

Producto 1. Protocolo: Aislamiento y transfección de protoplastos para Edición Génica

Sergio Feingold, Gabriela Massa, Cecilia Décima Oneto y Matías González.



Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria

Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca



Ministerio de Economía
Argentina



Códigos JEL: Q16

ISBN:

FONTAGRO (Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria) es un mecanismo único de cooperación técnica entre países de América Latina, el Caribe y España, que promueve la competitividad y la seguridad alimentaria. Las opiniones expresadas en esta publicación son de los autores y no necesariamente reflejan el punto de vista del Banco Interamericano de Desarrollo (BID), del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA), FONTAGRO, de sus Directorios Ejecutivos ni de los países que representan.

El presente documento ha sido preparado por Gabriela Massa, Cecilia Décima Oneto, Matías Nicolás González y Sergio Feingold.

Copyright © 2023 Banco Interamericano de Desarrollo. Esta obra se encuentra sujeta a una licencia Creative Commons IGO 3.0 Reconocimiento-NoComercial- SinObrasDerivadas (CC-IGO 3.0 BY-NC-ND) (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/3.0/igo/legalcode>) y puede ser reproducida para cualquier uso no comercial otorgando el reconocimiento respectivo al BID. No se permiten obras derivadas. Cualquier disputa relacionada con el uso de las obras del BID que no pueda resolverse amistosamente se someterá a arbitraje de conformidad con las reglas de la CNUDMI (UNCITRAL). El uso del nombre del BID para cualquier fin distinto al reconocimiento respectivo y el uso del logotipo del BID no están autorizados por esta licencia CC-IGO y requieren de un acuerdo de licencia adicional. Note que el enlace URL incluye términos y condiciones adicionales de esta licencia.

Esta publicación puede solicitarse a:

FONTAGRO

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org

www.fontagro.org



Tabla de Contenidos

Tabla de contenido

Resumen	4
Abstract.....	5
Introducción.....	6
Objetivos.....	8
Descripción del protocolo	9
Descripción del trabajo de Capacitación.....	16
Discusión	16
Conclusiones	17
Referencias Bibliográficas.....	18
ANEXO I. Composición medios de cultivo <i>in vitro</i>	19
ANEXO II. Cuerpo docente y Participantes de la Capacitación	28



Resumen

La edición génica constituye uno de los avances más notables de la biotecnología moderna en la modificación del ADN de las células eucariotas, permitiendo la introducción de inserciones o deleciones, la sustitución de fragmentos, la introducción de nuevo material genético de forma dirigida, e incluso la modificación de secuencias a nivel de nucleótidos individuales.

Se estima que esta técnica puede reducir drásticamente los tiempos del mejoramiento y producir una ventaja radical en la generación de animales y plantas mejoradas, debido a su menor costo y mayor accesibilidad. Además, en cultivos de reproducción agámica como la papa, el banano, la yuca, la caña de azúcar o la vid, entre otros, la utilización de la edición génica puede modificar sustancialmente el esquema de los programas de mejoramiento, ya que permitiría realizar mejoras incrementales sobre genotipos establecidos y adaptados (élite).

Esta tecnología se basa en la acción de una nucleasa (enzima que corta ADN doble cadena) guiada por una hebra de ARN que por complementariedad de bases actúa sobre un gen o secuencia específica. Uno de los cuellos de botella de la edición génica es la introducción de esta maquinaria ribo-núcleo-proteica (RNP) dentro de una célula y la posterior regeneración de una planta completa a partir de la o las células editadas.

Este protocolo se centra en estos dos aspectos clave para la edición de papa a partir del aislamiento y transfección de protoplastos.

Palabras Clave: Papa, protoplastos, CRISPR/Cas9, expresión transitoria, edición génica.



Abstract

Gene editing constitutes one of the most notable advances in modern biotechnology for the modification of the DNA of eukaryotic cells, allowing the introduction of insertions or deletions, the substitution of fragments, the introduction of new genetic material in a targeted manner, and even the modification of sequences at the individual nucleotide level.

It is estimated that this technique can drastically reduce breeding times and produce a radical advantage in the generation of improved animals and plants, due to its lower cost and greater accessibility. In addition, in agamic reproduction crops such as potatoes, bananas, cassava, sugar cane or vines, among others, the use of gene editing techniques can substantially modify the scheme of breeding programs, as it would allow incremental improvements over established and adapted (elite) genotypes.

This technology is based on the action of a nuclease (enzyme that cuts double-stranded DNA) guided by an RNA strand that, due to base complementarity, acts on a specific gene or sequence. One of the bottlenecks of gene editing is the introduction of this ribo-nucleo-protein (RNP) machinery into a cell and the subsequent regeneration of a complete plant from the edited cell(s).

This protocol focuses on these two key aspects for potato editing from the isolation and transfection of protoplasts.


Keywords: Potato, protoplasts, CRISPR/Cas9, transient expression, gene editing.

Introducción

La selección de genotipos superiores -plantas o animales– depende de la existencia de diversidad genética. La variabilidad genética natural generada a lo largo de la evolución como producto de mutaciones, poliploidización y recombinación genética ha sido aprovechada por los programas de mejoramiento genético con el objetivo de generar materiales adaptados a la producción agrícola. Sin embargo, en algunos cultivos esta variabilidad se ha ido reduciendo como consecuencia inevitable de la selección de individuos con características favorables. Distintas tecnologías han posibilitado la reintroducción de variabilidad a partir de cruzamientos (intra- o inter-específicos e intergénicos), la inducción de mutaciones y, más recientemente, la ingeniería genética. Estas técnicas son herramientas básicas en el mejoramiento porque contribuyen a enriquecer el sustrato sobre el que se ejerce la selección antrópica.

Hace más de 20 años la ingeniería genética abrió la posibilidad de superar las barreras a la hibridación para incorporar genes provenientes de cualquier organismo, incluso de diferentes reinos, generando organismos genéticamente modificados (OGM) también denominados transgénicos. Desafortunadamente, esta técnica no ha rendido todo su potencial. Probablemente, los principales factores que pueden explicar este hecho son: i) la existencia de genotipos o especies recalcitrantes para ser transformados o regenerados *in vitro*, ii) la aleatorización en el genoma del sitio y el número de copias de los transgenes, con efectos de posición impredecibles, iii) la limitación en los caracteres (“traits”) objeto de la transformación difundidos para su uso (principalmente, tolerancia a herbicidas y a insectos), y iv) el estricto, largo y costoso proceso de desregulación para habilitar la comercialización de OGM (Nahirñak *et al.*, 2022). Sin embargo, a pesar de los estrictos requerimientos regulatorios, los transgénicos no han podido evitar una percepción pública adversa en ciertos ámbitos.

Recientemente, surgió una nueva herramienta basada en ingeniería genética, denominada Edición Génica (EG). La EG posee el potencial de realizar modificaciones en la secuencia de ADN dirigidas a genes específicos para alterar su expresión (silenciarlos o sobre-expresarlos), reemplazar alelos (introduciendo alelos favorables) o introducir transgenes en sitios específicos del genoma. En los



primeros dos casos, la EG no incorpora secuencias foráneas de ADN por lo que los productos desarrollados por EG son indistinguibles de los generados por mejoramiento convencional.

La introducción transitoria de la maquinaria de edición génica en su forma de ribo-nucleo-proteína aumenta sensiblemente las probabilidades de generar cambios deseados en el genoma de plantas y animales sin incorporación de secuencias foráneas, lo que determina que las variedades y razas obtenidas estén bajo una regulatoria similar a la de los desarrollos obtenidos por mejoramiento convencional según la normativa vigente en muchos países de la región.

Objetivos

- Extraer protoplastos desde plántulas de papa cv. Spunta y cv. Atlantic.
- Transfectar protoplastos de papa cv. Spunta con ribonucleoproteínas (RNP) dirigidas a los genes de polifenol oxidasa e invertasa vacuolar.
- Transfectar protoplastos de papa cv. Atlantic con vector CRISPR/Cas9 dirigido al gen de la invertasa vacuolar.
- Regenerar plántulas de papa a partir de protoplastos de papa cv. Spunta y cv. Atlantic transfectados.

Descripción del protocolo

El aislamiento y transfección de protoplastos y la subsiguiente regeneración de plantas completas se realizó utilizando las soluciones y métodos descritos en el protocolo de Nicolía *et al.* (2015) con modificaciones (González *et al.*, 2019; González *et al.*, 2021; González, 2021)

1- Transferir 4 ápices de plantas provenientes de cultivo *in vitro* a una caja tipo Magenta conteniendo 50 mL de medio MS30 (Anexo I). Preparar un total de 5 cajas (20 ápices) y cultivarlas en cámara de cultivo estándar, a una temperatura constante de 21°C y un fotoperiodo controlado automáticamente de 16 horas luz (80 $\mu\text{E m}^2 \text{s}^{-1}$) y 8 horas oscuridad.

2-Tomar hojas jóvenes de plántulas de 4 o 5 semanas (depende del genotipo) de cultivo *in vitro* hasta obtener aproximadamente 1 g de material vegetal fresco por aislamiento (20-30 hojas).

3- Transferir las hojas seleccionadas con la cara abaxial hacia abajo a una placa de Petri con 20 mL de medio B (Anexo I). Sellar la placa utilizando film de laboratorio e incubar a 4°C y en oscuridad por 24 horas, para permitir la metabolización de los gránulos de almidón de las hojas, y evitar así rupturas de los protoplastos durante el aislamiento (Zuba y Binding, 1989).



4- Retirar las hojas de la placa de Petri y colocarlas sobre una placa de vidrio conteniendo unas gotas (aproximadamente 5 mL) de medio B, para evitar su deshidratación.

5-Realizar cortes en las hojas para obtener tiras de 1-2 mm utilizando una hoja de afeitar y transferir las tiras a una nueva placa de Petri conteniendo 10 mL de medio B.



6- Una vez colocadas todas las tiras de hojas en esta placa, remover el medio B con pipeta y agregar 20 mL de solución de plasmólisis (Anexo I).

7- Incubar la placa a temperatura ambiente y en oscuridad, por 30 minutos.

8- Retirar la solución de plasmólisis con pipeta y añadir 25 mL de medio C (Anexo I), sellar la placa con film de laboratorio e incubar a 25°C y en oscuridad, durante 14 horas.

9- Al día siguiente colocar la placa en un agitador orbital a velocidad de 5 rpm, durante 30 minutos para facilitar la liberación de los protoplastos o en su defecto agitar suavemente con la mano.

10- Tomar la suspensión suavemente con pipeta desde la placa de Petri y trasvasar a un tubo para centrifuga de 50 mL, a través de dos filtros colocados en tándem (de 100 y 70 μm de tamaño de poro, respectivamente) para eliminar el tejido no digerido.

11- Lavar los filtros con 10 mL de solución de lavado (Anexo I) para obtener los protoplastos remanentes.

12- Trasvasar el filtrado a 4 tubos para centrifuga de 15 mL (aproximadamente 8 mL de filtrado por tubo), y llevar cada tubo a volumen máximo con solución de lavado.

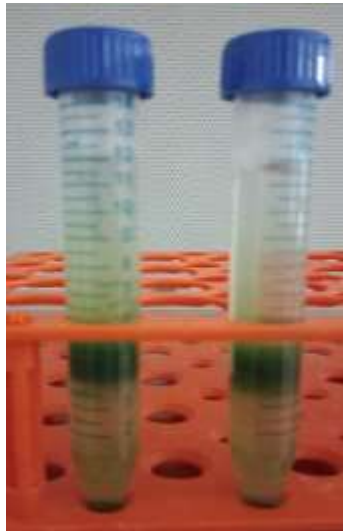
13- Centrifugar a temperatura ambiente a velocidad de 50 RCF durante 5 minutos, utilizando aceleración y desaceleración mínimas.

14- Eliminar los sobrenadantes con pipeta, y se resuspender suavemente los pellet de protoplastos en 2 mL de solución de lavado (esto debe realizarse muy suavemente, evitando llevar el líquido hasta la tapa, se debe tardar entre 1,5 y 2 hs).

15- Preparar 2 tubos para centrifuga de 15 mL con 6 mL de solución de sacarosa (Anexo I).

16- Transferir suavemente con pipeta la suspensión de protoplastos sobre la solución de sacarosa, procurando no alterar la interfaz formada entre ambas soluciones. Este procedimiento se repite hasta completar un máximo de 6 mL de suspensión de protoplastos por cada tubo con solución de sacarosa.

17- Centrifugar los tubos a velocidad de 50 RCF durante 15 minutos, utilizando aceleración y desaceleración mínimas. Transcurrido este tiempo, se debe visualizar una banda gruesa de color verde oscuro en la interfaz de soluciones de cada tubo (esta contiene los protoplastos intactos).



18- Tomar las bandas con una pipeta y transferir a un único tubo para centrifuga de 15 mL conteniendo 6 mL de solución de transformación 1 (Anexo I).

19- Una vez transferidos todos los protoplastos, tomar una alícuota de 20 μ L de la suspensión resultante para realizar la cuantificación, almacenar el tubo conteniendo el resto de los protoplastos a 4°C y en oscuridad.

20- Determinar el número total de protoplastos utilizando una cámara de recuento celular Neubauer en un microscopio.

NOTA: Se debe hacer un recuento en cada cuadrante 4x4 de la cámara. Registrar los 4 valores obtenidos y sacar el promedio. CÁLCULOS: A) promedio * 10000 (esto puede variar según la

cámara utilizada), B) valor del cálculo de $A \times$ volumen total de la resuspensión de los protoplastos, C) valor del cálculo de $B / 1.000.000$: μL que se necesitan utilizar de TRANSF.BUFFER

2 EJEMPLO:

Recuento: Cuadrante1: 10pps; Cuadrante2: 12pps; Cuadrante3: 12pps, Cuadrante4: 8pps.

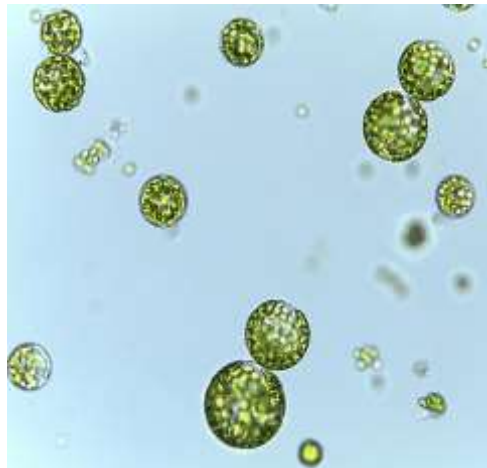
PROMEDIO: $42/4 = 10.5$ pps

VOLUMEN de nuestra cámara: $0.1000\text{mm} \times 0.0025\text{ mm}^2 = 10000\text{mm}^3$

A) $10.5 \times 10000\text{ ml} = 105.000\text{ pps/ml}$

Volumen de resuspensión (en buffer de transformación 1): 11,5 ml B) $105.000\text{ pps/ml} \times 11,5\text{ ml} = 1.207.500\text{ pps}$ totales


C) $1.207.500\text{ pps} / 1.000.000 = 1,207\text{ ml}$ por lo tanto se debe resuspender en 1,207 ml (1207 μL) de BT2. Saldrán 12 transfecciones.



21- Centrifugar el tubo con la suspensión a temperatura ambiente a velocidad de 50 RCF durante 5 minutos, utilizando aceleración y desaceleración mínimas.

22- Eliminar el sobrenadante del tubo y resuspender suavemente el pellet de protoplastos en el volumen apropiado de solución de transformación 2 (Anexo I) para obtener una suspensión con una densidad de 1×10^6 protoplastos/mL (suspensión madre).

23- Para las transfecciones, trasvasar 0,1 mL de la suspensión madre (1×10^5 protoplastos) a un tubo para centrifuga de 15 mL, al cual se le agrega el sistema CRISPR/Cas9 correspondiente (5 μg



de vector o complejos RNP) y 0,1 mL de solución 25% PEG (Anexo I) o 0,1 mL de solución 40% PEG, según corresponda.

Para las transfecciones con 25% PEG, realizar incubaciones a temperatura ambiente por 3 minutos, mientras que para las transfecciones con 40% PEG realizar incubaciones a temperatura ambiente por 30 minutos.

24- Transcurrido el tiempo, detener la transfección con 5 mL de solución de lavado por tubo, y centrifugar a temperatura ambiente a velocidad de 50 RCF durante 5 minutos, utilizando aceleración y desaceleración mínimas.

25- Descartar los sobrenadantes con pipeta y resuspender los pellets de protoplastos en 1 mL de medio E.

26- Agregar a cada tubo el mismo volumen de solución de alginato de sodio (Anexo I), obteniéndose una densidad final de 5×10^4 protoplastos/mL (utilizar tips de 1000ul con la punta cortada).

27- Mezclar suavemente en el tubo (subiendo y bajando la solución con pipeta). Tomar el volumen total y dispensar en 4 gotas sobre una placa de Petri conteniendo 20 mL de medio de solidificación (Anexo I).

28- Incubar la placa a temperatura ambiente por 2 horas (dejarlas en el flujo laminar), hasta que se observe la solidificación de las gotas de alginato.

29- Una vez solidificadas, agregar 2 mL de solución de flotado (Anexo I) a cada placa para facilitar la separación de las gotas de alginato del medio de solidificación.

30-Tomar las gotas con pinza y se transferir a una placa de Petri conteniendo 10 mL de medio E, a razón de una gota por placa. Sellar las placas con film de laboratorio y cubrirlas con papel de aluminio.

31- Incubar a 25°C, durante 5 días (se pueden incubar en la cámara de crecimiento de plantas).

32- Transcurrido este tiempo, reemplazar el papel de aluminio por 3 o 4 hojas de papel para impresora (para incrementar gradualmente la intensidad de luz) y colocar las placas en una cámara a 25°C con fotoperiodo controlado automáticamente de 16 horas luz ($10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8

horas oscuridad.

33- Luego de 7 días, reemplazar el papel para impresora por una tela de algodón blanca y porosa (tipo tul o mosquitero) para incrementar nuevamente la intensidad de luz o dejar sólo una hoja de papel.

34- Luego de 3 días en estas condiciones, se visualizarán los callos derivados de los protoplastos a simple vista dentro de la gota de alginato. Remover el papel o tela de algodón alcanzándose una intensidad de luz de $10 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.



35- Eliminar el medio E de las placas con el uso de una pipeta y añadir 10 mL de medio F (Anexo I).

36- Incubar las placas en las mismas condiciones que el paso previo.

37- Renovar el medio F cada 7 o 15 días.

38- Transcurridos aproximadamente 30 días desde la transfección, los callos alcanzarán un tamaño de aproximadamente 2 mm de diámetro, momento en el que pueden liberarse de las gotas de alginato.

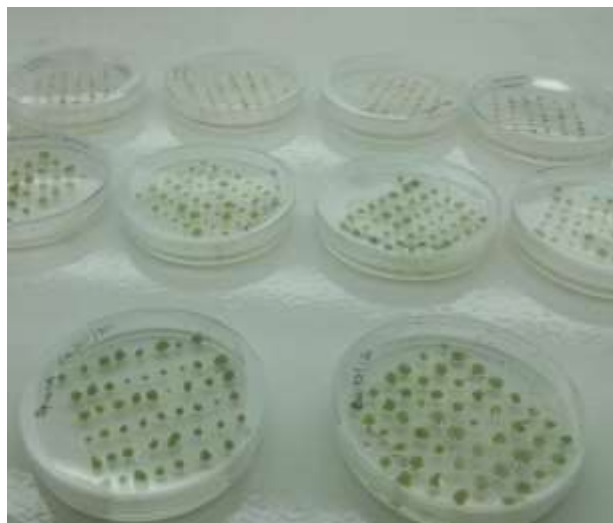
39- Descartar el medio F de cada placa y agregar 5 mL de medio de liberación (Anexo I).

40- Colocar las placas en un agitador orbital a velocidad de 25-50 rpm, durante aproximadamente 1 hora, hasta que la gota de alginato se disuelva prácticamente por completo. Para facilitar la liberación, tomar los callos suavemente con pinzas procurando separarlos de los restos de alginato.

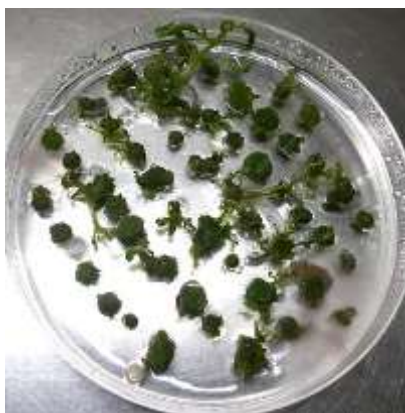
41- Eliminar el líquido remanente de cada placa con una pipeta y agregar 10 mL de medio F. Sellar

las placas con film de laboratorio para su incubación nuevamente en las mismas condiciones que en el paso previo.

42- Transcurridos 5 días, tomar los callos con pinzas desde las placas, secar brevemente en papel estéril y transferir a placas de Petri con 20 mL de medio H (Anexo I), a razón de aproximadamente 100 callos por placa. Sellar las placas con film de laboratorio e incubar a 25° C con un fotoperiodo controlado automáticamente de 16 horas luz ($80 \mu\text{E m}^{-2} \text{s}^{-1}$) y 8 horas oscuridad.



43- Transferir los callos a placas con medio H nuevo cada 15 días. Los primeros ápices comenzarán a emerger de los callos aproximadamente 50 días post-transfección (depende del genotipo). Una vez que estos alcancen el tamaño de 1-2 cm de altura, escindir del callo y transferir a medio I (Anexo I) para la regeneración de raíz. Seleccionar un único ápice por callo, y descartar los callos al momento de escisión del ápice, para asegurar el análisis de clones individuales.





Descripción del trabajo de Capacitación


El protocolo descrito fue objeto de un entrenamiento presencial orientado a generar y difundir las capacidades de extracción y transfección de protoplastos para la papa, en los países participantes del proyecto teniendo en cuenta la importancia de este cultivo tanto en la agricultura familiar y de subsistencia como en la producción extensiva para consumo fresco o para industria. La capacitación constó de momentos de introducción teórica del protocolo, de preparación de soluciones e insumos de trabajo y del desarrollo práctico del protocolo detallado en la sección anterior. Cada participante realizó individualmente los pasos más importantes del protocolo, como el de los cortes en finas tiras de las hojas de papa. En cada paso se explicitó cuáles eran los puntos críticos del protocolo.

Discusión

La papa es el tercer cultivo más importante para el consumo humano y posee un rol fundamental en la seguridad alimentaria en varios países de la Región y del mundo. La posibilidad de introducir una maquinaria que realice cambios dirigidos en el genoma de la papa con el objetivo de mejorar su calidad nutritiva e industrial y su comportamiento frente a factores bióticos y abióticos es de utilidad estratégica para el mejoramiento de este cultivo. Asimismo, al ser un cultivo clonal de multiplicación agámica, la edición génica permite un generar genotipos de desempeño superior a partir de variedades elite adaptadas sin alterar su composición alélica.

Una ventaja adicional consiste en que en varios países el tratamiento regulatorio de los productos obtenidos mediante edición génica no está sometido a un sistema diferente de aquellos generados por mejoramiento convencional, si no poseen en su genoma secuencias foráneas por el uso de esta biotecnología.

El protocolo mostró ser apto para i) Extraer protoplastos a partir de plántulas de papa cv. Spunta y cv. Atlantic; ii) Realizar transfecciones de protoplastos cv. Spunta con RNP dirigidas a los genes de polifenol oxidasa e invertasa vacuolar; iii) Realizar transfecciones de protoplastos cv. Spunta con



el vector CRISPR/Cas9 dirigido al gen de la invertasa vacuolar y iv) Regenerar plántulas de papa cv. Spunta y cv. Atlantic a partir de los protoplastos transfectados con las RNP o el vector CRISPR/Cas9.

La capacitación adquirida por los participantes mostrará la utilidad de este protocolo para otros cultivares de importancia en los países co-ejecutores del proyecto.

Conclusiones

El protocolo resultó de probada eficiencia para el aislamiento y transfección de protoplastos de papa para el desarrollo de productos derivados de la edición génica. Esta monografía constituye un manual detallado para la adquisición de capacidades en una biotecnología de avanzada para el mejoramiento de papa, que puede ser extrapolada a otras especies de interés.

En la capacitación mencionada se entrenaron a 8 investigadores e investigadoras de Argentina, Ecuador, Colombia y Perú cuya lista completa figura en el Anexo II.

Este adiestramiento no constituye un evento aislado, sino que forma parte del armado de una plataforma regional donde se establecieron los vínculos interinstitucionales que siguen activos para que quienes participaron repliquen en sus laboratorios de origen estas experiencias. Eventualmente, se reforzarán estas capacidades con visitas de técnicos a los diferentes países en el marco del proyecto actual.

Referencias Bibliográficas

- González, Matías (2021). "Reducción del pardeamiento enzimático en papa (*Solanum tuberosum* L.) mediante edición génica con el sistema CRISPR/Cas9". Tesis doctoral.
- González MN, Massa GA, Andersson M, Turesson H, Olsson N, Fält A-S, Storani L, Décima Oneto CA, Hofvander P & Feingold SE. 2019. Reduced enzymatic browning in potato tubers by specific editing of a Polyphenol Oxidase gene via Ribonucleoprotein complexes delivery of the CRISPR/Cas9 system. *Frontiers in Plant Science* 10, 1649-1658 DOI:10.3389/fpls.2019.01649
- González MN, Massa GA, Andersson M, Décima Oneto CA, Turesson H, Storani L, Olsson N, Fält A-S, Hofvander P & Feingold SE (2021). Comparative potato genome editing: *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and protoplasts transfection delivery of CRISPR/Cas9 components directed to StPPO2 gene. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 145 (2), pp. 291-305. <https://doi.org/10.1007/s11240-020-02008-9>
- Nicolia, A., Proux-Wéra, E., Åhman, I., Onkokesung, N., Andersson, M., Andreasson, E., Zhu, L.-H. (2015). Targeted gene mutation in tetraploid potato through transient TALEN expression in protoplasts. *J. Biotechnol.* 204, 17-24. <https://doi.org/10.1016/J.JBIOTECH.2015.03.021>
- Nahirñak V, Almasia NI, González MN, Massa GA, Décima Oneto CA, Feingold SE, Hopp HE., Vazquez Rovere C (2022). State of the Art of Genetic Engineering in Potato: From the First Report to Its Future Potential. *Frontiers in Plant Science* Vol. 12 | 768233. doi.org/10.3389/fpls.2021.768233

ANEXO I. Composición medios de cultivo *in vitro*

MS30

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Medio MS incluyendo vitaminas	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0222	4,405
Sacarosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0809	30
Agar ^b	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P1003	6
pH = 5,8			

Esterilización en autoclave.

Medio B

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)*
MS modificado N° 4	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0238	2,7
1000x Vitaminas Nitsch	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0410	0,1 ml/L
Hidrolizado de caseína	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C1301	0,1
Ácido naftalenacético (ANA)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0903	2×10^{-3}
6-Bencilaminopurina (BAP)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0904	5×10^{-4}
pH = 5,8			

Esterilización por filtrado.

*Excepto en los casos indicados particularmente.

Solución de plasmólisis

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
D-Sorbitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0807	91,1

Esterilización por filtrado.



Medio C

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)*
100x Macronutrientes	-	-	10 mL/L
100x Fe/EDTA	-	-	10 mL/L
1000x Micronutrientes	-	-	1 mL/L
100x Vitaminas 1	-	-	5 mL/L
100x Vitaminas 2	-	-	5 mL/L
200x Vitaminas 3	-	-	2,5 mL/L
1000x Vitaminas Nitsch	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0410	5 mL/L
50x Azúcares	-	-	20 mL/L
100x Orgánicos	-	-	10 mL/L
Hidrolizado de caseína	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C1301	0,5
D-Glucosa monohidratada	Duchefa Biochemie, Países Bajos	G0802	40,63
Manitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0803	37,35
Polivinilpirrolidona (PVP-10)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P1368	20
Ácido naftalenacético (ANA)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0903	1×10^{-3}
6-Bencilaminopurina (BAP)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0904	4×10^{-4}
Celulasa Onozuka R10	Yakult Pharmaceutical, Japón	-	10
Macerozima R10	Yakult Pharmaceutical, Japó	-	2
pH = 5,6			
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0504	6 mM

*Excepto en los casos indicados particularmente.

Agregar todos los componentes, a excepción del CaCl₂ x 2H₂O. Incubar a 55°C por 10 minutos y dejar enfriar a temperatura ambiente. Esterilización por filtrado.



Solución de lavado

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)*
100x Macronutrientes	-	-	10 mL/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0504	6 mM
1000x Micronutrientes	-	-	1 mL/L
NaCl	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0520	14,03
Ácido naftalenacético (ANA)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0903	2 x 10 ⁻³
6-Bencilaminopurina (BAP)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0904	5 x 10 ⁻⁴
100x Fe/EDTA	-	-	10 mL/L
pH = 5,6			

Esterilización por filtrado.

*Excepto en los casos indicados particularmente.

Solución de sacarosa

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Sacarosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0809	147,19

Esterilización por filtrado.

Solución de transformación 1

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Manitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0803	34,6
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0504	14,7
MES monohidratado	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M1503	5
pH = 5,6			

Esterilización por filtrado.

Solución de transformación 2

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Manitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0803	91,1
MgCl ₂ ·6H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0533	3,05
MES monohidratado	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M1503	1
pH = 5,6			

Esterilización por filtrado.

Solución 40% PEG

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
PEG 4000	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P0804	400
Manitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0803	72,9
Ca(NO ₃) ₂ · 4 H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0505	23,6

NOTA: calentar para disolver. Esterilización por filtrado.

Solución de alginato de sodio

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Alginato de sodio	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S1320	28
Sorbitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0807	72,88

Esterilización en autoclave.



Medio de solidificación

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Sorbitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0807	72,88
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0504	7,351
Agar	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P1003	8

Esterilización por filtrado en la mitad del volumen, luego mezclar con el agar esterilizado por autoclave en la otra mitad.

Solución de flotado

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Sorbitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0807	72,88
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0504	7,351

Esterilización por filtrado.

Medio E

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)*
100x Macronutrientes	-	-	10 mL/L
100x Fe/EDTA	-	-	10 mL/L
CaCl ₂ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0504	2,5 mM
1000xMicronutrientes	-	-	1 mL/L
100x Vitaminas 1	-	-	5 mL/L
100x Vitaminas 2	-	-	5 mL/L
200x Vitaminas 3	-	-	5 mL/L
50x Azúcares	-	-	20 mL/L
100x Orgánicos	-	-	10 mL/L
Hidrolizado de Caseína	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C1301	0,5
D-Glucosa monohidratada	Duchefa Biochemie, Países Bajos	G0802	33,69
Manitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0803	30,98
Seroalbúmina bovina (BSA)	Sigma Aldrich, Estados Unidos	A6003	2
Ácido naftalenacético (ANA)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0903	1 x 10 ⁻³
5-Bencilaminopurina (BAP)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0904	4 x 10 ⁻⁴
pH = 5,6			

Esterilización por filtrado. *Excepto en los casos indicados particularmente.



Medio F

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)*
MS modificado N° 4	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0238	2,7
NH ₄ Cl	Merck, Alemania	101145	0,107
1000x Vitaminas Nitsch	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0410	1 mL/L
Hemisulfato de adenina dihidratado	Duchefa Biochemie, Países Bajos	A0908	0.04
Hidrolizado de caseína	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C1301	0,1
Sacarosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0809	2,5
Manitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0803	54,7
Ácido naftalenacético (ANA)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0903	1 x 10 ⁻⁴
6-Bencilaminopurina (BAP)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0904	5 x 10 ⁻⁴
pH = 5,8			

Esterilización por filtrado.

*Excepto en los casos indicados particularmente.

Medio de liberación

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Citrato de sodio	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0521	5,8
Sorbitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0807	91,1

Esterilización por filtrado.



Medio H

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Medio MS con vitaminas	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0222	4,405
Sacarosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0809	10
Zeatina ribósido	Duchefa Biochemie, Países Bajos	Z0937	2×10^{-3}
Ác. naftalenacético (ANA)	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0903	1×10^{-5}
Ácido giberélico A3	Duchefa Biochemie, Países Bajos	G0907	1×10^{-4}
pH = 5,8			
<i>Gelrite</i>	Duchefa Biochemie, Países Bajos	G1101	2,5

Esterilización por filtrado en la mitad del volumen, luego mezclar con el *gelrite* esterilizado por autoclave en la otra mitad.

Medio I

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (g/L)
Medio MS incluyendo vitaminas	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0222	4,405
Sacarosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0809	20
Ácido giberélico A3	Duchefa Biochemie, Países Bajos	G0907	1×10^{-4}
pH = 5,8			
<i>Gelrite</i>	Duchefa Biochemie, Países Bajos	G1101	2,5

Esterilización por filtrado en la mitad del volumen, luego mezclar con el *gelrite* esterilizado por autoclave en la otra mitad.

100x Macronutrientes

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
KNO ₃	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P0519	7,4
MgSO ₄ x 7H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0513	4,92
KH ₂ PO ₄	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P0574	0,340

Esterilización por filtrado.

100x Fe/EDTA

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	E0511	0,14
FeSO ₄ x 7H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	F0512	0,19

Esterilización por filtrado.

1000x Micronutrientes

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
H ₃ BO ₃	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0503	0,15
MnSO ₄ x H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M0514	0,5
ZnSO ₄ x 7H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	Z0526	0,1
Na ₂ MoO ₄ x 2H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0525	1,2 x 10 ⁻²
CuSO ₄ x 5H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0508	1,2 x 10 ⁻³
CoCl ₂ x 6H ₂ O	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0507	1,2 x 10 ⁻³
KI	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P0518	3,8 x 10 ⁻²

Esterilización por filtrado.

100x Vitaminas 1

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
Ácido pantoténico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0604	0,05
Cloruro de colina	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0605	0,05
Ácido ascórbico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	A0602	0,1
Ácido p-aminobenzoico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	A0601	1
Ácido nicotínico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	N0611	0,05
Piridoxina	Duchefa Biochemie, Países Bajos	P0612	0,05
Tiamina	Duchefa Biochemie, Países Bajos	T0614	0,5

Esterilización por filtrado.

100x Vitaminas 2

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
Ácido fólico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	F0608	0,02
Biotina	Duchefa Biochemie, Países Bajos	B0603	5 x 10 ⁻⁴
Cianocobalamina	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C0726	1 x 10 ⁻³

Esterilización por filtrado.

100x Vitaminas 3

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
Colecalciferol	Sigma Aldrich, Estados Unidos	PHR1237	5 x 10 ⁻⁴

Esterilización por filtrado.

50x Azúcares

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
Sorbitol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0807	0,625
Sacarosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	S0809	0,625
D(-)Fructosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	F0801	0,625
D(-)Ribosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	R0806	0,625
D(+)Xilosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	X0808	0,625
D(+)Manosa	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M1392	0,625
L(+)Ramnosa	Sigma Aldrich, Estados Unidos	83650	0,625
D(+)Celobiosa	Sigma Aldrich, Estados Unidos	22150	0,625
Mioinositol	Duchefa Biochemie, Países Bajos	I0609	0,250

Esterilización por filtrado.

100x Orgánicos

Componente	Marca	N° catálogo	Concentración (% m/v)
Ácido pirúvico	Sigma Aldrich, Estados Unidos	P5280	0,1
Ácido fumárico	Sigma Aldrich, Estados Unidos	F8509	0,2
Ácido cítrico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	C1303	0,2
Ácido málico	Duchefa Biochemie, Países Bajos	M1315	0,2

Esterilización por filtrado.



ANEXO II. Cuerpo docente y Participantes de la Capacitación

Cuerpo docente (Laboratorio de Agrobiotecnología de la EEA Balcarce –INTA)

Dra. Gabriela Massa. INTA e investigadora CONICET

Dra. Cecilia Décima Oneto. INTA

Dr. Matías González. Becario postdoctoral CONICET

Docentes de apoyo

Ailín Arizmendi. Becaria Doctoral CONICET

Julián Zimmermann. Becario cofinanciado INTA-CONICET

Participantes

Dra. Gina Garzón AGROSAVIA Colombia

Dr. Eduardo Morillo. INIAP Ecuador

Ing. Agr. Santiago Meneses. INIAP Ecuador

Lic. Valentina Di Pauli. INTA Argentina

Lic. Guillermina Ruiz. Asociación Cooperativas Argentinas (ACA) Argentina

Lic.. Aura García Serquén. INIA Perú

Lic. Claudia Yalta Macedo. INIA Perú

Ing. Agr. Percy Medina. INIA Perú

Secretaría Técnica Administrativa



Con el apoyo de:



www.fontagro.org

Correo electrónico: fontagro@fontagro.org