajo todas las condiciones testadas. Específicamente, el estado de desarrollo de las anteras no afectó la embriogénesis en Macabeo, sin embargo, la elección del estado de desarrollo más apropiado puede ser determinante para obtener callos embriogénicos de Tempranillo. Desde un punto de vista práctico, un mismo protocolo puede ser utilizado para obtener callos embriogénicos de Macabeo y de Tempranillo, seleccionando las primeras inflorescencias con anteras en estado de desarrollo de microspora unicelular, extrayendo las anteras inmediatamente después de la recogida y esterilización de las inflorescencias, y sembrando directamente en medio C_1^P . El subcultivo en C_1^P cada 4-5 semanas es adecuado para la conservación de los callos embriogénicos de los dos cultivares. Con el protocolo empleado para la regeneración de plantas, el porcentaje de germinación de los embriones de Macabeo ha sido del 75% y el de los embriones de Tempranillo del 60%. Estas características y los primeros ensayos de transformación genética, sugieren la posibilidad de obtener una alta eficiencia de transformación en estos cultivares (Figura 3).

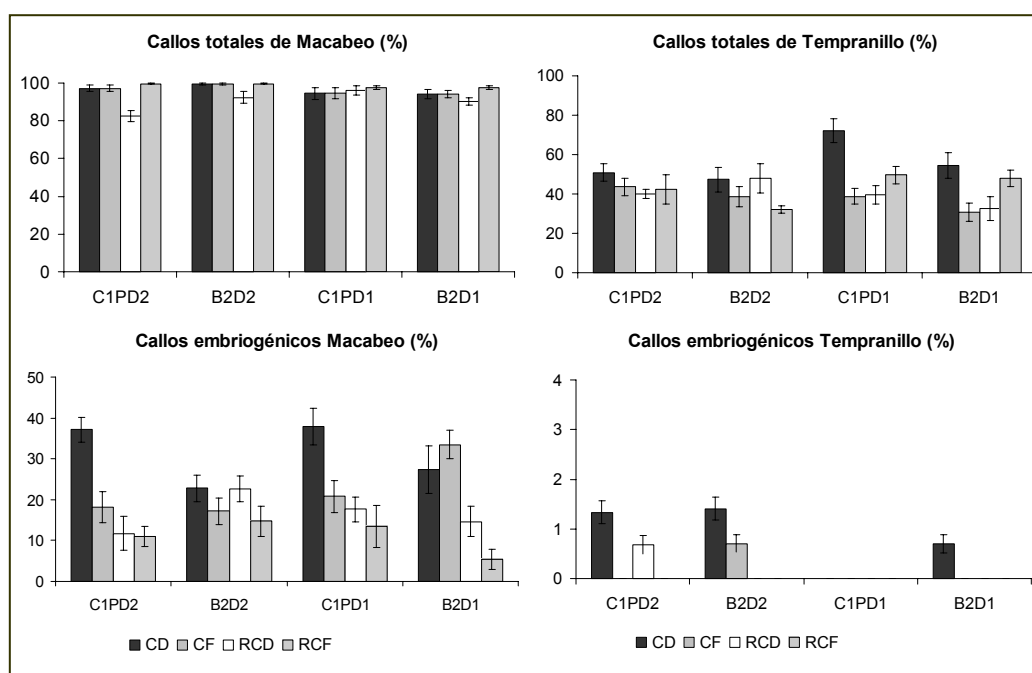


Figura 2. Porcentaje de callos totales y callos embriogénicos obtenidos a partir de anteras de Macabeo y de Tempranillo. Estado de desarrollo de las anteras: D1 tétradas, D2 microspora uninuclear. CD: Cultivo directo tras la esterilización de las anteras; CF: cultivo de anteras tras 48h a 4°C. RCD y RCF: Repetición de CD y CF una semana después. Los valores representan la media del porcentaje en 10 placas \pm DS.

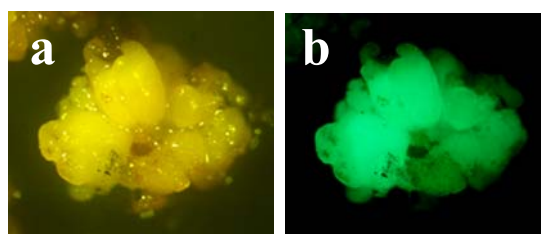


Figura 3. Expresión de la proteína GFP en embriones de Macabeo transformados con la cepa de *Agrobacterium* EHA105 p1302HKE y seleccionados en higromicina. Bajo luz blanca (a) y bajo luz uv (b).



CONCLUSIONES

Este estudio propone un protocolo para obtener y conservar callos embriogénicos de Macabeo y de Tempranillo capaces de producir embriones somáticos y adecuados para utilizar en experimentos de transformación genética. Nuevos vectores binarios han sido también contruidos para testar la eficiencia de transformación por *Agrobacterium*. La combinación de los genes de resistencia y los genes reporteros en estos vectores permitirá comparar la selección de embriones transgénicos en kanamicina, higromicina y diferentes análogos de la eutipina. Actualmente, plantas transgénicas de Macabeo están siendo regeneradas, y callos embriogénicos de Tempranillo están siendo multiplicados para realizar los primeros ensayos de transformación genética.

Agradecimientos

Este estudio ha sido financiado por el Instituto de la Vid y el Vino de Castilla-La Mancha, la Consejería de Educación y Ciencia de la Junta de Comunidades de Castilla-La Mancha, (IVICAM) y el Fondo Social Europeo.

BIBLIOGRAFÍA

- Cramer *et al.* (2006) Water and salinity stress in grapevines: early and late changes in transcript and metabolite profiles. *Funct. Integr. Genomics* (on line).
- Franks *et al.* (1998) Regeneration of transgenic *Vitis vinifera* L. Sultana plants: genotypic and phenotypic analysis. *Molecular Breeding* 4:321-333.
- Haseloff *et al.* (1997) Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 94: 2122-7.
- Legrand *et al.* (2003) Constitutive expression of Vr-ERE gene in transformed grapevines confers enhanced resistance to eutypin, a toxin from *Eutypa lata*. *Plant Science*, 164:809-814.
- Perrin *et al.* (2004) High efficiency initiation of regenerable embryogenic callus from anther filaments of 19-grapevine genotypes grown worldwide. *Plant Science*, 164:809-814.
- Schroter *et al.* (2005) Ecosystem service supply and vulnerability to global change in Europe. *Science*. 310:1333-7.
- Tesniere C, Torregrosa L, Pradal M, Souquet JM, Gilles C, Dos Santos K, Chatelet P, Gunata Z. (2006) Effects of genetic manipulation of alcohol dehydrogenase levels on the response to stress and the synthesis of secondary metabolites in grapevine leaves. *J Exp Bot.* 57: 91-99.
- Torregrosa, L. (1998) A simple and efficient method to obtain stable embryogenic cultures from anthers of *Vitis vinifera* L. *Vitis*, 37:91-92.
- Torregrosa *et al.* (2002) Influence of *Agrobacterium* strain, culture medium, and cultivar on the transformation efficiency of *Vitis vinifera* L. *Am. J. Enol. Vitic.* 53:183-190.
- Vidal JR, Kikkert JR, Malnoy MA, Wallace PG, Barnard J, Reisch BI. (2006) Evaluation of transgenic 'Chardonnay' (*Vitis vinifera*) containing magainin genes for resistance to crown gall and powdery mildew. *Transgenic Res.* Feb; 15(1):69-82.

Recibido: Abril 2007

Aceptado: Julio 2007

NDLR: Trabajo presentado en el Congreso sobre Clima y Viticultura (CONCLIVIT) 10 al 14 de Abril de 2007, Zaragoza – España.

Si desea contactarse con alguno de sus autores comuníquese a enologia@revistaenologia.com