

**UNIVERSIDAD DE CONCEPCIÓN
FACULTAD DE AGRONOMÍA
MAGÍSTER EN CIENCIAS MENCIÓN PRODUCCIÓN VEGETAL**



EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE VID

(*Vitis vinifera* L.)

POR

SUSAN INGRID ARAYA SALAS

**TESIS PRESENTADA A LA ESCUELA DE
GRADUADOS DE LA UNIVERSIDAD DE
CONCEPCIÓN PARA OPTAR AL GRADO
DE MAGÍSTER EN CIENCIAS MENCIÓN
PRODUCCIÓN VEGETAL**

CHILLÁN – CHILE

2006

EMBRIOGENESIS SOMATICA Y TRANSFORMACION GENETICA DE VID (*Vitis vinifera* L.)

SOMATIC EMBRYOGENESIS AND GENETIC TRANSFORMATION OF GRAPEVINE (*Vitis vinifera* L.)

Palabras índice adicionales:

Uva de mesa, 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), BAP (6-bencilaminopurina), ANA (ácido α -naftalén acético), NOA (ácido 2-naftoxiacético), TDZ (Tidiazurón), *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404, EHA105, GV3101, GFP (Proteína Verde Fluorescente)

RESUMEN

Para la transformación genética de vides, es necesario establecer un sistema altamente eficiente de regeneración de plantas a partir de tejido vegetal. La embriogénesis somática es una de las técnicas de cultivo *in vitro* más utilizadas para alcanzar dicho objetivo. En la presente investigación se estableció un protocolo para la producción de embriones somáticos de los cultivares Red Globe y Flame Seedless. El callo embriogénico fue inducido a partir de yemas apicales, axilares y estambres. Las yemas fueron incubadas en un medio Nitsch y Nitsch modificado y suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido α -naftalén acético (ANA) y 6-bencilaminopurina (BAP). Los estambres fueron incubados en el medio Murashige y Skoog (MS) modificado y suplementado con diferentes concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2-naftoxiacético (NOA), N-(1,2,3-tidiazol-5yl)-N-fenilurea o tidiazurón (TDZ) y 6-bencilaminopurina (BAP). Además, embriones somáticos del cultivar Thompson Seedless fueron transformados con tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404, EHA105 y GV3101, conteniendo el plásmido pBINm-gfp5-ER que porta los genes marcadores *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) y *gfp* (Green Fluorescent Protein). En todos los ensayos se utilizó un diseño experimental completamente aleatorio. El cultivar Red Globe fue el más competente para formar callo embriogénico obteniéndose un 31% de embriogénesis somática. En embriones somáticos formados a partir de yemas apicales y axilares del cv. Thompson Seedless, para el genotipo G1, se obtuvo un

80% de transformación genética estable con la cepa GV3101, 32% con EHA105 y 1% con LBA4404. En cambio, para el genotipo T2 se logró 64% con la cepa GV3101, con EHA105 14% y un 3% con la cepa LBA4404, demostrándose la integración de los genes *gfp* y *nptII* en células de embriones del cultivar Thompson Seedless, mediante la visualización de fluorescencia de color verde y la resistencia a kanamicina. En general, la respuesta a transformación genética fue dependiente del genotipo.

SUMMARY

For the genetic transformation of grapevines, it is necessary to establish a highly efficient system of *in vitro* plant regeneration. The somatic embryogenesis is one of the *in vitro* techniques most utilized to reach this objective. A protocol for the production of somatic embryos of the Red Globe and Flame Seedless grape cultivars was established. The embryogenic callus was induced from apical buds, axillary buds and stamens. The buds were incubated in a modified Nitsch and Nitsch medium supplemented with different concentrations of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), α -naphthalene acetic acid (NAA) and 6-benzyladenine (BAP). The stamens were incubated in a modified Murashige and Skoog (MS) medium and supplemented with different concentrations of 2,4 dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D), 2-naphthoxy acetic acid (NOA), N 1,2,3-thiadiazol-5yl)-N-phenylurea or thiazuron (TDZ) and 6-benzyladenine (BAP). Three strains of *Agrobacterium tumefaciens*, LBA4404, EHA105 and GV3101, harboring the pBINm-gfp5-ER plasmid were used for the transformation of somatic embryos of Thompson Seedless cultivar. The plasmid pBINm-gfp5-ER contains the selectable marker genes *nptII* (neomycin phosphotransferase II) and *gfp* (green fluorescent protein). The Red Globe cultivar was the most competent for embryogenic callus formation, reaching a 31% of somatic embryogenesis. With somatic embryos formed from apical and axillary buds of Thompson Seedless cultivar, genotype G1, 80% of genetic transformation was obtained with GV3101 strain, 32% with EHA105 and 1% with LBA4404. The efficiency of genetic transformation of the genotype T2 was 64% using the GV3101 strain, 14% with EHA105 and 3% with