

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Transformación Genética de Girasol
(*Helianthus annuus* L.)

Trabajo de tesis para optar al título de Doctor en Ciencias
Biológicas

Ing. Agr. Dalia Marcela Lewi

Directores
Dr. H. Esteban Hopp
Dr. Alejandro S. Escandón

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, Diciembre de 2004

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

Genetic Transformation of Sunflower
(Helianthus annuus L.)

Doctoral Thesis

Ing. Agr. Dalia Marcela Lewi

Directores
Dr. H. Esteban Hopp
Dr. Alejandro S. Escandón

Instituto de Biotecnología, CICVyA, INTA Castelar

Buenos Aires, December 2004

Resumen

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es una de las especies con mayor dificultad para ser transformada genéticamente debido a que es difícil combinar la transformación y la regeneración en el mismo tipo de células (Potrykus,1990). Se han reportado numerosas variantes en cuanto a la transformación de meristemas derivados de embriones maduros de girasol en función de desarrollar un protocolo de transformación de mayor eficiencia y que pueda ser aplicado de rutina en ensayos con genes de interés.

En el presente trabajo se ha estudiado la respuesta de diversos explantos para la transformación y regeneración y se ha logrado obtener plantas transgénicas a partir de diversos genotipos, concentrando la atención en el tratamiento de meristemas divididos del genotipo HA89. Se ajustaron las condiciones de agroinfección en cocultivo líquido para las cepas EHA 105 y C58, obteniendo una eficiencia de transformación (medida como plantas PCR positivas obtenidas en relación al número inicial de explantos tratados) de valores variables entre ensayos con promedios de 3.4% y 1.3% (para EHA105 y C58 respectivamente) y 5.23% para C58 conteniendo el plásmido 2x35SBtk. Se ha demostrado que el sistema propuesto es factible de aplicación con diversas cepas de *Agrobacterium* y plásmidos conteniendo distintos genes (tanto reporteros como de interés agronómico). También se ha estudiado la factibilidad de realizar ensayos a gran escala con el protocolo propuesto sin detrimento de la eficiencia de transformación.

Palabras clave: *Agrobacterium tumefaciens*; *Helianthus annuus* L.; Plantas transgénicas; Transformación de meristemas; Transformación de girasol.

Abstract

Sunflower (*Helianthus annuus* L.) is considered one of the recalcitrant species in terms of transformation and regeneration. A routine transformation system of this crop requires cell cultures competent for efficient plant regeneration as well as an effective method for gene delivery. Numerous attempts have been made to introduce foreign genetic material into sunflower.

In this work the performance of some explants (cotyledons, hypocotyls, leafs, meristems) under regeneration and transformation conditions are described. A transformation system was developed using *Agrobacterium tumefaciens* and split embryonic axis explants of Ha89 genotype in liquid culture with the strains EHA105 and C58. Mean transformation efficiency (PCR+ plants/treated explants) varied between experiments: 3.4% and 1.3% , for EHA105 and C58 respectively and 5.23% for C58 containing p2x35SBtk plasmid. The developed system has applicability to several *Agrobacterium* strains and plasmids with both reporter o agronomic interest genes. Transformation system scaling up was studied too, without loss of transformation efficiency.

Keywords: *Agrobacterium tumefaciens*; *Helianthus annuus* L.; Transgenic plants; Meristem transformation; Sunflower transformation.

A mis padres
Al amor de mi vida
A mis tres flores

"Mi kol melamdai hiskalti"
(Pirkei Avot, 4:1)

"Aprendí de todos mis maestros"

Agradecimientos

Quiero agradecer a aquellos que me han acompañado durante el transcurso de los años de experimentos y los que siguieron hasta poder completar este trabajo:

...Al INTA y a la CIC por el apoyo institucional y económico brindado.

...A Alejandro Escandón por haberme acompañado como director de este trabajo.

...Al Dr. Palma por permitirme trabajar en el Instituto de Biotecnología desde que empecé con esta tesis.

...A Esteban, por la guía, el apoyo, la confianza, la sabiduría, la honradez, la fuerza, la rebeldía, el empuje y la paciencia

...A mis Compañeros de girasol, Laura, Fernando y Nilda, por las miles de horas de flujo laminar compartidas, por su apoyo, su calidez, su amistad y las alegrías y lágrimas compartidas.

...A Mariana, a Sebas, a Andrea D. Por haber hecho más agradable el clima del lab.

...A Ale Tozzini por haberme traído al INTA por primera vez posibilitando abrir un nuevo camino en mi carrera profesional

...A la brujita Ceci V. por convertirme en "sudafía" y estar ahí cada vez que necesité.

...A Oskí, por el humor tan particular y los buenos días con besos ruidosos.

...A Osvaldo, a Silvio, a Angel por su buena onda y atención cada vez que necesité ayuda.

...A las ex IB Fernanda y Paula Crámer

...A Eleonora, a Laurita Boschi, a Ceci T, a Fabiana, a Paz, por acompañarme y compartir tantos lindos momentos.

...A Diego, por todos los buenos momentos dentro y fuera del lab de todos estos años.

...A los vecinos de marcadores: Ruth, Norma, Luis, Mercedes, Carolina.

...A Alicia A. y Alicia A.

...A Isabel, Susana, Tere, y Fabián.

...A Susi Marcucci y a Marcela Manifesto (del trío de las desterradas) por todos estos años de aliento y empuje y las largas charlas en el parque del jardín, chupetes mediante.

...A mis compañeras de charter de antes Alina y Mariana.

...A mis compañeros del IGEAF Noemí, Lorena, Sarita, Laurita, Cecilia, Eze, Roberto, Gaby, Ale, Pau y Gus.

...A Alberto, Pascual y Raúl por creer en mi capacidad.

...A Antonio, por su tiempo, su escucha, su calidez y sus sabios consejos.

...A Bessie por mostrarme que se puede.

...A Daniela, por el apoyo infinito, por darme el ejemplo y por la teoría de los genes indios.

...A Magda, constituida en mi hermanita menor, por todo eso que los amigos del alma dan aunque la distancia quiera diluir los lazos que nos unen desde hace tanto tiempo.

...A mis amigos de afuera del INTA, especialmente a Carina, por todo.

...A mi familia.

...A mi esposo por todos estos años de apoyo incondicional, de infinita paciencia y de estar a mi lado con tanto amor.

...A mi madre siempre lista, presente, activa y adivinando la ayuda que necesito.

...A mis tres hijas, por haberme permitido sentirme la mujer más importante del mundo y hecho saber cuáles son las prioridades.

..... ¡gracias!

Tabla de contenido

Introducción 1

1. El girasol -*Helianthus annuus* L.- 1
 - 1.1. Características botánicas 1
 - 1.2. Características agronómicas..... 2
 - 1.3. Características económicas..... 3
 - 1.4. Mejoramiento genético.....7
2. Las técnicas de regeneración y transformación aplicadas a las plantas superiores.....9
 - 2.1. Utilización de la transformación genética como herramienta para el mejoramiento vegetal.....10
 - 2.2. Transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*..... 14
 - 2.3. Transformación genética por bombardeo de micro proyectiles..... 21
3. Biotecnología aplicada al cultivo de girasol.....22

Objetivos 30

Materiales y métodos 31

1. Cotiledones.....31
2. Hipocótilos.....33
 - 2.1. Material vegetal y obtención de los explantos.....33
 - 2.2. Condiciones de cultivo.....34
 - 2.3. Medio de cultivo.....34
 - 2.4. Transformación.....34
3. Hojas.....35
4. Hemi embriones (o meristemas).....36
 - 4.1. Genotipos.....36
 - 4.2. Obtención del explanto.....36
 - 4.3. Medios de cultivo.....37
 - 4.4. Transformación.....37
 - 4.5. Detección molecular de los transgenes.....39

Resultados 46

Resultados cotiledones.....46

1. Agentes selectivos: sensibilidad a kanamicina, paromomicina y fosfinotricina.....47
2. Regeneración a partir de callos derivados de cotiledones.....49
 - 2.1. Efecto de ga3 sobre la regeneración.....49
 - 2.2. Determinación de la concentración de ga3 para favorecer la regeneración de los brotes desarrollados.....50
 - 2.3. Determinación del momento de suplementación del medio de cultivo con ga3.51
 - 2.4. Efecto de la macerozima sobre la regeneración..... 52
3. Transformación de cotiledones..... 53
 - 4.3. Estudio del tiempo de cocultivo y la dilución del inoculo bacteriano.55
 - 4.4. Efecto de la agroinfección, la macerozima y el giberélico sobre la regeneración directa e indirecta..... 56
 - 4.5. Efecto de la macerozima y la edad de plántula sobre la transformación. 57

Resultados hipocótilos..... 59

1. Obtención de los callos en genotipos del INTA Manfredi..... 60
2. Comparación de las respuestas a diferentes relaciones entre auxina y citoquinina..... 61
3. Respuesta de los explantos a la agroinfección..... 62
4. Estudio de regeneración y transformación a partir de hipocótilos del genotipo Ha300b63
5. Estudio de la sensibilidad al agente selectivo paromomicina..... 65

Resultados hojas.....70

Resultados hemibriones o meristemas..... 74

1. Evaluación de la aptitud de diferentes genotipos para la regeneración.....74
2. Transformación con *Agrobacterium*.....75
 - 2.1. Evaluación de la aptitud para la transformación con *Agrobacterium*..... 75
 - 2.2. Estudio comparativo de la influencia de compuestos fenólicos sobre la transformación con *Agrobacterium*.....77
 - 3.3. Estudio comparativo de diferentes métodos de transformación..... 80
4. Selección de brotes en kanamicina..... 81
 - 4.1. Selección de brotes en kanamicina transformados por cocultivo en placa..... 81
5. Estudio de la variación en la multiplicidad de brotes obtenidos mediante el cocultivo de hemimeristemas con A.t.82
 - 5.1. Multiplicidad de brotes en los sucesivos repiques en técnica de cocultivo.....82

5.2. Multiplicidad de brotes en cultivo líquido..... 85
5.3. Comparación de la multiplicidad entre cocultivo en placa y líquido..... 86
6. Comparación de eficiencias de transformación por tratamientos y cepas de A.t..... 87
6.1. Transformación utilizando un plásmido que contiene el gen de *Bacillus thuringiensis* var. *Kurstakii*..... 89
7. Injertos.90
8. Análisis de la herencia del transgén en las plantas descendientes de las T0 transgénicas..... 92

Discusión 111

Conclusiones 129

Bibliografía 133

INTRODUCCIÓN

1. EL GIRASOL -*Helianthus annuus* L.-

1.1. CARACTERÍSTICAS BOTANICAS

El girasol -*Helianthus annuus* L.- es una angiosperma dicotiledónea que pertenece al género *Helianthus*, miembro de la familia de las Compuestas que comprende más de 20000 especies vegetales.

La especie *Helianthus annuus*, posee tres subespecies principales: *Helianthus annuus ssp lenticularis*, girasol silvestre; *Helianthus annuus ssp annuus*, girasol maleza y *Helianthus annuus ssp macrocarpus*, girasol cultivado por sus frutos comestibles. El primero, que se encuentra difundido en el oeste de América del Norte, es ramificado, con capítulos y aquenios pequeños y pocas flores liguladas. El segundo, se lo encuentra en el Medio Oeste de los Estados Unidos, es también ramificado, pero con capítulos y aquenios de mayor tamaño y número de flores liguladas más numerosas que el silvestre.

El girasol cultivado es no ramificado, con un solo capítulo con numerosas flores liguladas y aquenios grandes. Está distribuido en casi todo el mundo pero no persiste fuera del cultivo. Es una planta anual, diploide ($2n=34$ cromosomas). Contrariamente a las especies salvajes muy ramificadas, las plantas cultivadas presentan un tallo de porte recto y con un solo capítulo. La altura del tallo varía de 0,5 a 3 m al final del crecimiento y las hojas son generalmente redondeadas o cordiformes, y algunas veces dentadas, y en un número promedio de 20-30 por tallo, los primeros 6 pares de hojas son opuestas y en los siguientes son alternas. El sistema radical es de tipo pivotante, constituido de una raíz principal bien diferenciada y de numerosas raíces secundarias.

La inflorescencia del girasol se denomina capítulo y porta 2 tipos de flores, las liguladas en la periferia y las tubulosas en el centro. Las tubulosas son flores completas que producen, después de la polinización y fecundación, los aquenios. Estos aquenios son comúnmente llamados granos y botánicamente constituyen los frutos de la planta. La floración del capítulo es centripeta y dura de 1 a 2 semanas.

La polinización es alógama y esencialmente entomófila, las abejas son los principales agentes polinizadores. Después de la fecundación, se forma el embrión que está constituido por 2 cotiledones, el meristema apical y el primer par de hojas. La madurez fisiológica de los granos se alcanza cuando la materia seca y el tenor de aceite es constante, esto ocurre a los 30 a 40 días después de la floración, dependiendo del genotipo y las condiciones ambientales (Seiler, 1997).

1.2. CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS

El girasol forma parte de las plantas oleaginosas cultivadas tanto por sus hojas (puede utilizarse como forraje o para ensilaje) como por sus capítulos.

Los aquenios del capítulo floral están constituidos por un 53 % de lípidos, 25 % de proteínas y un 22 % de azúcares. El aceite de variedades comerciales de girasol cultivados en climas templados son ricos en ácidos grasos insaturados (86 % de los lípidos) y en particular en ácido linoleico (alrededor del 65 %) que es un ácido graso esencial no sintetizado por el organismo humano. Los otros ácidos grasos insaturados importantes son el ácido oleico (alrededor del 20 %) y el ácido linolénico (menos del 1 %). Los ácidos grasos saturados que constituyen alrededor del 14 %, son el ácido palmítico (7 %) y el esteárico (4 %).

El girasol cultivado es sensible a diversos parásitos y enfermedades, esencialmente fúngicas tales como el mildiu o enanismo (*Plasmopara helianthi*), podredumbre blanda del capítulo (*Sclerotinia sclerotiorum*), secado anticipado y quebrado del tallo, conocido como verticillium (*Verticillium dahliae*), mancha o escudo negro del tallo (*Phomopsis helianthi*), roya negra (*Puccinia helianthi*) *Botrytis cinerea*, *Phoma oleracea*, además de los parásitos obligados del sistema radical. De éstos, los agentes responsables de las mayores pérdidas por enfermedades fúngicas en el cultivo de girasol son *Sclerotinia* y *Phomopsis*. *Sclerotinia sclerotiorum* es un patógeno con un amplio espectro de hospedantes (ataca a numerosas dicotiledóneas) que es capaz de atacar al girasol durante todo su ciclo vegetativo y a nivel de todos los órganos (raíces, cuello, tallo, hojas y capítulo). En cuanto a la *Phomopsis*, el ataque se establece a nivel de las hojas, el hongo penetra por las nervaduras para descender hasta el tallo al que infecta completamente, el cual se quiebra y se cae.

1.3. CARACTERISTICAS ECONOMICAS

1.3.1. Historia del cultivo en Argentina

Las primeras referencias sobre girasol, en la República Argentina se remontan al siglo XIX cuando colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y Buenos Aires realizan las primeras introducciones de semilla para su propio consumo. Su difusión, como cultivo, comienza en la Colonia Mauricio, partido de Carlos Casares, en el oeste de la provincia de Buenos Aires, a partir de 1900, por agricultores de la Jewish Colonization Association. Aunque se registran unas pocas exportaciones menores de grano entre 1915 y 1920, hasta 1929 fue un cultivo de consumo familiar, sin propósito comercial, para atender las necesidades del consumo de sus semillas tostadas, uso que aun perdura. Se lo conoció como planta ornamental o de jardín y se utilizó como alimento de aves. El atlas "L'Atlas des Colonies et des Domaines de la J.C.A. en Argentine et au Brasil, París, 1914", documenta para la Colonia Mauricio, 315 ha sembradas en 1892.

Desde 1930 hasta 1959 se opera la gran expansión como cultivo oleaginoso. La primera información estadística oficial del área sembrada data de la campaña 28/29 con 400 ha. Veinte años después, en la campaña 48/49, tiene lugar el primer récord de superficie sembrada con 1.800.000 ha. Esta superficie fue superada recién en la campaña 77/78 con 2.200.000 ha. Paralelamente a la expansión del cultivo, a causa de las guerras mundiales y consecuente falta de aceite, se observan la industrialización del grano y el consumo de su aceite en sustitución de otros. Los materiales cultivados originariamente se caracterizaban por ser de alto porte y de largo ciclo vegetativo, como Gigante de Rusia y Gigante Americano, todos originarios de Rusia. Estos cultivares fueron cruzándose naturalmente dando lugar a poblaciones con gran variación en ciclo, color y forma de semilla, del blanco al negro e intermedios estriados.

En el año 1938, Enrique Klein obtiene la variedad Klein, producto de selección de una población, buscando acortar el tamaño y el ciclo y aumentar el contenido de aceite, alcanzando un contenido de 39%.

Entre los años 1950 y 1960 ocurre una etapa de crisis causada por factores

económicos y sanitarios. Los bajos precios recibidos por el productor en los primeros años de este periodo dieron origen a una fuerte reducción del área sembrada llegando en la campaña 54/55 a un piso de 560.000 ha. Posteriormente y superados los condicionantes económicos, la producción es afectada por enfermedades y desciende a un promedio de 480 kg/ha durante el quinquenio 56/60. Estas enfermedades dieron lugar a una etapa crítica en la evolución del cultivo. El aporte del mejoramiento genético da por resultado la etapa de recuperación entre los años 1960 y 1975. El Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) obtiene su primera variedad en 1960, Manfredi INTA y a partir de 1962, surgen Impira, Guayacan, Cordobés y Pehuén. Manfredi fue la primera variedad resistente a roya, sin embargo su poca uniformidad y facilidad de desgrane limitaron su difusión. Con Impira INTA comienzan a destacarse rendimientos y resistencia a roya aunque los contenidos de aceite eran aún bajos.

El descubrimiento de la androesterilidad genética (Leclercq, 1969), y la androesterilidad citoplásmica en 1970, hacen posible la producción y difusión de los primeros híbridos en escala comercial. En 1972 y 1973 son liberados en Argentina el primer girasol híbrido con androesterilidad genética, D-G104, y el primero con androesterilidad citoplásmica. A partir de 1975 tiene lugar un vertiginoso desarrollo de los híbridos, momento a partir del cual se define la 5ta etapa de evolución del girasol, caracterizada como etapa de difusión de los híbridos. Tradicionalmente fue considerado un cultivo rústico y resistente a malezas, razón por la que no tuvo el cuidado que se le brindó a sus pares estivales. Se le asignó suelos inferiores o provenientes de cultivos invernales en detrimento de la producción. En la siembra y tareas culturales, no tuvo prioridad quedando como cultivo de alternativa al que se recurrió cuando las posibilidades para los otros, eran poco favorables. Iniciada la década del 80, el cultivo experimenta un gran cambio. Las estadísticas muestran un importante aumento de producción por unidad de superficie especialmente en lo que se refiere a la producción media de aceite, probable resultado de una combinación de disponibilidad y adopción de tecnología y notable mejora del germoplasma comercial. De los 0.8 t/ ha de fines de la década del 1970, el rendimiento medio se duplica hasta alcanzar 1.6-1.8 t/ha con

potenciales reales de producción para los mejores híbridos superiores a 3 t/ha. Con una producción mundial de grano de girasol de 23 millones de toneladas, a finales de la década del 90 alcanza una producción de 6.5 millones tn, la Argentina se constituyó en el primer productor mundial y con una exportación de 1.7 millones tn de aceite sobre un total de 3 millones comercializadas en el mundo se ubicó como primer exportador mundial con una participación del 60 % del mercado internacional.

El girasol es uno de los cultivos productores de aceite y proteína mas importantes en el mundo. Los principales países productores son la ex-URSS, Argentina y la CEE, en particular Francia y España (gráfico 1). En Argentina las estadísticas oficiales (SAGPyA) indican que el cultivo de girasol se ha ido incrementando desde el año 1929 con 3100 has. sembradas hasta la actualidad superando las 2 millones de has. En el mismo período, los valores de rendimiento por unidad de superficie se triplicaron (gráfico 2). En cuanto a las cifras de exportación, el girasol ocupa el tercer lugar dentro de los cultivos oleaginosos, después de la soja y el maní, sin embargo a nivel mundial Argentina es uno de los principales países exportadores de sus subproductos.

Desde la disolución de la URSS, la Argentina pasó al primer lugar como productor de grano de girasol y ya lo era en comercialización de su aceite. El 92 % del grano de girasol producido en la Argentina es procesado, un 65 - 75 % se exporta como aceite crudo a granel y harina proteica y el resto como grano o como aceite refinado envasado. El 70% del aceite consumido en nuestro país por la población es procesado a partir de esa oleaginosa. Por lo expuesto, el girasol es un cultivo estratégico para la Argentina, se ha montado una industria que produce ingresos anuales de alrededor de 800 millones de dólares. El área de producción se extiende entre los 24° S (Chaco) y 38° S (Sur de la provincia de Buenos Aires), abarcando una amplia gama de ambientes donde ha constituido una alternativa para los productores argentinos.

Debido a la diversidad de su utilización alimentaria e industrial por sus características dietéticas y a la elevada calidad de aceite producido por hectárea, el girasol es uno de los cultivos oleaginosos más importantes a nivel económico. Por esta razón, conjuntamente con la base de precios de los cultivos oleaginosos, se hace necesario el mejoramiento genético de las variedades existentes a fin de crear variedades con alto potencial de rendimiento que incrementen sus cualidades intrínsecas (Fick, 1997).

Gráfico 1: Comparación entre la exportación en relación a la producción de productos derivados de girasol entre los principales países productores (fuente: ASAGIR).

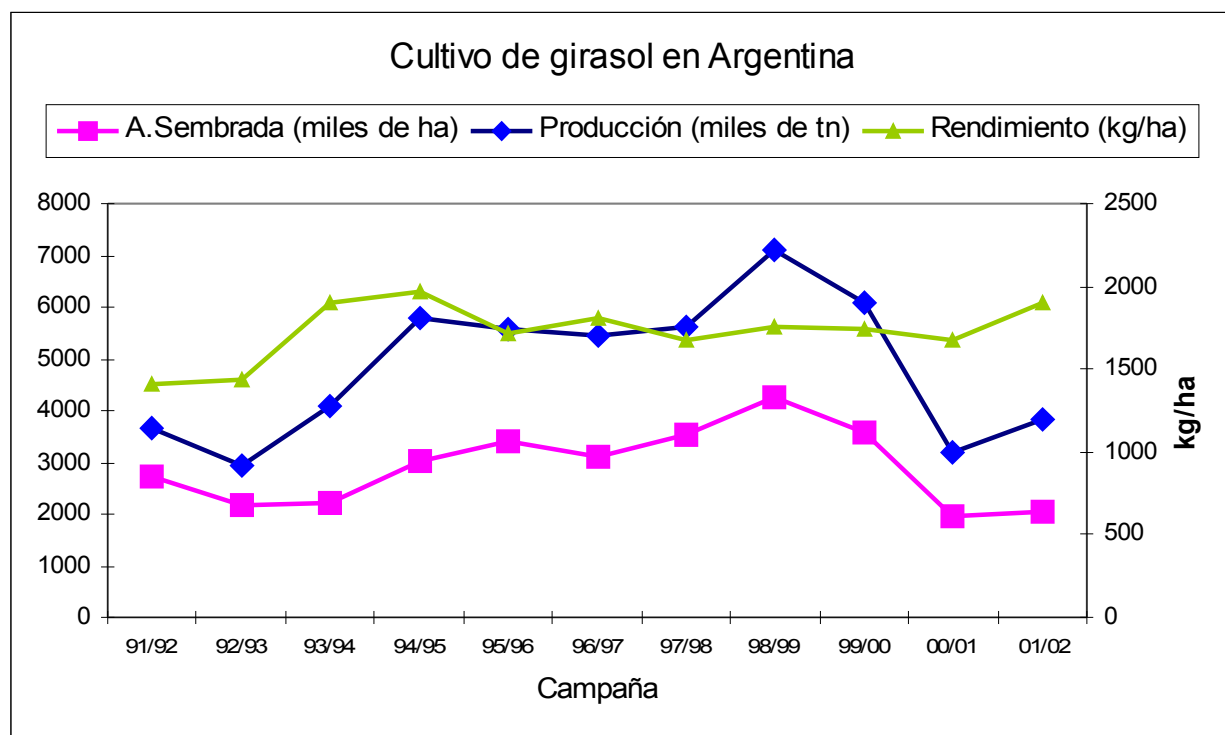
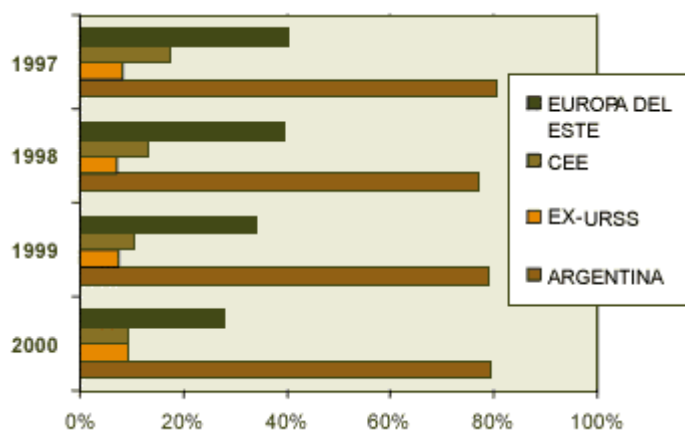


Gráfico 2: Evolución del área sembrada, la producción y el rendimiento del cultivo de girasol en la Argentina entre las campañas 1992 y 2002.

1.4. MEJORAMIENTO GENÉTICO

El mejoramiento genético clásico en girasol comenzó a ser aplicado con fines comerciales en Francia, donde por selección recurrente, entre 1920 y 1950, se logró un aumento del 10 % en el tenor de aceite sin disminución del rendimiento. Las poblaciones mejoradas provenían de Europa Oriental (Rusia y Rumania principalmente) donde habían sido seleccionadas de la misma forma. Estas poblaciones heterogéneas en cuanto a la altura del tallo, el diámetro del capítulo y la precocidad eran también sensibles a las altas temperaturas, a *Botrytis* y a mildiu. Debido a esto, los mejoradores han estado interesados en el desarrollo de líneas para la obtención de híbridos.

El interés en los híbridos es debido a que éstos presentan un rendimiento y un vigor superior al de sus padres. Estas características se deben al fenómeno de heterosis (Leclercq, 1966). Así, el cruzamiento de dos líneas puras o altamente homocigotas conduce a la obtención de una generación F1 híbrida (híbrido simple) donde el rendimiento en granos es sensiblemente superior al de sus padres.

A fin de asegurar la homogeneidad y la estabilidad de las semillas híbridas es necesario prevenir la autofecundación de las líneas parentales, considerando que es una especie autógena y lograr el control del cruzamiento entre las líneas.

Esto ha sido posible por el descubrimiento de la androesterilidad citoplasmática (AEC) por Leclercq (1969), actualmente utilizada en el mundo entero para la producción de todos los híbridos comerciales de girasol. La AEC se pone en evidencia por un cruzamiento interespecífico entre la especie salvaje *H. petiolaris* Nutt. y la especie cultivada *H. annuus* L. resultando en una incompatibilidad entre el núcleo y el citoplasma (Gráfico 3) y se caracteriza por la ausencia de polen fecundante.

El esquema de obtención de un híbrido comercial se presenta en el gráfico 4; es necesario producir una línea macho fértil (R), que constituye el grupo restaurador de la fertilidad y de una línea hembra (A), portadora de la AEC. Las líneas R y A son obtenidas separadamente por selección genealógica mediante la autofecundación de seis generaciones sucesivas donde se van seleccionando los mejores individuos. El objetivo principal de un programa de selección es proveer de material vegetal con un buen nivel de producción y una mejor calidad. Las características a mejorar en

los programas de mejoramiento clásico de girasol fueron y lo siguen siendo actualmente:

a. de los componentes del rendimiento:

a1. en grano lo que significa una cantidad elevada de granos producida por unidad de superficie (kg/ha, qq/ha, tn/ha, etc.)

a2. un mayor tenor de aceite y proteína de los granos.

b. de la calidad: una composición particular de ácidos grasos, más porcentaje de ácido linoleico para la utilización alimentaria o mayor porcentaje de ácido oleico para la utilización industrial.

c. de la sanidad: tolerancia a las principales enfermedades, tales como *Mildiu*, *Sclerotinia* y *Phomopsis* y a las principales plagas, tales como: barrenadores de hojas y tallos (*Liriomyza spencerella*) y orugas defoliadoras (*Rachiplusia nu* y *Spilosoma vriginica*)

d. adaptación a diversas condiciones ambientales (estrés abiótico).

Hasta el momento el aumento de la base genética del girasol cultivado *H. annuus* L., puede obtenerse mediante el cruzamiento entre líneas de *H. annuus*, así como entre *H. annuus* y especies salvajes de *Helianthus* y también entre líneas provenientes de la selección masal.

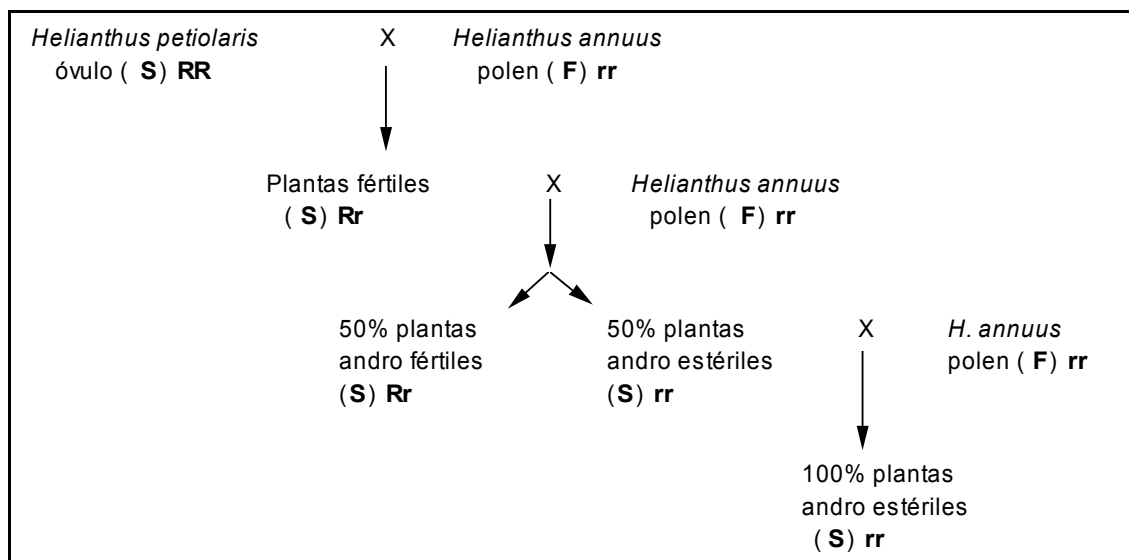


Gráfico 3: Esquema de obtención de plantas androestériles. Ref.: (S) citoplasma origen de esterilidad; (F) citoplasma origen de fertilidad; r: gen mantenedor de la fertilidad; R: gen restaurador de la fertilidad, dominante. Fuente: Knittel, N. (1992).

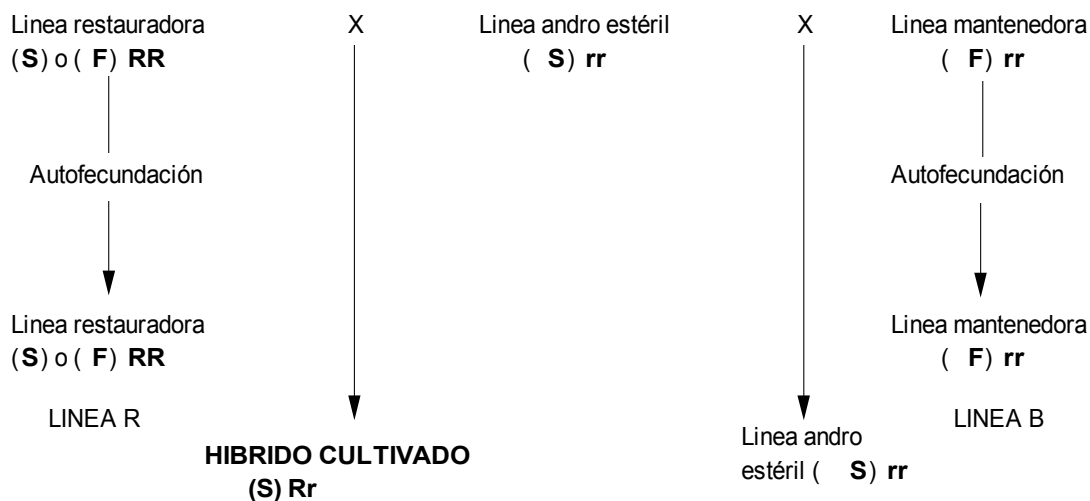


Gráfico 4: Esquema de obtención de un híbrido comercial. Fuente: Knittel N., 1992.

1.4.1. Aportes de la biotecnología al mejoramiento

Las técnicas de cultivo de tejidos *in vitro* han sido utilizadas en programas de mejoramiento clásicos de girasol. Un ejemplo de ello ha sido el rescate de embriones inmaduros. Esta técnica permite el desarrollo de varias generaciones por año del cultivo en los programas de mejoramiento y conlleva la aceleración de las etapas del programa de selección.

La asociación de la biotecnología con el mejoramiento clásico permite también sortear las barreras de incompatibilidad y de esterilidad encontradas en los cruzamientos interespecíficos. Un ejemplo lo constituye la fusión de protoplastos de distintas especies de girasol (*H. annuus* con *H. petiolaris* y *H. annuus* con *H. debilis*) (Alibert, 1994). En este sentido, la posibilidad de obtener plantas transgénicas permitirá incorporar caracteres de diversa índole. De esta forma la selección y la biotecnología aparecen como herramientas complementarias para la producción y la comercialización de híbridos agrónomicamente y económicamente interesantes.

2. LAS TÉCNICAS DE REGENERACION Y TRANSFORMACION APLICADAS A LAS PLANTAS SUPERIORES

Se entiende por transformación genética vegetal, a la tecnología que permite la obtención de organismos vivos modificados, o sea, cualquier organismo vivo que

posea combinación nueva de material genético que se haya obtenido mediante la aplicación de la biotecnología moderna (Protocolo de Cartagena, 2000).

Entre los objetivos de la transformación genética de plantas superiores se encuentran la introducción en el genoma vegetal de caracteres que permitan superar limitaciones de tipo biótico o abiótico del cultivo, mejorar la calidad alimentaria, incorporar genes para la producción de biomoléculas, etc. La introducción de genes foráneos en las células vegetales por vía no sexual necesita de la intervención de una técnica de transformación. Cualquiera sea la técnica de transformación usada, la aplicación de ésta implica necesariamente la puesta a punto de una técnica de regeneración. La asociación de la técnica de regeneración y la técnica de transformación conducirá a la regeneración de células transformadas y finalmente a la obtención de la plantas transgénicas.

Dos técnicas son actualmente utilizadas para la obtención de plantas transgénicas; la transformación indirecta, mediante la utilización de vectores como *Agrobacterium tumefaciens*, y la transformación directa, mediante el bombardeo de microproyectiles o biolística. El éxito de esta asociación dependerá de un cierto número de parámetros biológicos propios de cada técnica y de cada especie vegetal en particular. Una descripción de estas técnicas es presentada más adelante.

2.1. UTILIZACIÓN DE LA TRANSFORMACIÓN GENÉTICA COMO HERRAMIENTA PARA EL MEJORAMIENTO VEGETAL

La biotecnología constituye una alternativa interesante para los mejoradores para incrementar el valor de las especies vegetales comerciales. Mediante la transformación genética es posible introducir genes foráneos en las células de las especies económicamente importantes. Estos genes pueden dividirse en 5 categorías principales y algunos ejemplos de ellos se muestran en la tabla 1. Además de la categoría de los genes marcadores, los cuales son usados esencialmente para verificar el de las plantas producidas, la utilización de las otras categorías de genes confiere nuevos caracteres a las especies (resistencia a patógenos, herbicidas) permite mejorar un carácter existente (tenor de lípidos, proteínas) preservando, a su vez, los caracteres existentes.

Estas técnicas de transformación han permitido hasta la fecha, la obtención de plantas enteras genéticamente transformadas de más de 50 especies vegetales de las cuales 25 de ellas han sido probadas a campo a partir de 1986. Estas pruebas a campo de plantas genéticamente modificadas es una etapa indispensable antes de la comercialización. Estos ensayos permiten evaluar el comportamiento de las plantas en condiciones naturales, demuestran la posibilidad del cultivo a gran escala y además permiten probar la inocuidad de tales cultivos para el ambiente.

Tipos de genes	Utilidad
Genes marcadores (seleccionables) Genes marcadores (indicadores o reporteros)	Resistencia seleccionable a antibióticos Visualización del producto de la actividad de la β -glucoronidasa Visualización del producto de la actividad de la luciferasa o de la proteína verde fluorescente (fluorescencia)
Genes para manejo de malezas	Resistencia a herbicidas
Genes para control de patógenos y plagas	Resistencia a virus Resistencia insectos
Genes para el mejoramiento de la calidad nutricional de las plantas	Reducción de la actividad poligalacturonasa Modificación de la composición de ácidos grasos Modificación del tenor de almidón
Genes que codifican para otros productos	Síntesis de moléculas farmacéuticas Síntesis de moléculas industriales Síntesis de antígenos (vacunas orales)

Tabla 1: Diferentes categorías de genes que pueden ser introducidos en las plantas superiores.

2.1.1. RESISTENCIA A PATOGENOS

2.1.1.1 RESISTENCIA A VIROSIS

Se han propuestos diferentes estrategias para la obtención de plantas resistentes a uno o varios virus mediante la interferencia a diferentes niveles del ciclo de

multiplicación viral. Una de estas estrategias consiste en introducir el gen de la proteína de cápside de los virus en el genoma de las células vegetales. La estrategia de la proteína de cápside ha sido aplicada con éxito en algunas especies vegetales importantes económicamente como tomate (Sander et al., 1992), papa (Jongedijk et al., 1992) y papaya (Fitch et al., 1992). Las plantas que expresan la proteína de cápside presentan menos lesiones, un retardo o ausencia total de síntomas característicos de la virosis y también se ha encontrado un menor número de partículas virales en el tejido infectado (Beachy et al., 1990).

Otra de las estrategias usadas en la lucha contra las infecciones virales de plantas, es la expresión de ARN antisentido, complementarios al ARN viral, lo que bloquea la replicación del virus o la traducción de proteínas del mismo (para revisión ver Nejdat et al., 1990).

Otras estrategias se basan en la resistencia mediada por silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS), o ARN mensajero. La estrategia consiste en desencadenar en las plantas un mecanismo de degradación específica del ARN viral que se denomina co-supresión o silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) (Voinnet 2001). Esta degradación del ARN elimina la mayor parte o todo el ARN que es muy similar a las secuencias que desencadenaron el silenciamiento, obteniéndose de esta manera resistencia a la infección viral.

2.1.1. 2. RESISTENCIA A INSECTOS

En la lucha contra el ataque de insectos de los cultivos, los insecticidas de cuarta generación, también llamado bio-insecticidas, a base de esporas y de cristales de proteínas de *Bacillus thuringiensis* se han encontrado eficaces contra más de 50 especies de lepidópteros (Wilcox et al., 1986). Durante la esporulación, las cepas de *B. thuringiensis* producen inclusiones cristalinas proteicas que, ingeridas por los insectos en estado larval, son clivadas por las proteasas intestinales y los fragmentos formados poseen la actividad insecticida (Hannay, 1953).

La mayoría de las toxinas producidas por las distintas cepas de *B. thuringiensis* presentan actividad insecticida. Estas endotoxinas son inocuas tanto para otros

insectos como para los vertebrados. Esta especificidad permite la utilización de las mismas en un amplio rango de cultivos.

Varios de los genes que codifican para los cristales proteicos con actividad insecticida han sido aislados y clonados de diferentes cepas de *B. thuringiensis* e integrados a los genomas de distintas especies vegetales para la lucha contra las plagas. Esta estrategia es actualmente la más utilizada y ha permitido la producción de plantas de tomate (Delannay et al., 1989) tabaco (Peferoen, 1992) y algodón (Perlak et al., 1990) resistentes a lepidópteros en condiciones de cultivo a campo. Los primeros ensayos a campo fueron efectuado con tabacos resistentes a lepidópteros, tales como *Manduca sexta* y *Heliothis virescens*. Actualmente ya se comercializan una variedad de algodón e híbridos de maíz resistentes a insectos por expresión de un gen de *Bacillus thuringiensis*. En este último cultivo se ha observado evitar el ataque de los insectos, produjo también una disminución considerable del ataque de hongos fitopatógenos a nivel del cuello de la planta, previniendo de esta manera la aparición de micotoxinas.

2.1.1. 3. RESISTENCIA A HONGOS

Las enfermedades fúngicas de los cultivos vegetales no presentan limitaciones de ser tratadas con agroquímicos en cuanto a su consecuencia ambiental, pero los hongos patógenos son capaces de adquirir resistencia generación tras generación, fenómeno que es exacerbado por las aplicaciones periódicas de fungicidas. Además, esta práctica resulta antieconómica para la mayoría de los cultivos extensivos. Las plantas transgénicas ofrecen una alternativa para la lucha contra las enfermedades fúngicas. Tres categorías de genes son susceptibles de conferir resistencia a hongos en variedades cultivadas (Cornelissen & Melchers, 1993):

- genes que codifican para enzimas implicadas en la síntesis de compuestos tóxicos para los hongos tales como las fitoalexinas,
- genes que codifican para proteínas con efectos inhibitorios sobre el crecimiento de los patógenos, tales como las quitinasas y las glucanasas,
- genes que codifican para inhibidores de enzimas fúngicas.

En 1991 se publicó el primer caso de una planta transgénica de tabaco con aumento en los niveles de resistencia al hongo *Rhizoctonia solani*, mediante la expresión constitutiva de un gen de quitinasa básica que poseía un probado efecto antifúngico *in vitro* (Broglie et al. 1991). Desde entonces, han aparecido varios trabajos sobre plantas transgénicas de tabaco, petunia y papa con mayores niveles de resistencia al

ataque de hongos y bacterias patógenas. Dicha resistencia se obtuvo mediante la expresión constitutiva o inducible de genes vegetales que codifican proteínas de defensa tales como quitinasa, β -1,3-glucanasa, proteína inactivadora de ribosomas de hongos (RIP), proteínas tipo taumatina (AP24), tioninas y enzimas involucradas en las síntesis de fitoalexinas.

2. 1. 2. RESISTENCIA A HERBICIDAS

La competencia entre las especies vegetales cultivadas por su interés agronómico y otras especies invasoras de los cultivos (denominadas malezas), obligan a la aplicación de tratamientos químicos y son las responsables de grandes pérdidas de cosecha. Con el fin de reducir estas pérdidas, la industria fitosanitaria ha desarrollado productos químicos con acción herbicida y además se han seleccionado variedades de especies cultivadas naturalmente resistentes a ciertos químicos o se han seleccionado mutantes por cultivo *in vitro*. Además, se han aplicado estrategias con plantas transgénicas resistentes a ciertos herbicidas (Howard & Baszczyński, 1992).

Las plantas transgénicas resistentes a herbicidas pueden obtenerse mediante distintas estrategias. Eckes et al., (1989) obtuvieron plantas de tabaco resistentes a dosis de L-fosfinotricina cuatro veces mayores que las utilizadas a campo mediante la sobreexpresión del gen de la glutamina sintasa de alfalfa. Actualmente, en Argentina se ha difundido ampliamente la producción de soja transgénica tolerante al herbicida glifosato (Begenisic, 2002).

2.2. TRANSFORMACION GENETICA MEDIANTE *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

2.2.1. *Agrobacterium tumefaciens*

En 1907, Smith y Tonwsend presentaron evidencias de que la bacteria hoy llamada *Agrobacterium tumefaciens* es el agente causal de la agalla de corona, enfermedad neoclásica de vegetales, ampliamente distribuida. Casi todas las especies vegetales

son susceptibles a esta enfermedad que se produce generalmente cuando la planta ha sufrido algún daño a la altura de la corona (unión entre el cuello de la raíz y el hipocótilo). El agente causal de esta enfermedad, la bacteria *Agrobacterium*, es un habitante natural de los suelos y hasta el momento se han identificado 2 especies de este género capaz de provocar "malformaciones genéticas adquiridas". La otra especie (*A. rizogenes*) provoca la proliferación desorganizada de raíces; actualmente esta especie ha sido usada como vector para la transformación de ciertas especies que son menos susceptibles a *A. tumefaciens*.

Agrobacterium tumefaciens es una α -proteobacteria dentro de la familia de las Rhizobiaceae. De esta familia ya se han secuenciado los genomas de bacterias simbióticas fijadoras de nitrógeno como *Sinorhizobium meliloti* y *Mesorhizobium loti*, bacterias del género *Rickettsia* y *Caulobacter crescentus*.

2.2.2. El Plásmido Ti

Se ha descrito que las cepas virulentas de *A. tumefaciens* poseen un plásmido que contiene genes involucrados en la inducción de la agalla. Debido a su rol en la inducción de tumores en plantas este plásmido fue llamado Ti (del inglés: tumor induction, inductor de tumores).

Las células de las agallas de corona son tumorales, es decir que son capaces de proliferar autónomamente en la ausencia de fitohormonas (auxinas y citoquininas) requeridas para el crecimiento de las células de plantas normales. Otra característica de estas células es que producen y excretan derivados de azúcares y aminoácidos que no son sintetizados por las células normales. Estos compuestos específicos del tumor son llamados opinas. El tipo de opina formado por las células de las agallas de corona dependen de la cepa infecciosa de *Agrobacterium*. Así, las distintas cepas pueden ser clasificadas, según el tipo de opinas que produzcan los tumores causados por ellas, como cepas del tipo octopina, nopalina, succinamopina, o leucinopina.

El hecho de que las células de la agalla de corona difieran de las normales en estas dos características, motivó la búsqueda de DNA de *Agrobacterium* en las células de la agalla. Usando el método de Southern blot, se encontró que las cepas con plásmidos del tipo de octopina, eran excepcionales ya que dos segmentos del

plásmido Ti se transferían a las células de manera independiente. En todos los casos el T-DNA se hallaba en el genoma nuclear de las células, y nunca ausente o en organelas. Se encontró que el T-DNA corresponde a un segmento preciso del plásmido Ti, y que no ocurren permutaciones en su integración en el genoma de la planta. La secuenciación de las regiones T de distintos plásmidos Ti demostró que estas regiones están bordeadas por una repetición directa de 24 pb. Como ninguna línea tumoral contenía secuencias originalmente por afuera de estas repeticiones directas, se asumió que estas regiones repetidas funcionaban como señales de reconocimiento para el aparato de transferencia.

El T-DNA contiene una serie de genes que se expresan en las células transformadas. Estos genes son reconocidos por factores de transcripción de la planta. Mediante análisis de secuencia se demostró que, efectivamente, estos genes bacterianos tienen señales de expresión de tipo eucariota, como por ejemplo secuencias consenso del tipo "TATA-box", para la iniciación de la transcripción y AATAAA, involucradas con la terminación de la traducción y la poliadenilación. La integración del T-DNA ocurre al azar en el genoma, por recombinación ilegítima en zonas cortas de homología y es acompañada por deleciones pequeñas (de entre 29 y 73 pb) en el sitio de inserción. Las regiones transcripcionalmente activas son "preferidas" debido a que son más accesibles a la invasión por DNA exógeno debido a la desorganización de los nucleosomas y otras estructuras de la cromatina (Zambriski, 1992).

2.2.3. Colonización genética

El proceso de inducción de las agallas de corona consiste en un número de pasos discretos y definidos. Tanto para permitir la entrada de las bacterias como para que se induzca el sistema de virulencia de las mismas, es necesaria la herida de la planta. Las bacterias pueden multiplicar en los tejidos de conducción y se pegan a las paredes de las células en la herida. A continuación el T-DNA es transferido y expresado en las células de la planta aún antes de la integración luego de la cual, los niveles de expresión del T-DNA son mantenidos a un nivel estable dependiendo del lugar de inserción. Debido a las continuas divisiones desencadenadas por los altos niveles de auxina y citoquininas aparecen los típicos tumores (agallas de

corona) que consisten en un mezcla de células transformadas (conteniendo al T-DNA) y normales (Zupan y Zambryski, 1995).

2.2.4. MECANISMOS MOLECULARES DE LA TRANSFERENCIA DEL T-DNA

El procesamiento y transferencia del T-DNA está mediado por los productos derivados de la región *vir*, la cual está también en el plásmido Ti (Stachel and Nester, 1986). Estos genes *vir* cuyos productos están directamente involucrados en el procesamiento y transferencia del T-DNA, están regulados de manera que se expresan sólo ante la presencia de células vegetales dañadas, que serán su objeto de infección. El control de esta expresión está mediado por las proteínas VirA y VirG (Winans, 1992). VirA detecta los compuestos fenólicos secretados por las células vegetales dañadas y se autofosforila. La fosforilación de VirA y de VirG activa luego la transcripción de los genes *vir*. Una vez producida la inducción, VirD1 y VirD2 reconocen una secuencia de 25pb y cliva mediante acción endonucleotídica los bordes de la cadena de DNA para liberar una cadena simple (cadena-T). Luego del corte, VirD2 queda unida al extremo 5' y este extremo lidera el movimiento de la cadena de DNA en los próximos pasos. La cadena-T debe atravesar numerosas membranas y espacios celulares para llegar al núcleo de la célula vegetal. Para preservar su integridad se ha propuesto que lo hace acompañada con proteínas (VirE2). VirE2 cubre la cadena-T previniendo la degradación por nucleasas. La cadena-T unida a las proteínas VirD2 y VirE2, se denomina complejo-T. El complejo-T luego debe salir de la bacteria (pasando a través de las membranas interna y externa y la pared celular. Los genes *virB* estarían involucrados en la transferencia del complejo-T fuera de la bacteria. Algunos productos de los genes *virB* formarían un complejo asociado a la membrana similar a un pilus. Otras proteínas VirB proveerían de energía asistiendo al complejo-T. El complejo-T también debe atravesar la pared celular vegetal y la membrana plasmática. Una vez que ingresó a la célula vegetal, el complejo-T se dirige al núcleo, atraviesa la membrana nuclear y se integra al cromosoma de la planta. El paso a través de la membrana nuclear implica atravesar un poro nuclear, esta acción sólo podría ser cumplimentada mediante la presencia de las proteínas como VirD2 o VirE2. Posiblemente VirD2 inicia la entrada al núcleo y asegura que el extremo 5' de la cadena-T entre primero.

El estudio de la importación al núcleo ha dado lugar a numerosos descubrimientos en relación a la relación de las señales de conjugación entre planta-bacteria. Se ha observado que la importación al núcleo de VirE2 y VirD2 está mediada por proteínas unidas a señales de localización nuclear (NLS), que no son producidas en todos los tipos de células vegetales. Dependiendo de cuál grupo de proteínas NLS se están expresando en cada tipo celular, se estarían admitiendo distintos subgrupos de factores de transcripción en el núcleo. El último paso de la transferencia de la cadena-T es la integración al cromosoma. Este mecanismo aún no se conoce en profundidad, pero el mejor modelo postula una integración mediante recombinación ilegítima. Consistiría en que el extremo 5' unido al VirD2 se uniría al un sitio del DNA que posee una ruptura. El DNA vegetal se desenrollaría dejando un agujero y el extremo 3' de la cadena-T se aparearía con otra región cercana del DNA. Las enzimas reparadoras u de recombinación luego unen covalentemente el extremo 3'. La integración final es el resultado de la reparación enzimática del agujero y de la síntesis de DNA usando como molde la cadena-T. (Zupan y Zambryski, 1995).

Por introducción del T-DNA en células de plantas por transferencia directa, se encontró que el T-DNA por sí mismo es suficiente para provocar la transformación de células normales a células tumorales. Esta fue la primer evidencia que los genes *chv* y *vir* no cumplían un rol esencial en la oncogenicidad sino que determinaban el aparato necesario para la transferencia in vitro del T-DNA de *Agrobacterium* a la célula de la planta. En el cromosoma circular se encuentran los genes *chvAB*. *ChvA* y *chvB* son necesarios para que las Abrobacterias se peguen a las células de la pared de la planta. El gen *chvB* codifica para una proteína de 235 kDa involucrada con la formación de β -1,2 glucano cíclico mientras que hay evidencias de que *chvA* determina una proteína de transporte de β -1,2 glucano al periplasma. Esto podría indicar un rol del β -1,2 glucano en la fijación de la bacteria a la pared celular. Otros genes como *chvG1*, *chvE* y *ros* están también involucrados en la regulación de los genes *vir* del plásmido Ti y de los genes *chvD*, *chvH* y *acvB*. A su vez en el cromosoma lineal de la cepa C58 se ubica el gen *exoC*, que se requiere para la síntesis extracelular de los polisacáridos β -1,2 glucano y succinoglucano, y los genes de síntesis de celulosa (*cel*) involucrados en la unión a las células de la planta (Goodner y col 2001).

2.2.4.1. Regulación de los genes de virulencia

Con la excepción de los genes *vir A* y *vir G* los operones *vir* no son transcritos durante el crecimiento vegetativo normal (Stachel et al., 1986). Una de las etapas más tempranas en el proceso de inducción de tumores, consiste en la activación coordinada del sistema de virulencia cuando una bacteria está cerca de tejidos vegetales heridos y sensa los factores exudados por las células. Los genes *chv* se expresan constitutivamente. Los genes *vir*, en cambio, permanecen silenciosos hasta que son inducidos por ciertos factores de la planta identificados por Stachel como compuestos fenólicos llamados acetosiringona y α -hidroacetosiringona (Stachel et al., 1985). Estos compuestos se liberan del tejido de la planta herido. Distintos fenoles substituidos son responsables de la inducción de los genes *vir* en diferentes especies o tejidos dentro de una misma especie. Por ejemplo la α -acetosiringona es el inductor más importante producido por solanáceas como tabaco, tomate y papa. En otras especies los ácidos benzoico o cinámico son los inductores de estos mismos genes (Song et al., 1991a, Spencer et al., 1991). Las células de trigo en suspensión liberan etilferulato como inductor (Messens et al., 1990). En girasol, Lewi et al. (1996) encontraron que la α -acetosiringona agregada al medio de cocultivo no produce incrementos en la eficiencia de transformación, pero modifica los patrones de distribución en los tejidos de los eventos de transferencia del T-DNA. Algunas otras plantas producen compuestos inhibidores de la inducción *Vir* (Sahi et al., 1990). La inducción del sistema *Vir* puede ser cuantificada utilizando cepas indicadoras que llevan un promotor de un gen *vir* ligado a un gen indicador como el *lac Z* (codifica para la β -galactosidasa) de *E. coli*. La actividad de esta enzima es fácilmente medible utilizando substratos como el 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -d-galactopiranosido (X-gal) que libera un compuesto coloreado luego de la acción de esta enzima. Usando esta estrategia, se vio que para obtener una óptima inducción de los genes *vir*, se deben cumplir ciertas condiciones. El pH del medio debe ser entre 5 y 6, la temperatura debe ser entre 20 y 30°C, en el medio de reacción se debe evitar la presencia de extracto de levadura y debe haber un alto contenido de azúcar. Este requisito es especialmente importante cuando escasean

los compuestos fenólicos antes mencionados. El nivel máximo de estimulación del sistema Vir, también varía para las diferentes cepas de *Agrobacterium*.

2.2.4.2. La cepa C58

La cepa de *Agrobacterium* C58 se aisló de un tumor en un árbol de cerezo (*Prunus*) y se caracterizó como portadora de dos plásmidos: pAtC58 y el pTiC58 (de tipo nopalina-agrocitopina). En el año 2001 se publicaron paralelamente dos artículos en donde se describe el genoma de la cepa C58 y se atribuyen funciones a los genes identificados hasta el momento. Ambos grupos describen que los genes de *Agrobacterium* están distribuidos en cuatro piezas de DNA: un cromosoma linear y uno circular que llevan cerca de mil genes y dos DNA circulares pequeños llamados plásmidos. Todos esos DNAs tienen funciones en la interacción planta-bacteria. Un grupo, el liderado por Slater, puntualizó sus investigaciones sobre los genes para enzimas que harían que At utilice los nutrientes de la planta (incluyendo celulosa y péptidos) (Goodner, 2001). El grupo de Nester encuentra que At no usa el tipo de genes que generalmente utilizan los patógenos para acceder al hospedante (Wood, 2001). Carecería del sistema de secreción de tipo III, responsable de la patogenicidad en muchas bacterias y en su lugar tiene tres versiones del sistema tipo IV (relacionado con las bacterias patógenas de animales *Brucella* y *Bartonella*). Ambos grupos también reportan que la secuenciación completa del genoma de C58 reveló muchas similitudes con el genoma de *Sinorhizobium meliloti*, concluyendo que ambos microorganismos poseen un antecesor común reciente y postulan que deberían pertenecer al mismo género.

En el genoma de 5,67 kpb de C58 predicen la existencia de 5429 genes que codifican para alguna proteína; le asignan putativas funciones a 3475 de esos genes (64,1%). El resto de los 1944 genes incluyen 1236 genes hipotéticamente conservados, cuyos preproductos previsibles son similares a proteínas sin función conocida en otros genomas, y 708 genes hipotéticos sin apareamientos significativos con otras secuencias en el banco de datos. Wood y col (2001) hipotetizan que el cromosoma lineal deriva de un plásmido. Los genes involucrados en los procesos más esenciales se encuentran mayormente en el cromosoma circular.

2.3. TRANSFORMACIÓN GENÉTICA POR BOMBARDEO DE MICROPROYECTILES

Algunas especies de plantas, en general monocotiledóneas, no son naturalmente susceptibles al *Agrobacterium*. En este sentido, la transformación de cereales condujo al desarrollo de técnicas de transferencia directa de genes para estas especies. Las técnicas más usadas hasta el momento incluyen a la electroporación de tejidos, protoplastos y células en suspensión, la transferencia directa de genes por polietilenglicol (PEG), la microinyección y el bombardeo de microproyectiles o método biolístico.

El método de transformación biolístico fue descrito inicialmente por Sanford et al. (1987). Este proceso consta de la introducción de sustancias, como ácidos nucleicos, en células o tejidos intactos por medio de microproyectiles a alta velocidad; de esta manera las partículas penetran la pared celular y la membrana plasmática.

El equipo diseñado originalmente (figura 2) consta de una cámara conectada a un tubo de helio obstruida por una o más membranas de ruptura (Kapton 2000, de 50 μm de espesor), cada una de las cuales soporta 400 PSI de presión. Cuando la presión de helio supera la resistencia de la/s membrana/s, éstas se rompen y el gas impulsa una membrana transportadora (que porta el DNA adsorbido en partículas de tungsteno) ubicada por debajo de las membranas de ruptura. La membrana transportadora se desplaza una distancia variable y es retenida por una malla metálica mientras que los microproyectiles se despegan, ingresan a la cámara con vacío donde están los explantos e impactan en los tejidos blanco. Con este equipo fue posible transformar cebolla, tabaco, maíz, arroz, trigo, soja, papaya, etc. (Klein et al., 1988), a partir de diversos tejidos incluyendo embriones inmaduros, callos embriogénicos, suspensiones celulares, meristemas y microsporas.

El cañón génico se ha utilizado no sólo para la transformación de plantas sino también para células animales (Johnson et al., 1991) y bacterias (Smith et al., 1992). Cuando se intenta transformar por biolística un tejido determinado, es necesario ajustar los parámetros involucrados en el sistema para optimizar el proceso. Alguno de los parámetros son: presión de helio (que se da por el número o grosor de las membranas de ruptura), distancia entre las membranas de ruptura y la

transportadora, distancia entre la membrana transportadora y la malla de retención, nivel de vacío de la cámara donde se encuentran los explantos y la distancia entre la malla de retención y el tejido blanco.

3. BIOTECNOLOGIA APLICADA AL CULTIVO DE GIRASOL

3.1. REGENERACION DE PLANTAS DE GIRASOL

La regeneración de plantas de girasol se ha realizado por distintas estrategias que incluyen la organogénesis directa (sin el pasaje por un estadio de callo) la organogénesis indirecta (mediante la inducción de callos derivados de distintos tejidos), la embriogénesis somática y más recientemente la multiplicación vegetativa. En cuanto a la organogénesis directa, el primer intento por regenerar plantas enteras de girasol fue realizado por Hendrickson en 1954 usando puntas de ápices. Este fue uno de los primeros trabajos donde se probó la capacidad de regeneración de un gran número de genotipos. Posteriormente, Paterson en 1984, utilizando más de 100 genotipos distintos, mostró las concentraciones óptimas de citoquininas para la inducción de yemas para cada uno de los genotipos ensayados. En la mayoría de los genotipos usados, logró la inducción de yemas, pero reportó dificultades para el enraizamiento de las mismas y floración precoz en las plantas obtenidas, por lo cual no obtuvo producción de semillas. Todos los trabajos subsiguientes sobre regeneración de girasol por organogénesis directa estuvieron estrechamente relacionados con las condiciones de cultivos reportadas por Paterson. En Argentina, Ceriani et al. (1992) propuso el uso de cotiledones de embriones maduros como fuente de explanto para la regeneración de un gran número de genotipos de interés local. En condiciones óptimas, el 50 % de los genotipos estudiados respondieron positivamente a la inducción de yemas y en los casos más favorables, del 50 al 90 % de las yemas regeneradas produjeron plantas viables. En la tabla 2 se muestra los resultados de trabajos que reportaron regeneración de girasol por organogénesis directa.

La regeneración por organogénesis indirecta se realiza a través de la inducción de yemas sobre callos iniciados de distintos tejidos (tabla 3), a partir del primer trabajo de Heaton (1983), varios autores han intentado la regeneración de girasol por esta

vía. Punia y Bohorova (1992) lograron regenerar plantas enteras de distintos genotipos de girasol salvaje y mostraron que la capacidad de regeneración está condicionada por el genotipo, la naturaleza del explanto y el contenido de hormonas del medio de cultivo.

REF.	GENOTIPOS	EXPLANTO	DESARROLLO	TIEMPO REG. (DIAS)	OBSERVACIONES
(1)		Puntas de ápices	Plantas enteras en floración	NI	Obtención de plantas libres de patógenos
(2)		Puntas de ápices	Plantas enteras en floración	110-115	
(3)	Issanka, Record Airelle	Puntas de ápices	Plantas enteras en floración	180	
(4)	Ha89b, SS, 405B, Ha109	Puntas de ápices	Plantas enteras en floración	NI	Estudio sobre requerimiento hormonal, dificultades de enraizamiento, floración precoz
(5)	Sannace	Cotiledones, hojas, de ápices, hipocótilos	Plantas enteras en floración	NI	Respuestas diferenciales de acuerdo al tipo de explanto
(6)	Franksol, Corflor	Segmentos nodales	Plantas enteras	NI	
(7)		Puntas de ápices	Plantas en floración	NI	Floración precoz de las plantas obtenidas
(8)		cotiledón, hipocótilo y epicótilos	Plantas enteras	NI	Floración precoz de las plantas obtenidas
(9)		Cotiledón	Yemas enraizadas	49	
(10)	Ha300a, Ha300b, Ha84a, Ha89b, Ha699b, Ha401b, Rha274, Mirasol	Cotiledón	Plantas en floración	120-180	Floración precoz de las plantas obtenidas. Plantas con crecimiento detenido
(11)	Ha300b, Pha67a, Pha67b, HaR2, Rha271, Rha801, Rha274, Ha89a, Ha124, Ha822a, NX142, NX136	Cotiledón	Plantas enteras en floración	NI	Estudio de susceptibilidad a <i>Agrobacterium</i> para el uso de explantos de cotiledón para la transformación genética.

Tabla 2: Regeneración de *H. annuus* por organogénesis directa. Referencias: (1) Hendrikson, 1954, (2) Paal et al., 1981, (3) Trifi et al., 1981, (4) Paterson, 1984, (5) Greco et al., 1984, (6) Knopp y Mix, 1986, (7) Lupi et al., 1987, (8) Schettlet y Mix, 1988, (9) Nataradja y Ganapathi, 1989, (10) Knittel et al., 1991, (11) Ceriani et al., 1992. NI: no indicado.

REF	GENOTIPOS	EXPLANTO	DESARROLLO	OBSERVACIONES
(1)		Embrión inmaduro	Plantas enteras	Escaso enraizamiento
(2)	Sannace	Punta de ápice e hipocótilo	Plantas enteras	
(3)	Híbridos interespecíficos	Segmento de tallo, punta de ápice y anteras	Yemas y plantas enteras	Escaso enraizamiento
(4)	Ha849, 455, 468, 461	Cotiledón de embrión inmaduro	Yemas y ocasionalmente plantas enteras	Dependencia genotípica
(5)	Argentario	Hipocótilo, cotiledón	Plantas enteras	Floración precoz
(6)		Embrión inmaduro	Plantas enteras	
(7)	Híbridos interespecíficos	Embrión inmaduro	Plantas enteras	Floración precoz, vitrificación escaso enraizamiento
(8)		Embrión inmaduro	Yemas	
(9)		Embrión inmaduro	Plantas enteras	Plantas en floración
(10)	59 genotipos	Embrión inmaduro	Yemas	Alta interacción genotipo/medio de cultivo
(11)	CANP 3A, CANP 3B	Embrión, hipocótilo	Plantas enteras	Diferencias genotípicas
(12)	19 líneas y 11 híbridos comerciales	Cotiledón	Plantas enteras	Buen enraizamiento independiente del genotipo
(13)	Especies salvajes de <i>Helianthus</i>	Hoja, tallo y yemas axilares	Plantas enteras	Dependencia del genotipo, explanto y concentración hormonal

Tabla 3: Regeneración de girasol por organogénesis indirecta. Referencias: (1) Heaton, 1983, (2) Greco et al., 1984, (3) Bohorova et al., 1985, (4) Power, 1987, (5) Lupi et al., 1987, (6) Wilcox, 1988, (7) Witrzens et al., 1988 (8) Espinasse et al., 1989, (9) Espinasse-Gelner y Lay, 1988, (10) Espinasse y Lay, 1989, (11) Prado y Bervillé, 1990, (12) Chraibi et al., 1992, (13) Punia y Bohorova, 1992.

La embriogénesis somática en girasol fue reportada por primera vez por Paterson y Everett en 1985 a partir de callos embriogénicos obtenidos de segmentos de hipocótilos de plantas de 10 días de germinación. Posteriormente otros autores reportaron embriogénesis somática en girasol obtenida por métodos indirectos -pasaje por estadio de callo- y directos -sin pasaje por estadio de callo- (tabla 4).

El cultivo de suspensiones celulares también fue usado como fuente de embriones somáticos (Prado y Berville, 1990), sin embargo no se han publicado reportes donde se muestre la regeneración de plantas completas a partir de los embriones obtenidos por esta vía.

REF.	ESPECIES	GENOTIPOS	EXPLANTOS	TIPO DE EMBRIO-GENESIS	OBSERVACIONES
(1)	<i>H. annuus</i>	SS415b, 100 líneas experimentales	hipocótilo	Indirecta	Dependencia genotípica
(2)	<i>H. annuus</i>	HA401, HA699	embriones inmaduros	Directa	Concentración crítica de sacarosa
(3)	<i>H. annuus</i>		embriones inmaduros	Indirecta	
(4)	<i>H. annuus</i>	HA55, HA300, Rassvit, HA89*3HR	hipocótilo	Indirecta	Dependencia genotípica.
(5)	<i>H. annuus</i>	41a	embriones inmaduros	Directa	Concentración crítica de sacarosa
(6)	<i>H. annuus</i>	T76b, HA89b, HA291b, HA300b, HA303b, RT26	hipocótilo y cotiledón de embrión inmaduro	Directa	Embriones pequeños, floración precoz
(7)	<i>H. annuus</i>	HA300b	tejido epidérmico de hipocótilo	Directa secundaria	Embriones pequeños, dificultades de enraizamiento, floración precoz
(8)	<i>H. petiolaris</i> sp <i>H. annuus</i>		suspensiones celulares derivadas de callos de hipocótilo	Directa	
(9)	<i>H. annuus</i>	HA300, RHA274	embriones inmaduros	Directa	Embriones pequeños pero fértiles. Efectos de la planta donante
(10)	<i>H. annuus</i> x <i>H. tuberosus</i>		hojas	Directa	
(11)	<i>H. annuus</i>		hojas	Directa	Obtención de yemas adaxiales

Tabla 4: Regeneración por embriogénesis somática: Referencias: (1) Paterson y Everett, 1985; (2) Finer, 1987; (3) Cooley y Wilcox, 1987; (4) Hartman et al., 1988; (5) Li et al., 1988; (6) Freyssinet y Freyssinet, 1988; (7) Pelissier et al., 1990; (8) Prado y Bervillé, 1990; (9) Jeannin y Hahne, 1991; (10) Fambrini (1996); (11) Konov (1998).

Posteriormente se han publicado trabajos donde se reporta el uso de la técnica de regeneración por multiplicación vegetativa para la obtención de plantas transgénicas de girasol. Esta técnica es una vía de regeneración de yemas a partir de células meristemáticas en división. Schrammeijer, et al., (1990) reportaron el uso de meristemas de embriones maduros divididos longitudinalmente como fuente de

explanto para la transformación genética vía *Agrobacterium*. Knittel et al. (1994) también reportaron el uso del mismo explanto para la obtención de plantas transgénicas utilizando el bombardeo con microproyectiles previo a la infección con *Agrobacterium* y Bidney et al. (1992), usando una estrategia similar de transformación reportaron el uso de meristemas enteros como fuente de explanto para la transformación.

Las técnicas de transformación genética de plantas descritas previamente comenzaron a ser aplicadas en girasol desde 1983, sin embargo el primer artículo publicado donde se reporta la obtención de plantas transgénicas completas data de 1987 (Everett et al., 1987). En las tablas 5 y 6 se muestra un resumen de los distintos artículos publicados de aplicación de técnicas de transformación en girasol donde se especifica el método usado y los resultados obtenidos.

REF.	GEN INTRODUCIDO	EXPLANTO Y METODO UTILIZADOS	EF. (%) ^(*)	RESULTADOS
(1)	Phaseolina		NI	Callos tumorales
(2)	Zeina	Segmentos de tallos, agroinfección	NI	Callos tumorales
(3)	β -galactosidasa	Hipocótilos, agroinfección	NI	Callos tumorales
(4)	gen de maíz	Segmentos de tallos, agroinfección	NI	Callos tumorales
(5)	<i>nptII</i>	Hipocótilos, agroinfección		Plantas transgénicas
(6)	<i>nptII</i>	Hipocótilos, agroinfección	NI	Callos tumorales
(7)	<i>gus</i> y <i>nptII</i>	Meristemas apicales, agroinfección	0.13	Plantas quimeras
(8)	<i>bar</i> y <i>nptII</i>	Hipocótilos, agroinfección	NI	Plantas resistentes a kanamicina
(9)	<i>nptII</i> , <i>pat</i> y <i>gus</i>	Hipocótilos, agroinfección		Callos transgénicos
(10)	<i>nptII</i>	Meristemas apicales, bombardeo con μ partículas previo a agroinfección	12	Plantas transgénicas
(11)	<i>nptII</i> y <i>gus</i>	Idem anterior	14.9	Plantas transgénicas
(12)	<i>gus</i>	Idem anterior	7	Plantas transgénicas
(13)	<i>gus</i>	Meristemas apicales, tratamiento con μ partículas de vidrio previo a la agroinfección	4	Plantas transgénicas
(14)	<i>gus</i>	Plántulas		
(15)	<i>gfp</i>	Hipocótilos, agroinfección	0.1	Plantas transgénicas
(16)	<i>gus</i>	Meristemas apicales		Plantas transgénicas
(17)	<i>gus</i>	Meristemas apicales, sonicación y maceración.	y	Plantas transgénicas

Tabla 5: Transformación genética de girasol. Referencias: (1) Murai et al., 1983; (2) Matzke et al., 1984; (3) Helmer et al., 1984; (4) Goldsborough et al., 1986; (5) Everett et al., 1987; (6) Nutter et al., 1987; (7) Schrammeijer et al., 1990; (8) Hartman, 1991; (9) Escandón y Hahne, 1991; (10) Malone-Schoneberg et al., 1991; (11) Bidney et

al., 1992; (12) Knittel et al., 1994; (13) Grayburn y Vick, 1995; (14) Rao y Rohini, 1999; (15) Müller et al, 2001. (16) Hewezi et al (2002). (17) Weber et al (2003). NI: no indicado. (*) EF: eficiencia de transformación = (nro. transgénicas/explantos totales) x 100.

autor	genotipo	explanto	Cepa At	Otro tratamiento	Gen selectivo	Gen ppal	eficiencia
Schrameijer (1990)	Cv Zebulon	Mer. enteros	EHA101 LBA4404		<i>nptII</i>	<i>gus</i>	2:1500 (0,1%)
Bidney (1992)	Pioneer SMF-3	Mer enteros	EHA101	At + Bomb. At sin Bomb.	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	1:2000 (0,05%)
Malone-Schoenberg (1994)	Híbrido Pioneer 6440 SMF-3	HM	EHA101	At+Bomb.	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	
Knittel (1994)	HA300-Rha27 4-Rha35 6-LG60-LG61	HM 2días germ. 5 días precultivo	LBA4404	At+Bomb.	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	7:220(3,1%)
Burrus (1996)	HA300b	ME y HM	GV2260		<i>nptII</i>	<i>gus</i>	Brotos quiméricos (histoquímico)
Rao and Rohini (1999)	KBSH1	Pl. 2 días de germ. Sin 1 cotiledón	LBA4404		<i>nptII</i>	<i>gus</i>	2% (3 plantas)
Molinier (2002)	HA300b		GV2260	Bomb. con genes ipt (síntesis de citoquininas)	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	6% (histoquímico)
Hwezi (2002)	HA300b, RHA266, HA335, R105	HM	EHA105	At+ Hidratación-deshidratación	<i>nptII</i>	<i>gus</i>	0,22%

Weber (2003)	HA300b	HM	GV2260	Enzimas de maceración Sonicación	<i>nptII</i>	<i>gus</i> o <i>gfp</i>	5,7±3,4% (histoquímico)
--------------	--------	----	--------	-------------------------------------	--------------	----------------------------	----------------------------

Tabla 6: Detalle de los trabajos en que utilizaron meristemas como explantos para la transformación, obtenidos a partir de embriones maduros.

Como se puede observar en la bibliografía, son múltiples los esfuerzos realizados para la obtención de un protocolo cada vez más eficiente desde el punto de vista de la transformación y de la facilidad de manejo del explanto. En todos los casos la eficiencia es baja y los datos volcados provienen en general de ensayos con bajo número de explantos sin referencia acerca de la posibilidad de aumento de escala para aplicarlo en la obtención de plantas transgénicas como método de rutina en el laboratorio para la introducción de genes de interés.

A pesar de la importancia que tiene la Argentina como productor mundial de girasol, no se había desarrollado en nuestro país ninguna aplicación biotecnológica en cuanto a la transformación genética para introducir genes para el mejoramiento de las características agronómicas, o de calidad. Esta situación significaba la imposibilidad de un mejoramiento genético del cultivo por métodos no clásicos; considerando las posibilidades potenciales que la biotecnología ofrece en este aspecto (plantas resistentes a insectos, a herbicidas y a patógenos, calidad de aceite, etc.) la falta de desarrollo de esta tecnología implica una gran inversión de tiempo y esfuerzo para obtener estos resultados por los métodos clásicos. El desarrollo y aplicación de técnicas biotecnológicas hace posible, entre otros objetivos, la introducción de genes foráneos al genoma de girasol, independientemente del origen de los mismos, objetivo que no es posible de alcanzar por los métodos clásicos. Considerando esta problemática, en el Instituto de Biotecnología se planteó como objetivo el desarrollo de un protocolo propio de transformación de girasol sobre genotipos de acceso público o pertenecientes al INTA, que fuera posible de aplicar para la introducción de genes de interés para la agricultura. En este trabajo se describen los resultados obtenidos de los ensayos tendientes a lograr dicho objetivo, en los cuales se estudió la receptividad de diversos genotipos y el derrotero en que se usaron distintos explantos para la

transformación genética utilizando variedad de técnicas (biobalística, *Agrobacterium* y combinaciones de ambas con variantes) y las respuestas de los mismos ante condiciones de cultivo para la regeneración directa e indirecta para llegar a un protocolo de alta reproducibilidad, eficiencia aceptable, sencillo y de bajo costo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar los parámetros y variables que influyen en el proceso de interacción entre el explanto de girasol y *Agrobacterium* y en la transformación por medios físicos, con el fin de desarrollar una metodología para la incorporación de genes de interés en el mejoramiento genético de esta especie.

OBJETIVOS PARCIALES

1. Conocer los parámetros del cultivo *in vitro* que permitan obtener plantas regeneradas a partir de los explantos estudiados (medios de cultivo, relaciones hormonales, condiciones de crecimiento, etc.)

1.1. Identificar sistemas de regeneración adecuados para su aplicación durante la transformación genética.

1.2. Conocer las condiciones de cultivo y crecimiento para la obtención de plantas enteras y fértiles desarrolladas a partir del cultivo *in vitro*.

2. Estudiar los parámetros necesarios para la transformación genética de los explantos estudiados.

2.1. Identificar y estudiar protocolos de transformación genética que permitan la introducción de genes de interés para el mejoramiento de este cultivo como por ejemplo los genes de resistencia a lepidópteros (Bt).

2.2. Obtención de plantas transformadas y regeneradas que contengan el/los genes introducidos.

MATERIALES Y METODOS

1. COTILEDONES

1.1.1. MATERIAL VEGETAL

En todos los ensayos se utilizaron bases de cotiledones provenientes de semillas del genotipo Ha300b, línea pública de origen norteamericano, multiplicada en la EEA INTA Balcarce. La razón de la elección de este genotipo se debió a que el mismo mostró una gran capacidad organogénica con la estrategia de regeneración utilizada en la etapa previa del cultivo de tejidos (Ceriani et al, 1992).

1. 2. OBTENCIÓN DE EXPLANTOS

Como fuente de explantos se utilizaron semillas germinadas en condiciones de esterilidad de 0, 3 y 4 días de germinación según el ensayo. Luego de extraer los tegumentos de las semillas se escindieron ambos cotiledones del eje central cortando el extremo distal de los mismos. Se cultivaron en medio de cultivo PER, o el que correspondía según cada ensayo, con el extremo proximal hacia abajo, en contacto con el mismo.

1. 3. CONDICIONES DE CULTIVO

Tanto la germinación como el cultivo de los explantos se realizó en condiciones de esterilidad a 25°C y 12 horas de fotoperíodo.

1. 4. DESINFECCIÓN DE LAS SEMILLAS

Las semillas se colocaron en frascos con tapa y se trataron de la siguiente forma:

- 1 - lavado con agua bidestilada estéril, aplicando vacío durante 2 minutos.
- 2 - lavado con etanol 70° 2 minutos agitando; descarte del sobrenadante.
- 3 - lavado con hipoclorito de sodio al 45 con 5 gotas de detergente; 10 minutos de vacío y 30 minutos de agitación.
- 4 - lavado con agua bidestilada estéril 5 veces.
- 5 - imbibición con agua 16 horas en oscuridad a 25°C con agua estéril.
- 6 - siembra en tubos conteniendo medio MS adicionado con 500 mg/l de nistatina como agente antifúngico. Se deja germinar en oscuridad.

1. 5. MEDIOS DE CULTIVO Y TRATAMIENTOS

Se utilizaron los medios PER, MSB y 025MS, descritos en la [tabla de medios de cultivo](#). Se estudió la sensibilidad de los callos desarrollados a partir de las bases de los cotiledones de 0, 5, 7, 10 12 y 15 días de cultivo en medio PER suplementado con concentraciones crecientes de kanamicina (Km), paromomicina (Pm) (ambos aminoglucósidos) y el herbicida "Basta" (nombre de la formulación comercial del herbicida a base de glufosinato de amonio). Los explantos fueron escindidos según Ceriani et al (1992) y se han puesto en cultivo en medio PER. Según correspondía en cada ensayo, se transfirieron los callos de aproximadamente 100 mg al mismo medio suplementado con el agente selectivo. Los parámetros tomados para la observación del efecto de los agentes selectivos fueron el porcentaje de supervivencia de los callos (%V) y el aspecto general (A.G.) basándose en observaciones del tamaño, friabilidad y color en unidades arbitrarias. Se estableció un coeficiente (DC) en el que intervienen ambos parámetros ($DC = \%V * A.G. / 10$). Cada tratamiento tuvo un n=30 y fue repetido dos veces. Los resultados fueron evaluados y calificados según unidades arbitrarias de 0 a 100 entre los 20 y 25 días luego de iniciado el tratamiento. Se estudió el efecto del agregado de ácido giberélico (GA3) en diversas combinaciones hormonales de ANA y BAP sobre la regeneración a partir de la base de cotiledones en explantos de 5 días. Se ensayaron las siguientes combinaciones en mg/l de ANA/BAP: 0/0; 0.75/0.1; 0.1/0.75; 0/0.5 y 0/1. Todas ellas con o sin 0.1 mg/l de GA3.

Se estudió el efecto de la macerozima al 1% y 3% en soluciones salinas conteniendo macro y microelementos de MS, MES y manitol en pH 5.5. Los explantos fueron sumergidos durante 5 minutos y luego se lavaron en medio MS líquido antes de ponerlos en contacto con el medio sólido.

Se estudió el efecto del ácido giberélico sobre la regeneración directa e indirecta, adicionando al medio de cultivo PER entre 0.125 y 0.175 mg/l según el ensayo. Las observaciones se tomaron a partir de los 10 días de tratamiento contabilizando la cantidad de regeneraciones directas e indirectas por explanto.

1. 6. AGROINFECCIÓN

Los explantos se obtuvieron siguiendo la indicación de cada autor (Ceriani, 1992, o Knittel, 1991) según el ensayo. La cepa bacteriana utilizada para la agroinfección fue la LBA4404 conteniendo el plásmido pBI121.2 ([figura 1](#)). Las bacterias crecieron en agitación en medio YEP adicionado con los antibióticos adecuados a cada cepa durante 24 horas o hasta llegar a una densidad óptica (OD=600) de 0.6. La suspensión obtenida se centrifugó a 9000 rpm y se resuspendió en MgSO₄ 10 mM. Los explantos se pusieron en contacto con la suspensión de bacterias dentro de cajas de Petri. Una vez sumergidos se aplicó vacío durante 3 minutos, luego se escurrieron sobre un papel absorbente estéril y se colocaron los en cajas de Petri conteniendo el medio de cultivo para cocultivarse con las bacterias durante 48 horas; luego se subcultivaron a igual medio pero conteniendo 500 mg/l de Cefotaxime como bacteriostático.

En cada ensayo se tomaron observaciones relacionadas a la regeneración, la acción de cada agregado o variante sobre la regeneración y se hicieron las reacciones histoquímicas de β-glucuronidasa (ver anexo).

2. HIPOCÓTILES

2. 1. MATERIAL VEGETAL Y OBTENCIÓN DE LOS EXPLANTOS

Los genotipos utilizados fueron Ha 300b (línea pública) y 10 genotipos provistos por la Estación Experimental INTA Manfredi, restauradores (R), androestériles (A) y mantenedores (B). Los hipocótiles se extrajeron de plántulas de 7 días de edad germinadas en condiciones estériles *in vitro* a 26°C y oscuridad para favorecer la elongación de los hipocótiles. Los hipocótiles se extrajeron de las plántulas cuando habían alcanzado aproximadamente 7 a 10 cm de longitud y eran blancos (por haber germinado en oscuridad), de manera que de cada plántula se podían extraer más de 20 explantos.

Para la obtención de los explantos se practicaron dos tipos de cortes, longitudinales y radiales, obteniendo explantos en forma de discos (DS) o de secciones longitudinales (SL) divididas en dos. El tamaño de los discos fue de 2 a 3 mm de alto y el de los SL de 0.5 cm de largo. Estos últimos se ubicaron sobre el medio de cultivo de dos formas diferentes: de costado (C) o con la cara del corte hacia abajo

(A). Los discos se ubicaron poniendo en contacto una de las caras con el medio de cultivo.

2. 2. CONDICIONES DE CULTIVO

Los explantos fueron cultivados según se indica en el trabajo de Paterson y Everett (1987) con algunas modificaciones consistentes en cultivar primero bajo oscuridad durante 14 días y luego bajo un fotoperíodo de 12:12 horas luz/oscuridad. La temperatura fue de 25°C para ambas condiciones lumínicas.

2. 3. MEDIO DE CULTIVO

Para determinar la relación hormonal apropiada para los genotipos utilizados, se diseñaron ensayos utilizando los medios de cultivo con las sales y vitaminas del medio MS (Murashige -Skoog, 1962), suplementado con ácido naftalen acetico (ANA), 6-bencilaminopurina (BAP), ácido giberélico (GA₃) y 2,4-D en las concentraciones indicadas en la [tabla de medios](#) (medios A, B, C, D, E y F). Para el subcultivo y desarrollo de embriones somáticos se utilizó el mismo medio basal (ES) pero con 20g/l de sacarosa y régimen de luz: oscuridad.

Los genotipos estudiados en cada medio de cultivo se indican en la siguiente tabla.

Medio de cultivo	genotipos ensayados
A+	R2,R5,R6,B2,B3,B4,A2,A3,A4
B‡	R2,R5,R6,B2,B3,B4,A2,A3,A4,HA300b
C	R5,R6
D	R5,R6
E	R5,R6
F	R5,R6

2. 4. TRANSFORMACIÓN

Se utilizó la cepa de *Agrobacterium* LBA 4404 plásmido pBI121.2 ([figura 1](#)). La inoculación con *Agrobacterium* se realizó por cocultivo según el método descrito por Horsch et al (1985); la suspensión con el inóculo de agrobacterias se obtuvo del mismo modo que en el caso de la infección de los cotiledones. En todos los ensayos se utilizó el inóculo bacteriano en una dilución 1:10. Los explantos de los ensayos infectados con *Agrobacterium*, pasado el tiempo del cocultivo, se

subcultivarón a los mismos medios con el agregado de Cefotaxime (500 mg/l) como bacteriostático.

Se estudiaron diversas mecánicas de transformación, variando el tiempo de cocultivo y poniendo en contacto el inóculo con los explantos de dos formas diferentes: sumergiendo los explantos en 2 ml de la suspensión bacteriana en una caja de Petri (IN) o colocando la suspensión sobre cada disco con una jeringa de tuberculina (P).

Se ensayó el uso de Paromomicina como agente selectivo, adicionándola al medio de cultivo en diversas concentraciones.

En todos los experimentos se realizaron 2 repeticiones con 30 a 40 explantos por tratamiento.

3. HOJAS

Teniendo en cuenta el protocolo propuesto por De Block (1988) y el utilizado por del Vas, (1993), se hicieron algunas modificaciones para adaptar el sistema al cultivo *in vitro* de girasol. El medio de cultivo básico utilizado fue MS solidificado con 7 g/l de agar. Se probaron combinaciones de hormonas normalmente usadas en el cultivo *in vitro* de girasol: ANA, BAP y GA₃, además de zeatina (citoquinina utilizada en papa) y variando la fuente de carbono: sacarosa o glucosa (del Vas, 1993). ([Tabla 3](#)). Se utilizó el genotipo Ha300b. Se tomaron las primeras hojas verdaderas desarrolladas sobre plántulas germinadas *in vitro* en medio MS. Se practicaron cortes transversales en la mitad de la lámina y se dividió a ésta en dos secciones iguales por la nervadura central. Los explantos así obtenidos se colocaron con al haz en contacto con el medio de cultivo correspondiente. Se subcultivarón cada 10 días y se tomaron las observaciones describiendo el desarrollo del callo, su ubicación y aspecto, y el desarrollo de estructuras meristemáticas o embriogénicas. Estas estructuras diferenciadas a partir del callo obtenido sobre las hojas se separaron y subcultivarón en medio MS suplementado con 0.1 mg/l de BAP para favorecer el desarrollo apical y luego en medio MS 0.25x y 5 g/l de agar para favorecer el desarrollo radicular.

Para la transformación se practicaron diversos cortes en las hojas de las plántulas y se las colocó en medio MS líquido, sin hormonas junto con la suspensión de bacterias, diluídas al décimo de la densidad óptica obtenida luego del crecimiento

ON a 28° C (OD₆₀₀: 0.6) . El cocultivo se realizó en erlenmeyers a 25° C en oscuridad bajo agitación a 25 rpm . Se ensayaron dos tiempos de cocultivo (24 y 48 hs), diversos cortes (separando la porción distal, la media y la proximal) y tamaños de hojas. Luego del cocultivo, los explantos se transfirieron a tubos con medio MS + agar suplementados con ANA:BAP y GA₃ en diferentes concentraciones y cefotaxime como bacteriostático. La prueba histoquímica de GUS se realizó entre los 10 y 15 días posteriores.

4. HEMI EMBRIONES (O MERISTEMAS)

4.1. GENOTIPOS

Para los experimentos de regeneración a partir de meristemas divididos (hemimeristemas) se utilizaron las líneas públicas Ha89 y Ha300B y otras líneas desarrolladas en el INTA de Manfredi. Sólo la línea Ha89 se utilizó para los experimentos de transformación de hemimeristemas.

Las semillas se esterilizaron como se describió en las secciones anteriores (70% alcohol e hipoclorito de sodio) y se dejaron embeber durante la noche en oscuridad a 20°C.

4. 2. OBTENCIÓN DEL EXPLANTO

Los explantos llamados hemimeristemas, se obtuvieron siguiendo el procedimiento descrito por Schrammeijer (1990). Este consiste en quitar la cubierta que recubre el aquenio, despojarlo de los cotiledones desde su base y sosteniendo el meristema con una pinza se practica un corte vertical con un bisturí obteniendo de esta manera dos porciones iguales conteniendo la mitad del meristema apical cada una y los meristemas axilares de cada cotiledón.

Una vez obtenidos los explantos se colocaron con la cara del corte vertical hacia arriba en cajas de Petri o en tubos (10 cm de largo y 2.5 cm de ancho tapados con tapones de algodón y gasa) con medio de cultivo M1S o en medio M1L, según el tratamiento a seguir. Los brotes se subcultivaron cada 15 días a medio M1S o M2

según el tratamiento y finalmente a medio M3. Las condiciones de cultivo fueron 23 ± 2 °C (día) y 16 ± 2 °C (noche) con fotoperíodo de 12 hs.

Los brotes secundarios de 1 cm de largo se aislaron y separaron para cultivarlos en otro tubo independiente. Los brotes que se subcultivaron por lo menos tres veces en medio selectivo y mostraron un crecimiento vigoroso (de por lo menos 2 cm) se llevaron al invernáculo ($20^{\circ}\text{C} \pm 5$ y fotoperíodo de 18 horas de luz) para su aclimatación y posterior injerto.

Los injertos se realizaron utilizando pies de híbrido comerciales de 20 cm de altura (o 4 hojas desarrolladas). Cada pie se decapitó de manera de poner en contacto los haces vasculares del pie y del brote proveniente del cultivo *in vitro*. Para evitar la deshidratación del brote recién injertado se tapó la zona de la operación con una bolsa de nylon, la cual fue abriéndose practicando diariamente cortes para incrementar el intercambio gaseoso con el ambiente del invernáculo. Al cabo de 5 días los injertos que fueron exitosos ya se recuperaban del estrés. De esta manera se pretendió evitar la floración precoz de los brotes dentro de los tubos de cultivo, que resultaba en flores pequeñas y estériles.

4. 3. MEDIOS DE CULTIVO

Todos los medios utilizados en el cultivo de meristemas consistieron en un medio básico (MB) consistente en macro y micro nutrientes del medio MS (Murashige-Skoog, 1962), mio-inositol (50 mg/l), nitrato de potasio (5g/l), sacarosa (20 g/l) y pH 5.7. ([tabla 1](#)).

4. 4. TRANSFORMACIÓN

Utilizando la tecnología de transformación con *Agrobacterium*, se abordaron diferentes estrategias:

a) cocultivo en medio sólido: los explantos se ubicaron con el corte hacia arriba en cajas de Petri con medio M1S, colocando gotas (15 μ l) de suspensión de bacterias sobre los explantos en cajas de Petri conteniendo el medio M1S (Lewi et al, 1993). Se dejaron abiertas 20 minutos en el flujo laminar para dejar evaporar el líquido de la suspensión. Luego de 48 hs de cocultivo, se pasaron a tubos con medio M2 con

Cefotaxime (250 mg/l) como bacteriostático y kanamicina (50 mg/l) como agente selectivo.

b) cocultivo en medio líquido: los explantos recién cortados se colocaron en frascos Erlenmeyers conteniendo el medio M1L (sin agar) y una proporción 1:60 de la suspensión bacteriana crecida como se describió previamente. El cocultivo se realizó con agitación durante tres días y luego cada explanto fue secado en papel Whatman estéril y pasado a medio M2 con Cefotaxime (250 mg/l) y Kanamicina (50 mg/l).

En ambos sistemas se subcultivaron cada 15 días a medio M2 con 50 mg/l de kanamicina y el último subcultivo (según el tamaño de los brotes puede ser el tercero o el cuarto), se hizo a medio M3, también con kanamicina.

c) combinación de cocultivo con *Agrobacterium* y cañón génico.

En este procedimiento se realizó primero el bombardeo con partículas de tungsteno, cubiertas o no con ADN plasmídico (según se buscaba sólo dañar el tejido antes del cocultivo). Se utilizó el cañón génico de alta presión de helio del Instituto de Biotecnología.

Las condiciones de bombardeo fueron las siguientes: Presión de helio: 1200 psi; distancia al blanco: 7 cm; recorrido del macrocarrier: 1.3 cm; microproyectiles: de tungsteno Aldrich M-10; microproyectiles por disparo: 4 mg; cantidad de ADN por disparo: 1.6 µg; disparos por placa: 2.

Los explantos tratados fueron obtenidos en el mismo día en que se realizó la transformación.

Las cepas de *Agrobacterium* utilizadas en estos ensayos fueron: LBA 4404, C58 y EHA 105, portando el vector binario [pBI121.2](#) (Clontech, Palo Alto, CA). Este plásmido proviene del vector binario pBIN19 y contiene el gen *uidA* que codifica para la β-glucuronidasa (*GUS*) bajo promotor CaMV 35S del virus del mosaico del coliflor y el gen *neo* que codifica para la enzima neomicina fosfo transferasa (*NPTII*) bajo promotor y terminador *nos* que confiere resistencia a antibióticos del tipo de los aminoglucósidos.

El gen que codifica para la proteína CryIA de *Bacillus thuringiensis* fue clonado en el CINVESTAV y proviene de una cepa nativa de México. El [plásmido p2X35S-K](#) es portador de la γ-endotoxina de *Bacillus thuringiensis* bajo promotor doble 35S, el enhancer traduccional AMV del Virus del Mosaico de la Alfalfa y el gen *neo* bajo

promotor nos (Xoconostle, 1989). Con esta construcción se transformaron bacterias de *Agrobacterium tumefaciens* por el método de electroporación (Sambrook, et al., 1989) de la cepa C58, las cuales fueron usadas en los experimentos de transformación por cocultivo o combinado con cañón génico.

En cada experimento se hicieron pruebas histoquímicas de β -glucuronidasa según Jefferson (1987).

4. 5. DETECCIÓN MOLECULAR DE LOS TRANSGENES.

4.5.1. Extracción de ADN

Se realizaron extracciones de ADN en pequeña escala para usar en las reacciones de PCR. Se tomaron porciones de tejido de cada brote injertado para extraer ADN según el método de Dellaporta (1983). Para esto se molieron 2 o 3 discos de hoja con un vástago de punta cónica en un micorubo de 1.5 ml con 700 μ l de buffer de extracción (Tris-HCl pH 8 50 mM, EDTA pH 8 10 mM, NaCl 100 mM, SDS 10 % y β -mercaptoetanol 10 mM) y se incubó 10 minutos a 65°C. Se agregaron 200 μ l de AcK 5 M y se incubó en hielo durante 20 minutos. Se centrifugó durante 20 minutos a 13000 rpm a 4°C. Al sobrenadante se le hizo una extracción con fenol-cloroformo. A la fase acuosa obtenida se le agregó un volumen de isopropanol y se incubó 10 minutos a temperatura ambiente. Se centrifugó 20 minutos en microcentrífuga. El precipitado se lavó con etanol 70 %. Finalmente se resuspendió en agua calidad HPLC o en TE y se cuantificó en fluorómetro. La integridad se verificó en gel de agarosa 0.8 %.

4.5.2. PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Para cada reacción de PCR se utilizaron 80 a 100ng de ADN como templado. La reacción se realizó en un volumen total de 25 μ l con 1 a 2 μ l de ADN, 10 ng de cada primer, 0.25 mM de dNTPs, 1.5 mM de MgCl₂ y 1 UI de AmpliTaq™ ADN polimerasa.

Se diseñaron iniciadores para amplificar 673 pares de bases entre los nucleótidos 60 a 733 del gen NPTII:

NPTII 3': 5'CGTAAAGCAGGAAGCGGTCAGC 3'

NPTII 5': 5'CGGCTATGACTGGGCACAACAGACA 3'

Y para amplificar 358 pares de bases entre los nucleótidos 1 y 358 del gen Btk:

Btk1: 5'ATGGATAACAATCCGAACATCAA 3'

Btk2: 5' ACTGCTTCCCCTCTCTAAAAGTA 3'.

Las condiciones del ciclado fueron:

95°C, 4 min.,
35 ciclos { 95 1min.
62 o 55°C, 1 min.,
72°C, 1 min.
72°C, 7 min.

Temperatura de apareamiento: 62°C para los iniciadores de NPTII, y 55°C para los de Btk.

Para cada reacción se realizaron controles internos de amplificación utilizando iniciadores que amplifican secuencias sobre los espaciadores ribosomales (ITS). Los iniciadores utilizados para estas reacciones fueron: el ITS5 (5'GGAAGGAGAAGTCGTAACAAGG3') y el ITS4 (5'TCCTCCGCTTATTGATATGC3') (Kiss, R. et al, 1989). Con estos iniciadores se espera un producto de amplificación de 700 pb. También en cada reacción se hicieron controles negativos de los reactivos (sin ADN), control negativo de ADN de girasol sin transformar y control positivo (con ADN de plantas transformadas con el gen a estudiar). Los productos así obtenidos fueron corridos en geles de agarosa 0.8% teñidos con EtBr y fotografiados con un equipo Photo Dyne.

4.5.3. Southern Blot

Por medio del método de CTAB modificado por Saghai-Marroof et al., (1994) se extrajo ADN genómico a gran escala de hojas de plantas provenientes de los ensayos de transformación para los genes *gus*, *neo* y *Btk* y de plantas control sin transformar.

En los southern realizados con ADN de plantas transformadas con el gen *gus* se realizó una digestión de entre 5 y 10 µg de ADN total con las enzimas EcoRI y HindIII para la extracción del inserto que contiene la construcción promotor-gen-terminador (este mismo inserto se obtuvo del plásmido pBI 121.2 para usar como sonda) y con HindIII para realizar las determinaciones del número de copias insertado en cada planta analizada. Los productos de digestión y ADN sin digerir de cada planta

fueron separados por electroforesis en gel de agarosa (0.8 % en buffer TAE a 0.6 mA/cm). Posteriormente se desnaturalizó el gel con NaOH 0.4N y se lo transfirió a una membrana de nylon Hybond N+ con 0.4 N NaOH. Luego se lavó la membrana con 2X SSC y se inmovilizó el ADN con luz UV (120.000 μ joules/cm²) y luego con calor 80°C por 20 minutos. Como control positivo se utilizó 25 pg de ADN del gen proveniente del plásmido.

En el southern realizado para la determinación de presencia del gen de Btk, el ADN se cortó con la enzima BamHI. Como sonda se utilizó el gen de *Bacillus thuringiensis*, el cual fue liberado del plásmido mediante restricción con la enzima BamHI.

Para el marcado de las sondas, el producto de digestión fue corrido en un gel de agarosa 0.8 % y la banda correspondiente a 2.0 Kb fue purificada mediante Gene Clean™. Las sondas se marcaron radioactivamente con ³²P mediante la técnica de iniciación al azar ("random priming", Sambrook et al., 1989). Se utilizó un horno de hibridación a una temperatura de 65°C.

Se realizó una prehibridación con PAES en horno a 65°C 2 horas y luego se aplicó la solución con la sonda marcada dentro del tubo de hibridación y permaneciendo ON. Luego de la hibridación, la membrana fue lavada con 2X SSC/0.5 % SDS durante 30 minutos y 0.1X SSC/0.5 % SDS durante 2 horas. Posteriormente, se expuso a placas auto radiográficas durante 3 días.

Tabla 1: Medios de cultivo.

Medio	función	Macro-nutrientes (mg/l)	Micro-nutrientes (mg/l)	KNO ₃ (g/l)	Vitaminas (mg/l)	Sacarosa (g/l)	Agar (g/l)	Reguladores de crecimiento (mg/l)			
								AN A	BAP	GA3	2,4-D
PER ¹	Inducción de callo en cotiledones	1x MS	1x MS	-	1x MS	20	7	0.75	0.1	-	-
MSB	Regeneración de callos	1x MS	1x MS	-	1x MS	20	7	1	-	-	-
0.25MS	Enraizamiento	0.25x MS	0.25x MS	-	0.25x MS	10	5	-	-	-	-
A ²	hipocótilos	1x MS	1x MS	5	1x MS	30	8	-	-	0.1	0.1
B	hipocótilos	1x MS	1x MS	5	1x MS	30	8	1	1	0.1	-
C	hipocótilos	1x MS	1x MS	5	1x MS	30	8	1	0.5	0.1	-
D	hipocótilos	1x MS	1x MS	5	1x MS	30	8	0.5	1	0.1	-
E	hipocótilos	1x MS	1x MS	5	1x MS	30	8	0.75	1	0.1	-
F	hipocótilos	1x MS	1x MS	5	1x MS	30	8	1	0.75	0.1	-
ES	Desarrollo de embriones somáticos	1x MS	1x MS	-	1x MS	20	8	-	-	-	-
M1S	hemimeristemas	1x MS	1x MS	5	1x MS	20	8	-	0.5	0.1	-
M1L	hemimeristemas	1x MS	1x MS	5	1x MS	20		-	-	-	-
M2	hemimeristemas	1x MS	1x MS	5	1x MS	20	7	-	0.1	0.1	-
M3	hemimeristemas	1x MS	1x MS	5	1x MS	20	7	-	0.1	-	-

Referencias:

(1): Paterson y Everett (1985)

(2): Everett, 1987

Los medios A, B, C, D, E y F, contienen también 500 mg/l de hidrolizado de caseína.

Los medios M1s, M1L y M2 contienen mio-inositol (50 mg/l)

Tabla 3: Medios de cultivo ensayados con explantos de hojas.

medio de cultivo	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	ZEA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	glucosa (g/l)	sacarosa (g/l)
HC	0	1	0	0.1	0	30
HD	0.5	0	0	0.1	0	30
HE	0	0.5	0	0.1	0	30
HF	0	2	0	0.1	0	30
HG	0.5	1	0	0.1	0	30
HH	0.5	0	0	0.1	10	0
HI	0.5	0.5	0	0.1	0	30
HJ	0.5	0	0.5	0	0	30
HK	0	0	0.5	0	0	30
HL	0	0	2	0	0	30
HM	0.5	0	2	0	0	30

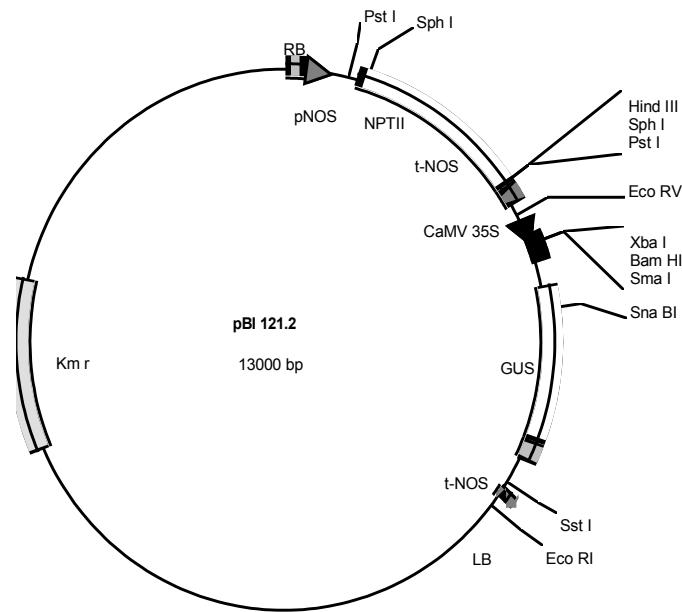


Figura 1

Mapa del vector pBI121.2. (Clontech, Palo Alto, CA). Este plásmido proviene del vector binario pBIN19 y contiene el gen *uidA* que codifica para la β -glucuronidasa (*GUS*) bajo promotor CaMV 35S del virus del mosaico del coliflor y el gen *neo* que codifica para la enzima neomicina fosfo transferasa (*NPTII*) bajo promotor y terminador *nos* que confiere resistencia a antibióticos del tipo de los aminoglucósidos. Las líneas indican los sitios únicos de restricción para las correspondientes enzimas.

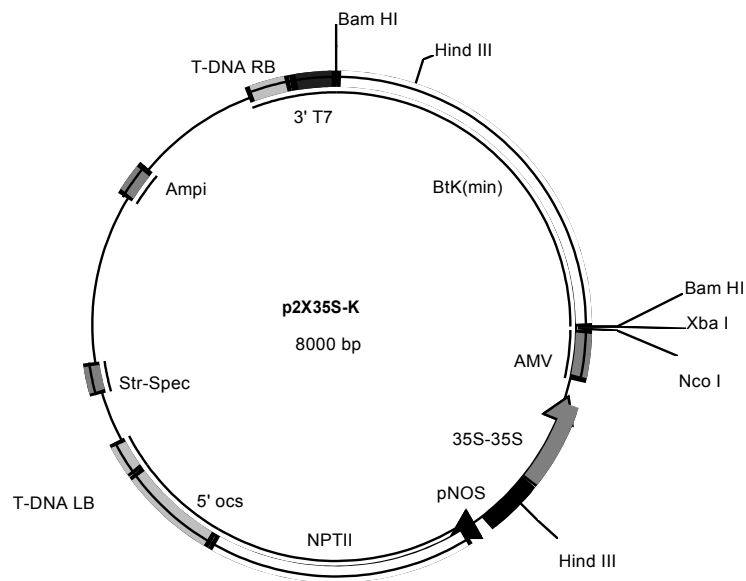


Figura 2

Mapa del vector 2x35S-K. El plásmido p2X35S-K es portador de la γ -endotoxina de *Bacillus thuringiensis* bajo promotor doble 35S, el enhancer traduccional AMV del Virus del Mosaico de la Alfalfa y el gen *neo* bajo promotor nos (Xoconostle, 1989). Las líneas indican los sitios únicos de restricción para las correspondientes enzimas.

RESULTADOS

RESULTADOS COTILEDONES

Se comenzó trabajando con cotiledones como explanto de partida para evaluar las posibilidades de regeneración directa e indirecta y transformación del tejido con *Agrobacterium*.

Sobre el uso de los cotiledones como explanto para el cultivo *in vitro* de tejidos de girasol, se habían probado básicamente tres condiciones de cultivo que difieren en las relaciones cuantitativas entre reguladores de crecimiento, en la manipulación previa y la forma de siembra de los explantos. Knittel et al (1991) proponen morfogénesis directa practicando un corte longitudinal en la base del cotiledón y dividiéndola en dos porciones, adaxial y abaxial, sembrando ambas mitades con la base semisumergida y con la zona de corte en contacto con el medio. Ceriani et al (1992) para la regeneración de plantas completas de girasol utilizaron la base del cotiledón escindida del tallo, sembrándolas con el extremo proximal sumergido en el medio de cultivo. En ese mismo trabajo, las alternativas propuestas para las variantes en los reguladores de crecimiento consisten en regenerar brotes en forma directa o indirecta (pasando por un breve estadio de callo), siendo las relaciones hormonales: 1 mg/l de BAP y 0,1 mg/l de BAP combinado con 0,75 mg/l de ANA respectivamente. Esta técnica se aplicó con éxito en diversos genotipos aunque no fue posible obtener plantas enteras tratadas con *Agrobacterium*.

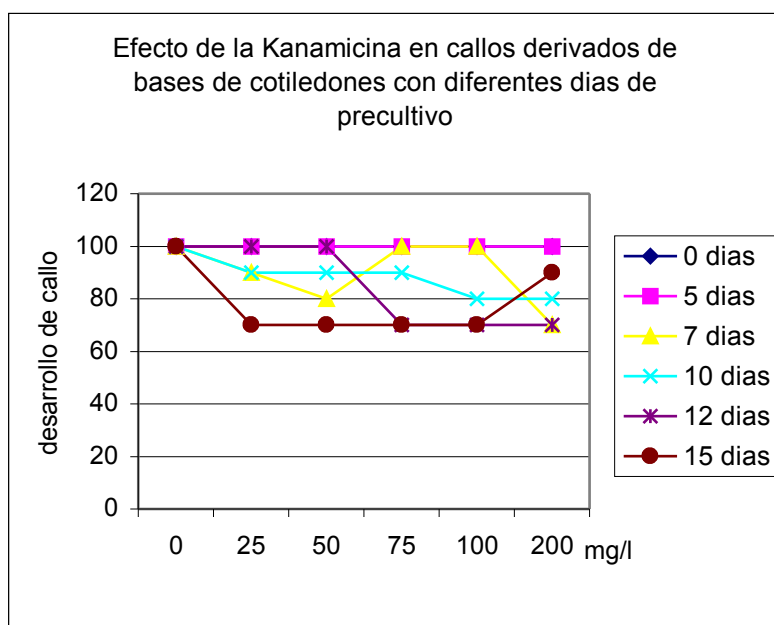
Los ensayos que se describen a continuación aplican los protocolos descriptos tomando como punto de partida los resultados experimentales previos (Ceriani et al 1992), para estudiar el mejoramiento de la eficiencia de la regeneración *in vitro* y la posibilidad de transformación genética de los tejidos del cotiledón involucrados en el proceso de regeneración. Se estudió la sensibilidad natural de estos tejidos en cultivo frente a diversos agentes selectivos con el fin de determinar tipo y dosis adecuada en un esquema de selección para aplicarse en el proceso de transformación. Se analizó la conveniencia de tratar los tejidos con enzimas celulolíticas para facilitar la agroinfección. Se estudió el efecto del agregado de ácido giberélico (GA₃) en diversas combinaciones hormonales de ANA y BAP sobre la regeneración.

1) AGENTES SELECTIVOS: SENSIBILIDAD DE EXPLANTOS DERIVADOS DE COTILEDONES A LOS AGENTES SELECTIVOS KANAMICINA, PAROMOMICINA Y FOSFINOTRICINA

El objetivo de estos ensayos fue determinar el comportamiento de los explantos (sección basal de los cotiledones) frente a diferentes agentes selectivos. Considerando la variación en la sensibilidad frente a los agentes selectivos de los diferentes órganos y/o tejidos que se pueden utilizar como explantos, se estudió el efecto en explantos sin desdiferenciar y con diferentes días de precultivo en un medio que promueve la formación de callos (medio PER).

En los siguientes gráficos se observan los resultados obtenidos:

Gráfico 1.1: efecto de la kanamicina en callos derivados de cotiledones.



No se observó un efecto de la kanamicina sobre el desarrollo y el aspecto de los callos en ninguna de las concentraciones utilizadas. La kanamicina no actuó eficazmente como agente selectivo en los explantos derivados de cotiledones. No hubo un efecto fitotóxico importante independientemente de la concentración utilizada o el tiempo de precultivo del explanto.

Gráfico 1.2: efecto de la paromomicina en callos derivados de cotiledones.

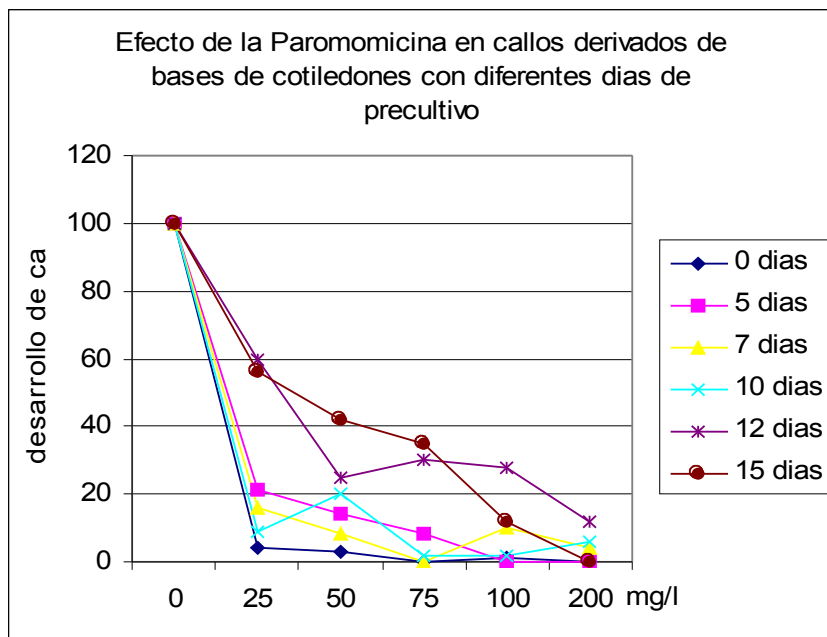
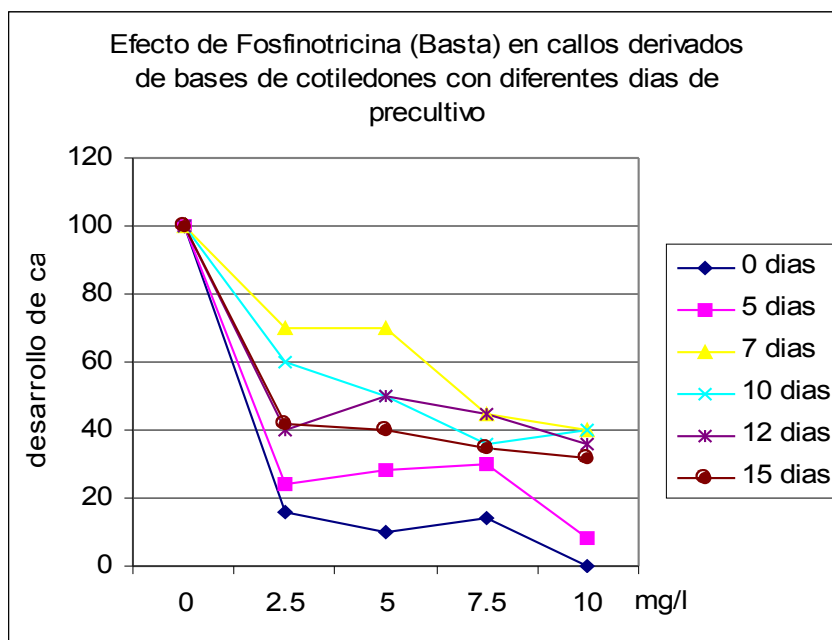


Gráfico 1.3: Efecto de la fosfotricina (Basta) en callos derivados de cotiledones.



Paromomicina y Basta provocaron efectos marcados en el desarrollo de los callos a partir de estos explantos.

La paromomicina impide el desarrollo del callo más eficazmente en los explantos entre 0 y 10 días de precultivo. Entre 12 y 15 días de precultivo, con un callo desarrollado, el efecto es visible a nivel de la regeneración pero no se ve impedida la continuidad en el desarrollo del callo. Es decir que se ve disminuida la sensibilidad con el aumento del tiempo de precultivo, y por consiguiente de la masa callosa.

En el caso de fosfinotricina se procedió de manera similar a los otros agentes selectivos. Ensayos previos con cotiledones mostraron la alta toxicidad de este herbicida hacia el girasol por lo que se utilizaron concentraciones 10 veces menores. Como con Pm, se observa una disminución de la sensibilidad del explanto con el incremento del tiempo de precultivo, siendo similares las curvas obtenidas en ambos casos. Los explantos de 0 y 5 días no resistieron la mínima dosis, que les impidió formar callo. Para los otros tratamientos, entre 7 y 15 días en que el callo ya había comenzado a formarse, el efecto fue menos marcado que con paromomicina. Es decir que una vez formado este tipo de tejido indiferenciado, es capaz de resistir el efecto de la fosfinotricina.

De estos dos últimos fitotóxicos, la Pm fue la que provocó un efecto más marcado, impidiendo directamente la formación de callo a partir de los cotiledones o provocando la muerte celular de los callos ya formados desde concentraciones de 50 mg/l. El Basta produce síntomas similares, pero actuando sobre tejidos aún no desdiferenciados (0 y 5 días de precultivo).

2. REGENERACIÓN A PARTIR DE CALLOS DERIVADOS DE COTILEDONES

2.1. EFECTO DE GA₃ SOBRE LA REGENERACIÓN

Se diseñaron ensayos para determinar las condiciones de cultivo que propicien una mayor frecuencia de regeneración, en comparación con los datos previos existentes (Ceriani et al) a partir de los explantos derivados de cotiledones candidatos a ser infectados con *Agrobacterium*.

Tabla 2.1: Porcentaje de regeneración medido como el número de brotes por explanto a partir de bases de cotiledones en medio de cultivo con diversas combinaciones de ANA/BAP y giberélico.

	0 mg/l GA ₃		0,1 mg/l GA ₃	
	días a la observación			
ANA/BAP (mg/l)	14 días	28 días	14 días	28 días
0/0	0 ^a	0	20	30
0,75/0,1	50	0	60	44
0,1/0,75	0	0	30	20
0/0,5	40	15	20	40
0/1	15	15	40	50

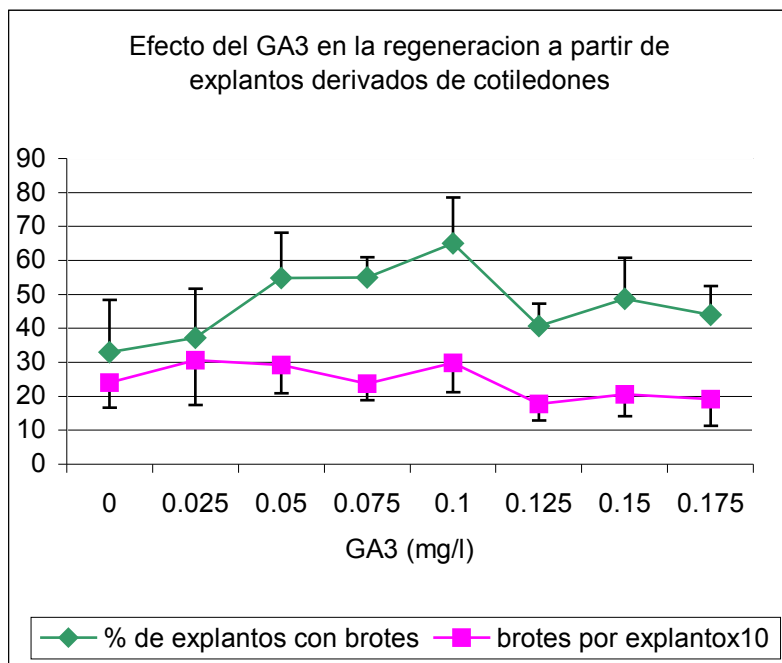
a: % de explantos con brote

Los datos volcados en la tabla muestran que el agregado de 0,1 mg/l de GA₃ a cualquier combinación hormonal, aumenta el porcentaje de regeneración. La combinación hormonal 0,75/0.1 mg/l de ANA/BAP es ampliamente favorecida por el agregado de GA₃. No obstante, no todas las yemas formadas desarrollan posteriormente. El 40% de los brotes tuvieron aspecto etiolado y débil. Del 60% restante, de aspecto normal, la mitad desarrolló un botón floral pequeño (y estéril) dentro del tubo de cultivo. Los brotes establecidos se subcultivaron luego a medio de enraizamiento 0,25 MS. El factor limitante para la obtención de plantas enteras fértiles fue la floración precoz.

2.2. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN DE GA₃ PARA FAVORECER LA REGENERACIÓN DE LOS BROTES DESARROLLADOS.

Se llevaron a cabo ensayos ampliando el rango de la concentración de GA₃ entre 0 y 0,175 en explantos de cotiledones de 5 días de precultivo en medio PER. Los resultados obtenidos (gráfico 2.1) muestran que tiende a aumentar el porcentaje de explantos con brotes cuando se desarrollan en medio suplementado con 0,1 mg/l de GA₃. El número de brotes por explanto presenta menor variación, siendo los valores entre 0,5 mg/l y 0,1 mg/l de GA₃ los que propician un mayor desarrollo de brotes por explanto. Los brotes desarrollados en estas condiciones son etiolados y de hojas más angostas en comparación con aquellos creciendo en medio sin giberélico. En concentraciones mayores de 0,1 mg/l el número de brotes por explanto oscila entre 2 y 3, pero es menor la cantidad de explantos capaces de regenerar y los brotes poseen aspecto más débil aún.

Gráfico 2.1: Efecto del ácido giberélico sobre la regeneración a partir de explantos derivados de cotiledones



2.3. DETERMINACIÓN DEL MOMENTO DE SUPLEMENTACIÓN DEL MEDIO DE CULTIVO CON GA₃.

Se estudió el efecto de la adición en el medio de cultivo de diversas concentraciones de GA₃ sobre el desarrollo de brotes. Se trataron explantos de cotiledones de 5, 7 y 12 días de precultivo en medio PER. Se tomaron como parámetros para la observación, el porcentaje de explantos capaces de desarrollar brotes en las condiciones impuestas y la cantidad de brotes que desarrollaron (en promedio por tratamiento). Los resultados se muestran en la siguiente tabla:

Tabla 2.3: Efecto de diversas concentraciones de giberélico y los días de precultivo de los explantos sobre la regeneración.

Días de precultivo	% de explantos con brotes			brotes por explanto		
	5 días	7 días	12 días	5 días	7 días	12 días
Días a la observación	20	20	10	20	20	10
GA ₃ (mg/l)						
0	40	10	90	1,66	1,33	3
0.025	50	30	60	1,5	1,33	4
0.05	10	30	90	1,6	2	2,77
0.075	40	50	80	1,33	1,5	3,75
0,1	30	60	90	3,5	2,66	3,66
0,125	50	40	50	2	2	3,2

El número de brotes por explanto se ve incrementado con el agregado 0,1 mg/l de GA₃ en explantos de 5 y 7 días de precultivo. La suplementación a los 12 días produce incrementos en diferentes concentraciones de GA₃.

Entre los tratamientos con 5 y 7 días de precultivo, el porcentaje de explantos con brotes tiende a aumentar en la primera observación, aunque luego (a los 40 días de tratamiento) esta tendencia no se mantiene. En los explantos de 5 y de 7 días el mayor número de brotes por explanto se obtiene con 0,1 mg/l de GA₃. En todas las concentraciones de GA₃ la suplementación a los 12 días del cultivo produce un aumento considerable del brotado en los callos ya existentes. El número de brotes por explanto es mayor en 0,05 mg/l a los 30 días de tratamiento. También se observó que el callo separado del explanto original mantiene la capacidad regenerativa cuando fue cultivado inicialmente con altas concentraciones de GA₃. Esta tendencia se mantiene aún después de haber subcultivado a un medio sin giberélico.

2.4. EFECTO DE LA MACEROZIMA SOBRE LA REGENERACIÓN

Una alternativa planteada para determinar las condiciones óptimas de cultivo que propicien una mayor frecuencia sobre la regeneración es el tratamiento con macerozima. Esta enzima es muy utilizada en los protocolos para la obtención de protoplastos (células vegetales carentes de pared celular) ya que tiene la propiedad de degradar las uniones de pectatos entre las paredes de las células vegetales. Este efecto podría promover la disgregación celular en el tejido del cotiledón o en el callo y facilitar la disponibilidad de algunas células involucradas en los tejidos centrales del explanto para el contacto posterior con las agrobacterias.

Ensayos previos mostraron que el agregado de giberelinas al medio de cultivo promueven un aumento de la regeneración de estos explantos; teniendo en cuenta

esto último, se estudió el efecto de GA₃ y la macerozima sobre la regeneración directa (diferenciación de órganos sin pasar por la fase de callo) e indirecta (diferenciación a partir de tejido desdiferenciado o callo).

Los resultados se observan en la tabla 2.4.

Tabla 2.4.: Efecto de la enzima macerozima y el giberélico sobre la regeneración.

tratamiento	control	GA ₃	Macerozima	GA ₃ +Mac.
Regeneraciones sobre número total de explantos ⁽¹⁾				
Directas (RD)	7,7	12	4	2,6
Indirectas (RI)	12	40	13	24
Regeneraciones por explanto				
Directas	1,4	2,25	1	2
Indirectas	2,2	3	2	2,25

(1) valores sobre 20 explantos.

El GA₃ provocó un aumento tanto de regeneraciones directas (RD) como indirectas (RI), en órdenes de 1 a 2 veces el control. Lo contrario sucedió con la macerozima, ya que disminuyó ambas frecuencias. La interacción de ambas provocó un aumento en las RI, pero no en las RD, con respecto al control. Esto puede explicarse desde la magnitud de daño que sufrió el tejido con la macerozima, ya que el callo que origina a las regeneraciones indirectas puede desarrollarse a partir de tejidos internos no dañados, en cambio, las regeneraciones directas lo hacen a partir de tejidos superficiales y éstos deben estar en buenas condiciones fisiológicas para desarrollar.

3. TRANSFORMACION DE COTILEDONES

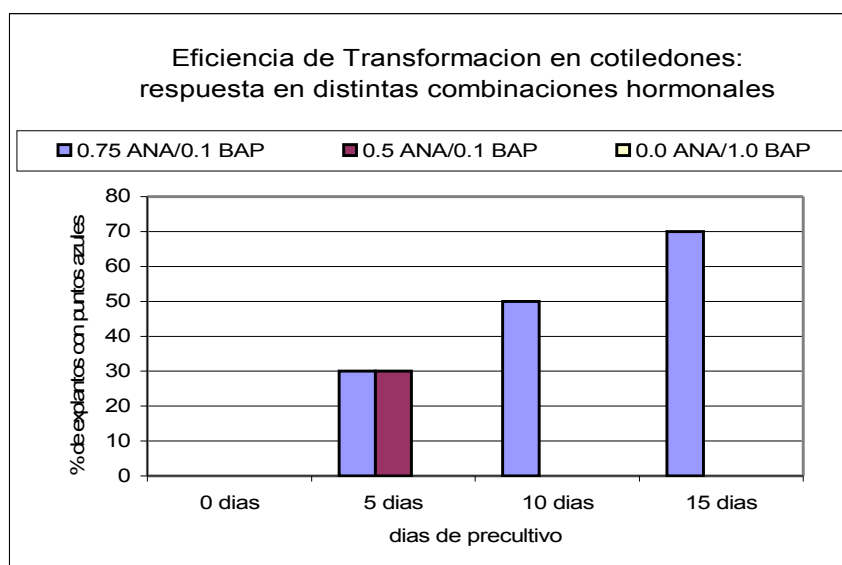
Resultados experimentales preliminares indican la posibilidad del uso de tejidos provenientes de la base de cotiledones como blanco de *Agrobacterium*. En efecto, en ensayos previos se cocultivaron cotiledones con *Agrobacterium* y se comprobó la expresión del transgén mediante el ensayo histoquímico, observando áreas o puntos azules el callo y cotiledón sin desdiferenciar.

Para el estudio de la transformación de cotiledones con *Agrobacterium* se comenzó por estudiar el efecto de distintas combinaciones hormonales y de los días de precultivo de los explantos sobre la eficiencia de transformación. Esta es medida

como la cantidad de puntos azules por explanto o la cantidad de explantos con puntos azules.

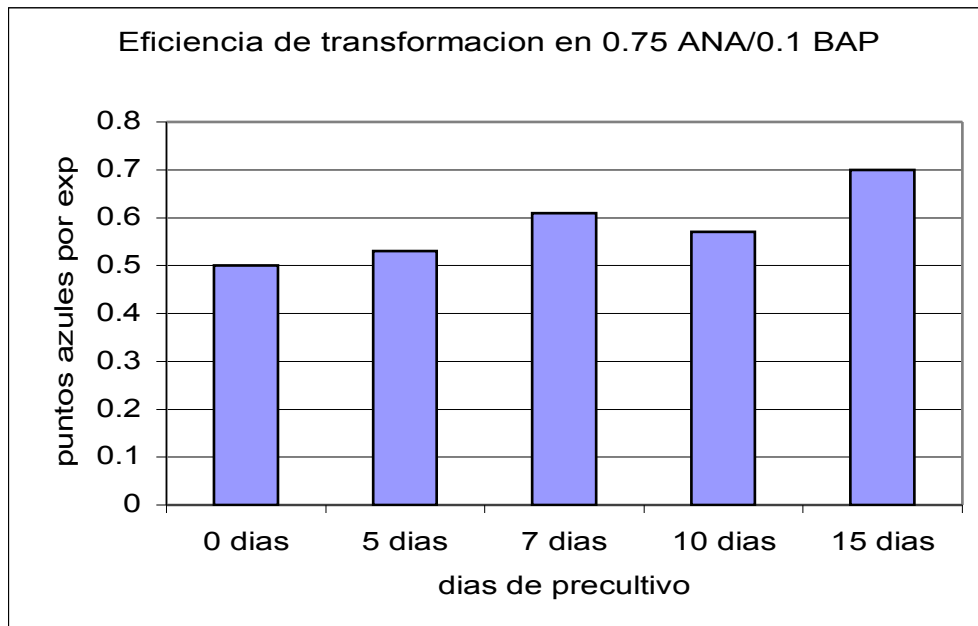
En la figura siguiente se muestra el porcentaje promedio de explantos con puntos azules (con por lo menos un evento de transformación) en respuesta a la agroinfección en distintas condiciones hormonales y con diferentes días de precultivo.

Gráfico 4.1.: efecto de las combinaciones hormonales y los días de precultivo sobre la eficiencia de transformación (expresión transitoria).



Sin precultivo (0 días) no se observa respuesta alguna a la transformación. Para la combinación 0,75/0,1 ANA/BAP se observa una respuesta creciente en los días 5, 10 y 15 de precultivo. En la combinación 0,5/1 ANA/BAP se obtienen puntos sólo en 5 días de pretratamiento y en 0/1 ANA/BAP no se observan eventos. Es decir, que sólo con la estrategia de regeneración indirecta (0,75/0,1 ANA/BAP) se obtiene alguna respuesta a la transformación que alcanza al 70% de los explantos a los 15 días de precultivo. Se evidencia una mayor eficiencia en la infección de tejido desdiferenciado (callos) que en tejido organizado.

Gráfico 4.2.: Influencia de las combinaciones hormonales sobre la eficiencia de transformación. (expresión transitoria).



En términos de puntos azules por explanto, los valores en general oscilan entre 0,5 y 0,7 puntos. Considerando los resultados como número de eventos por explanto en la relación 0,75/0,1 ANA/BAP (gráfico previo), existiría una tendencia al aumento de la eficiencia de transformación conforme aumenta el número de días previos al tratamiento, y en consecuencia la cantidad de tejido en forma de callo en el explanto. Este efecto evidenciaría una susceptibilidad distinta hacia *Agrobacterium* entre el tejido organizado y el callo. De todas maneras, los valores alcanzados son bajos considerando que la probabilidad de regenerar una plantas a partir de esas células transformadas disminuye en los sucesivos pasos del protocolo que se quiere ajustar.

4.3. ESTUDIO DEL TIEMPO DE COCULTIVO Y LA DILUCIÓN DEL INOCULO BACTERIANO.

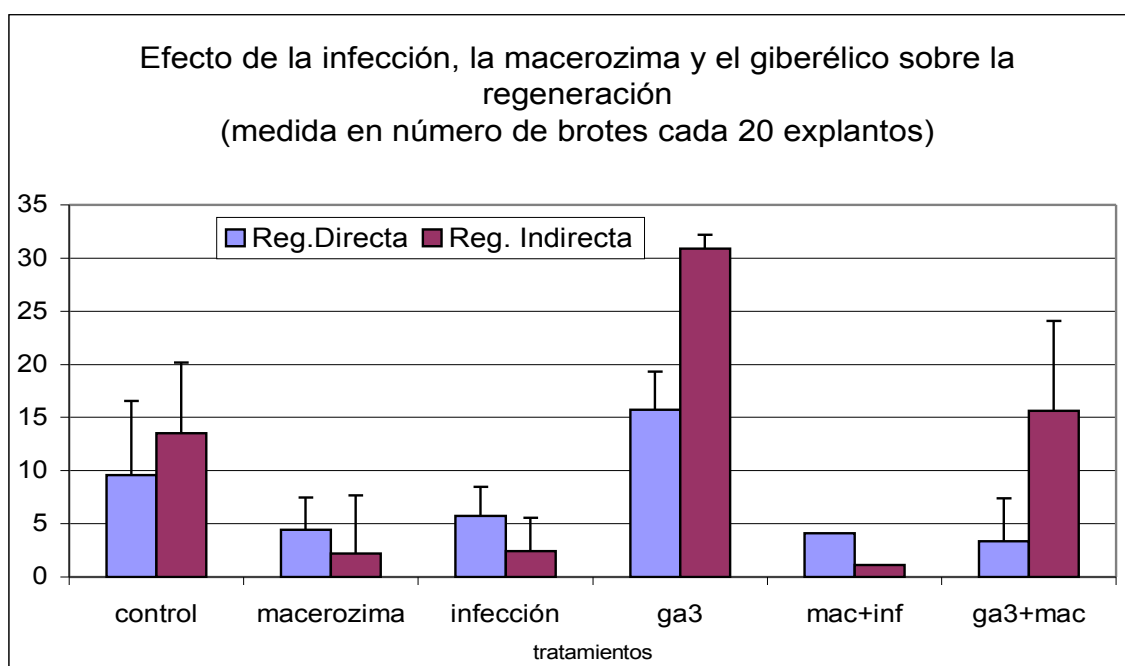
Como consecuencia del bajo número de puntos por explanto obtenido en los ensayos anteriores, se realizaron ensayos para estudiar el efecto de la concentración del inóculo bacteriano (diluciones: 1/10; 1/50 y 1/100) y el tiempo de cocultivo (1; 2; 4; 6; y 8 días) sobre la eficiencia de transformación sobre callos con 5 días de precultivo. Los resultados no mostraron diferencias cuantitativas en la eficiencia de transformación en relación al protocolo control (dilución 1/10 y 48 horas de cocultivo). Se destacó la mayor área y homogeneidad de los puntos en el tratamiento de 1/10 con 6 días de precultivo; los sectores transformados fueron en

su mayoría apreciablemente mayores que en el control y de tamaño homogéneo. Con 8 días de cocultivo la proliferación bacteriana fue masiva e imposible de evaluar en todas las diluciones. Si bien no se verificó un aumento en la eficiencia de transformación (en términos de puntos azules por explanto), se habría logrado un mejoramiento cualitativo de la misma.

4.4. EFECTO DE LA AGROINFECCIÓN, LA MACEROZIMA Y EL GIBERÉLICO SOBRE LA REGENERACIÓN DIRECTA E INDIRECTA.

Habiendo determinado el efecto que la macerozima y el giberélico pueden tener sobre la regeneración directa e indirecta, se estudió cómo actuarían sobre estos parámetros en las condiciones de infección por *Agrobacterium*.

Gráfico 4.4.: Efecto de la macerozima en el tejido y el giberélico en el medio de cultivo sobre la regeneración directa e indirecta.



La agroinfección y el tratamiento con macerozima producen una disminución tanto de la regeneración directa (RD) como la indirecta (RI) con respecto al control. En ambos casos la RI se ve más afectada con respecto al control sin tratar. La macerozima no impidió el desarrollo del callo posterior al tratamiento, pero disminuyó la capacidad de regeneración. El tejido recién tratado mostró necrosis

exterior en tejido de cotiledones aún no desdiferenciados, lo que afectó a la regeneración directa, pero luego el callo se comenzó a formar normalmente, permitiendo el desarrollo posterior de regeneraciones indirectas a partir de ese callo. La adición de giberélico al medio de cultivo post infección favorece el desarrollo de brotes de ambos tipos de procesos de regeneración. Después del tratamiento con macerozima, el giberélico favoreció la recuperación de los explantos (tratamiento ga3+mac). Los callos que se desarrollaron fueron más friables, tuvieron mejor aspecto (más verdes) y fueron de mayor tamaño. Estos callos de mejor aspecto y condiciones fisiológicas tienen mayor capacidad de regeneración indirecta.

El tratamiento de agroinfección combinado con macerozima produjo efectos similares a los provocados por ambos factores por separado, pero con aumento de intensidad. Las RD y RI disminuyeron en proporciones similares respecto del control. La más afectada fue la regeneración indirecta. Ambos tratamientos impidieron un desarrollo posterior del callo. Los explantos mostraban tejidos de tipo necrótico o muy dañado. Algunos mantenían la porción de tejido cotiledonar verde, sin desdiferenciar, por lo que las posibles regeneraciones se desarrollaron directamente a partir de esos tejidos (regeneraciones directas).

4.5. EFECTO DE LA MACEROZIMA Y LA EDAD DE PLÁNTULA SOBRE LA TRANSFORMACIÓN.

Se estudió el efecto de la macerozima y la edad de la plántula (0 y 3 días de germinación) sobre la eficiencia de transformación.

Se realizaron ensayos tratando el tejido del cotiledón previamente a la infección con una solución de macerozima al 0,1 y 0,3 % durante 5 minutos, comparando además la respuesta de ambos tratamientos en explantos extraídos de semillas con 0 (sólo embebidas al esterilizarlas) y 3 días de germinación.

Tabla:4.5: Influencia de la edad de la plántula donante del explanto y la combinación con macerozima sobre la expresión transitoria.

	Explantos con puntos azules		Puntos azules por explanto	
	0 días	3 días	0 días	3 días
Edad de plántula				
a) Agrobacterium	10.5	0	1.995	0
b) Macerozima 0.1 % + Agrobacterium	6.24	5.62	2.7	3.49
c) Macerozima 0.3 % + Agrobacterium	0	3	0	1.5

Los valores corresponden a la cantidad de eventos de transformación determinados con la reacción histoquímica (puntos azules), sobre un total de 30 explantos por tratamiento.

La transformación efectuada sólo con *Agrobacterium* (tratamiento a), sólo produjo puntos en los explantos provenientes de plántulas sin germinar. Con el agregado del factor macerozima al 0,1% (tratamiento b), es posible encontrar también puntos azules en explantos de plántulas de 3 días de germinación. El aumento de la concentración de macerozima a 0,3% no incrementó el número de puntos azules obtenidos en la transformación con *Agrobacterium*. En explantos provenientes de semillas sin germinar, disminuyó ese número con respecto al control sin macerozima, y en los de 3 días, disminuyó con respecto al tratamiento con 0,1%.

RESULTADOS HIPOCÓTILES

EVALUACIÓN DEL USO DE PORCIONES DE HIPOCÓTILES COMO FUENTE DE EXPLANTO PARA REGENERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN.

Habiendo observado la dificultad existente en la obtención de tejidos genéticamente transformados con capacidad regenerativa a partir de los explantos provenientes de cotiledones de semillas por organogénesis, se comenzaron a plantear estrategias alternativas en las cuales se consideraran otro tipo de explantos, de manera de evaluar su capacidad de regeneración (directa o indirecta) por un lado y de transformación genética por el otro. Existen antecedentes documentados acerca de la capacidad de regeneración a partir de callos en girasol (Sahdu,1974; Georgieva-Todorova, 1980 y Greco,1984). En algunos trabajos estos autores tomaron hipocótiles como fuente de explanto para la obtención de callos potencialmente embriogénicos (Paterson y Everett,1985, Everett, 1987 y Escandón y Hahne,1991). El trabajo de Paterson y Everett (1985) reporta la obtención de embriones somáticos y posterior regeneración de plantas a partir del cultivo de discos de hipocótilo. Estos autores proponen algunas modificaciones sobre la composición del medio de cultivo propuesto por Georgieva-Todorova para mejorar la regeneración, medida como la producción de embriones somáticos, que consisten en el incremento de las concentraciones hormonales de ANA a 1 mg/l y de BAP a 1 mg/g, el agregado de 0,1mg/l de GA₃, el aumento de KNO₃ a 5 g/l, el agregado de 40 mg/l de sulfato de adenina y 500 mg/l de casaminoácidos (hidrolizado de caseína). Posteriormente, Everett et al (1987) reporta la regeneración de plantas transgénicas regeneradas a partir de embriones somáticos desarrollados en callos de hipocótiles; en ese trabajo los autores comentan los problemas en la regeneración sobre medio selectivo del material transgénico obtenido *via Agrobacterium*; la incorporación del DNA foráneo fue confirmada por Southern blot, pero su expresión varía según el órgano estudiado. Este fenómeno podría deberse a un efecto de posición, al comportamiento del promotor *nos* o a una estabilidad diferencial del gen, el mensajero o la proteína. Posteriormente, Escandón y Hanhe (1991) definen las condiciones para aumentar la eficiencia de selección en relación a la interacción entre el genotipo, el agente selectivo y el medio usado.

Contando con una gran variedad de genotipos de girasol provistos por el INTA de Manfredi, y con una construcción que contiene el gen que codifica para la enzima

GUS regulado por el promotor 35S (posiblemente más potente que el *nos* utilizado por Everett), se realizó un relevamiento de la capacidad de regenerar y de transformarse de estos genotipos y del Ha300b a partir de trozos de hipocótilo como explanto de partida

1. OBTENCIÓN DE LOS CALLOS A PARTIR DE DISCOS DE HIPOCÓTILES EN GENOTIPOS DEL INTA MANFREDI

Se estudió la respuesta de los genotipos de INTA Manfredi a los medios A (Everett, 1987) y B (Paterson y Everett, 1985). Se realizaron observaciones en cuanto al desarrollo de callo y el sector de disco de hipocótilo involucrado y el tamaño del mismo, aparición de raíces y grado de friabilidad de los callos formados. Estas observaciones se vuelcan en la tabla 1.1

Tabla 1.1: Descripciones de las respuestas de los discos de hipocótilos provenientes de los genotipos provistos por INTA Manfredi a los medios A (2,4-D+ GA3) y B (ANA+ BAP+ GA3). Las observaciones fueron hechas a los 20 días de tratamiento (dos semanas de oscuridad y una de luz).

Friabilidad y tamaño se describen con los símbolos: -; +/-; +; ++.

La ubicación del callo desarrollado en el explanto se marca con una X según se haya desarrollado preferentemente sobre la cara superior del disco o abarcado la totalidad del mismo.

genotipos	R2	R5	R6	B2	B3	B4	A2	A3	A4
<u>medio A</u>									
Explantos c/callos (%)	50	100	100	100	100	100	80	100	100
Ubicación de la masa callosa									
cara superior	X	X	X	X	X	X	X	X	X
todo el explanto									
Friabilidad	-	+/-	+/-	-	-	-	+/-	+	+/-
Tamaño	+/-	+/-	+	+/-	+/-	+/-	+	+	+/-
explantos c/raíz (%)	70	0	50	100	100	90	25	10	10
<u>medio B</u>									
Explantos c/callos (%)	30	100	100	100	100	100	100	100	100
Ubicación de la masa callosa									
cara superior		X	X	X	X	X			
todo el explanto	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Friabilidad	+/-	++	++	+	+	+	+	++	+
Tamaño	+/-	+	++	++	++	+/-	++	+	+
Explantos c/raíz (%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0

Todos los genotipos formaron callos, en el 100% de los casos, con excepción del R2. Se observa una respuesta diferente en algunos genotipos en cuanto a friabilidad, tamaño y distribución del callo en el explanto. Con respecto al desarrollo del callo, los genotipos respondieron de manera diferente ante los dos medios: en el medio A, el mayor incremento de tamaño se produjo en las caras superiores de los discos y en el medio B el desarrollo se acentuó en la zona periférica. En el medio B los callos tuvieron aspecto más friable y el tamaño fue mayor. Se observaron raíces sólo en el medio A.

2. COMPARACIÓN DE LAS RESPUESTAS DE LOS GENOTIPOS PROVENIENTES DE INTA MANFREDI, A DIFERENTES RELACIONES ENTRE AUXINA (ANA) Y CITOQUININA (BAP).

Tomando los genotipos R5 y R6 se estudió el desarrollo de los hipocótilos de estos dos genotipos en los medios B, C, D, E y F con el objeto de estudiar la respuesta de los discos de hipocótilos ante los distintos estímulos que producen las combinaciones hormonales de ANA/BAP. Luego de dos semanas de cultivo se observó que el 100% de los explantos de ambos genotipos formaron callos pero con diferencias en el origen del tejido desdiferenciado (Tabla 2. 1.); en efecto, en los medios de cultivo que contenían mayor proporción de ANA:BAP el callo originado en la zona central del explanto era más desarrollado que el del sector periférico. Por el contrario, a menor proporción de ANA:BAP los callos desarrollaron comprometiendo más al tejido periférico. Para el genotipo R5, el desarrollo del callo comprometió todo el explanto, fueron muy friables, de color verde claro tamaño mediano y no formaron raíces en ningún medio. La combinación 1:1 formó los callos de mejor aspecto (color brillante y friables). En el genotipo R6, el callo se formó mayormente en las áreas periféricas del disco, fueron friables (pero menos que los de R6), no formaron raíces y fueron de igual tamaño que R6. Los callos de mejor aspecto se desarrollaron en el medio con iguales concentraciones de ANA/BAP (1/1). Esta combinación hormonal fue entonces la utilizada para desarrollar los discos en los ensayos de transformación con *Agrobacterium*.

Tabla 2.1 : Respuesta observada de los discos de hipocótilos de dos genotipos a 5 combinaciones de ANA:BAP en el medio PER descrito.

Combinación ANA:BAP	1:0.75	1:0.5	1:1	0.5:1	0.75:1
Genotipo R5					
Desarrollo de callo (% de explantos con callo)	100%	100%	100%	100%	100%
Ubicación de la masa callosa					
Lateral	+	++	+++	+++	+++
central					
Totalidad	100%	100%	100%	100%	100%
Friabilidad	+++	+++	+++	+++	+++
Tamaño	++	++	++	++	++
Desarrollo de raíces	-	-	-	-	-
aspecto	++	++	+++	++	++
Genotipo R6					
Desarrollo de callo (% de explantos con callo)	100%	100%	100%	100%	100%
Ubicación de la masa callosa					
Lateral		++	++	++	++
central	++	++			
Totalidad	50%	100%	50%	50%	50%
Friabilidad	++	+++	+++	++	++
Tamaño	++	++	++	++	++
Desarrollo de raíces	-	-	-	-	-
aspecto	+	++	++	++	++

3. RESPUESTA DE LOS EXPLANTOS PROVENIENTES DE HIPOCÓTILES DE GENOTIPOS DE INTA MANFREDI, A LA AGROINFECCIÓN.

Se infectaron los discos de hipocótiles de los genotipos R5 y R6 inyectando la suspensión de *Agrobacterium* con agujas de tuberculina, y se estudió la respuesta de los tejidos ante la infección. Ambos genotipos mostraron cambios en los parámetros de desarrollo observados. Comparados con el control sin infectar, los callos disminuyeron la friabilidad y el tamaño y tendieron a desarrollar callos más aún desde las porciones laterales en detrimento del sector central. La prueba histoquímica mostró que todos los sectores azules correspondientes a las células transformadas se ubicaron en la zona central y superior del explanto (Tabla 3.1.).

Tabla 3.1.: promedio y desvío standard del número de puntos azules y su distribución en los callos provenientes de discos de hipocótiles, revelados por la reacción de β -glucuronidasa en los genotipos R5 y R6. Cada valor es el promedio de 4 repeticiones con n=20.

genotipo	media	desvío	Ubicación de los puntos azules			
			centro	perímetro	inferior	superior
R5	15,18	5,93	15,1	0,08	2,25	12,93
R6	16,54	4,97	16,54	0	15,79	10,74

Las zonas transformadas se concentraron en la zona central del explanto, comprometiendo la zona de los haces vasculares y del parénquima medular que es el primero en responder a los estímulos hormonales del medio de cultivo ([figura 3.1](#))

4. ESTUDIO DE REGENERACIÓN Y TRANSFORMACIÓN A PARTIR DE HIPOCÓTILES DEL GENOTIPO HA300B

4.1. FORMACIÓN DE CALLOS Y EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA

Se estudió la formación de embriones somáticos a partir de los callos desarrollados en los dos tipos de cortes de hipocótiles (discos, DS o secciones longitudinales, SL) en el genotipo Ha300b desarrollándose en el medio B.

Luego de los primeros 14 días de crecimiento en oscuridad se comenzaron a desarrollar, a partir de los callos, estructuras globulares semejantes a embriones en estado globular o de corazón en los callos derivados de discos (DS) y secciones longitudinales (SL) de hipocótiles. Durante el cultivo en la oscuridad se observó el desarrollo de un callo color verde claro, de gran vigor de crecimiento y de marcada friabilidad. Asimismo, fue evidente la respuesta diferencial entre el parénquima cortical y el medular (junto con los haces vasculares) tanto en la etapa inicial (sin luz) como en la siguiente (con luz). En la primera, las regiones del explanto mencionadas se separaban entre sí, quedando una esfera central (parénquima cortical y haces vasculares) rodeado de un anillo (parénquima cortical). En la segunda etapa, la región correspondiente al anillo mostró, por sectores, el desarrollo de un callo de aspecto nodular y de intenso color verde, a partir del cual desarrollaron los embriones somáticos. Se distinguían del resto del tejido desdiferenciado por su forma redondeada, su color verde brillante y la facilidad con que se desprendían del resto del callo.

Luego de una semana a la luz, estas estructuras diferenciadas, desarrollaron en embriones somáticos (Tabla 4.1). Se cuantificó la cantidad de embriones obtenidos a

partir de ambos tipos de explantos tratados y sin tratar con *Agrobacterium* para determinar si el cocultivo interfiere en el desarrollo de estas estructuras.

Tabla 4.1.: Número total de embriones somáticos y embriones por explanto observados en los callos provenientes de discos y de secciones longitudinales inoculados con *Agrobacterium* y controles sin tratar. Cada valor es el promedio de dos repeticiones sobre un n=20.

Tipo de explanto	Número de embriones	Embriones por explanto
Discos		
control	22,5	1,125
Inoculados 1	49	2,4
Inoculados 2	46,75	2,5
Secciones Longitudinales		
control	71	4,2
Inoculados SLA	13,5	2
Inoculados SLC	25	2,62

La respuesta en cuanto al desarrollo de embriones somáticos fue diferente en ambos explantos. En las SL se formaron más embriones que en los discos. En el caso de los discos hubo mayor cantidad de formaciones en los tratamientos con *Agrobacterium* que en el control, mientras que en las SL se formaron más embriones en el control. Luego de 14 días de crecimiento en el medio B se observó que en el 100% de los casos se desarrollaron callos abarcando la totalidad del explanto original. El aspecto de los mismos era friable, de color verde claro, pero el tamaño de los infectados fue algo menor que los controles, como en el caso de los genotipos R5 y R6, probablemente, debido al estrés provocado por la agroinfección.

Tabla 4.2.: eficiencia de regeneración en secciones longitudinales y discos de hipocótilos (medida como plántulas obtenidas en relación al número inicial de embriones somáticos desarrollados).

Tratamiento	Secciones Longitudinales	Discos
Control	0,41	0,042
Tratado con A.t.	0,18	0,31

El promedio de embriones somáticos por explanto obtenidos en el mejor de los casos fue de 4,2 (Tabla 4.1.); los embriones se separaron de los callos para permitir su posterior desarrollo como plántulas. El 40% de los embriones obtenidos a partir

de SL (control) desarrolló plántulas de aspecto normal que se transfirieron a medio 0,25 MS para enraizar. De éstas se obtuvieron 30 plantas completas que se cultivaron en macetas.

5. ESTUDIO DE LA SENSIBILIDAD AL AGENTE SELECTIVO PAROMOMICINA.

Se estudió el efecto de la paromomicina (Pm) como agente selectivo sobre la regeneración de los hipocótilos sometidos al tratamiento con *Agrobacterium*. En ensayos preliminares se observó el efecto de 0, 75 y 100 mg/l de Pm. Este agente mostró una marcada diferencia entre los explantos tratados con A.t. y los controles, en relación al desarrollo de callo. En ningún caso se produjo la muerte de los callos luego de 20 días de cultivo, pero a 75 mg/l se evidenció la capacidad de detoxificar al antibiótico en los agroinfectados.

Para evaluar el efecto de una mayor concentración de antibiótico y de la agroinfección sobre la capacidad de diferenciación de los callos, en un ensayo posterior se suplementó con 0, 100, 125 y 150 mg/l de Pm. A los 15 días de cultivo se observó una marcada disminución en la frecuencia de aparición de estructuras nodulares (preliminares de embriones).

En ensayos subsiguientes se observó que en el caso de los controles sin infectar, 150 mg/l de Pm no afectaron la embriogénesis como en el caso de los tratamientos con A.t. Tanto los discos como las secciones longitudinales con Pm disminuyeron el número de embriones somáticos producidos en relación al control (Gráficos 5.1 y 5.2).

Gráfico 5.1.: Sensibilidad a la paromomicina de los callos provenientes de discos de hipocótilos (DS)

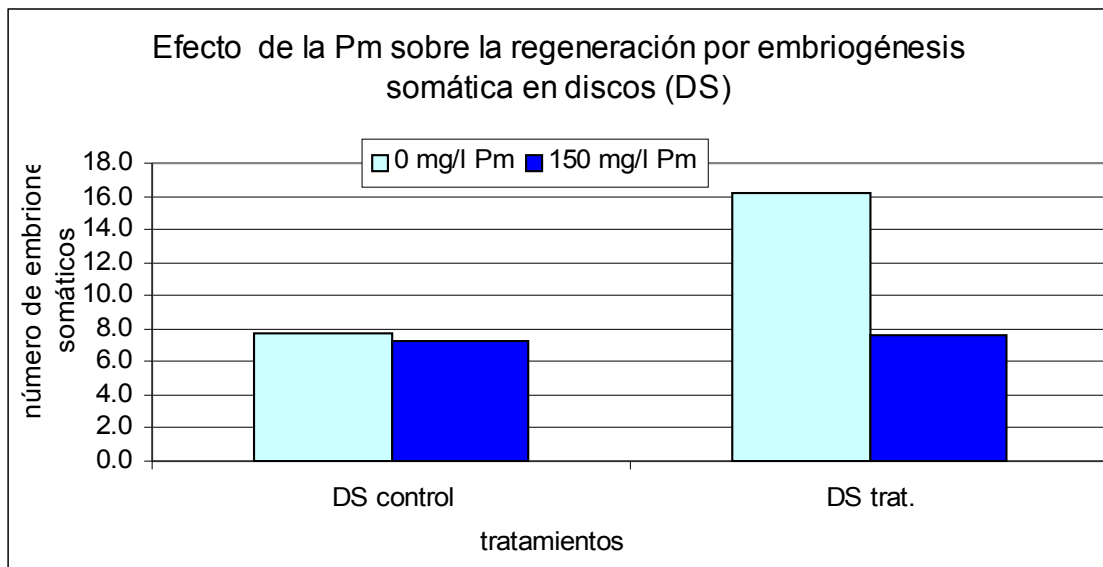


Gráfico 5.2: Sensibilidad a la paromomicina de los callos provenientes de secciones longitudinales de hipocótilos (SL; datos a partir de dos repeticiones de n=20).

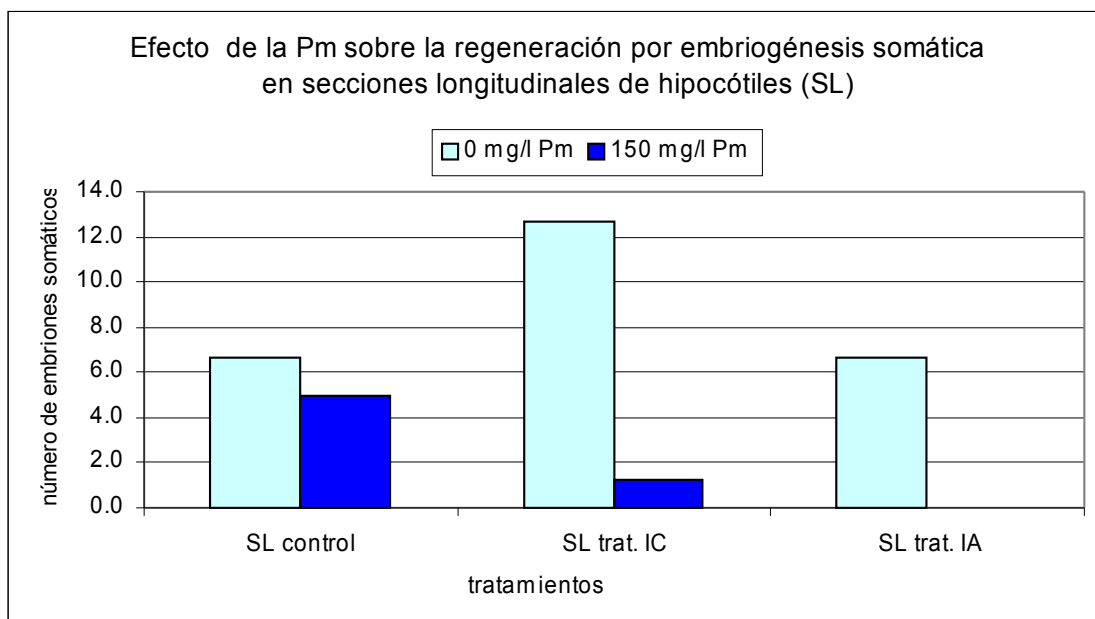
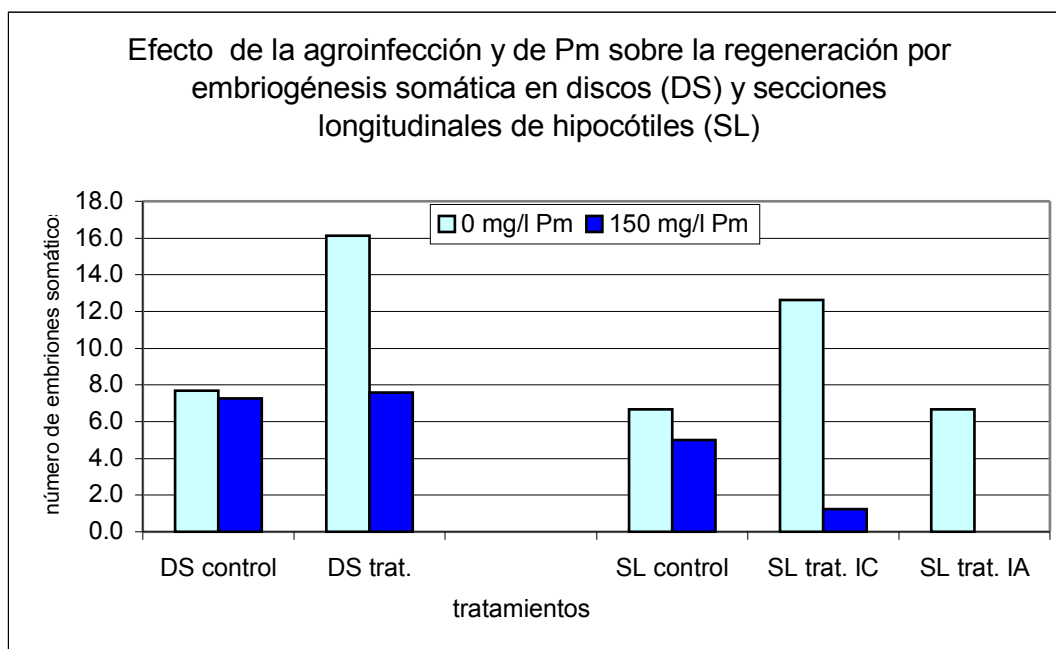


Gráfico 5.3: Efecto de la agroinfección sobre la embriogénesis somática en discos y secciones longitudinales de hipocótilos. Los datos corresponden a dos repeticiones de n=20.



Se estudió la influencia del tiempo de cocultivo y dos formas de administración del inóculo bacteriano sobre los explantos en la eficiencia de transformación. Se ensayaron dos tipos de inoculaciones con *Agrobacterium*: por inundación en la caja de Petri (IN) o inyectando con agujas de tuberculina (P) y los tiempos de cocultivo de 24 y 48 hs.

Se realizó el ensayo histoquímico de la actividad β -glucuronidasa (Tabla 2.3) y se encontró que el 100% de los explantos infectados presentaron eventos de transformación (puntos azules que corresponden a grupos de células transformadas) con un promedio entre 28 y 32 por explanto. No se observaron diferencias entre los dos tiempos de cocultivo.

Tabla 2.3: Reacción de β -glucuronidasa en Ha300b: número (media y desvío standard), distribución (centro y perímetro) y ubicación (cara superior o inferior de los discos) de puntos azules por explanto en ensayos de transformación inoculando con aguja de tuberculina (P) o por inundación (IN).

Tratamientos	media	DS	Ubicación de puntos azules			
			centro	perímetro	inferior	superior
24 hs cocultivo						
P	30,08	16,67	30,00	0,08	8,33	21,83
IN	32,9	14,65	32,86	0,04	11,1	14,85
48 hs cocultivo						
P	28,75	13,55	27,6	1,15	11,7	26,7
IN	28,65	25,15	24,67	2,18	5,75	22,6

Todos los explantos tratados mostraron por lo menos un evento de transformación. La mayoría de los puntos se concentró en la zona central del explanto, y preferentemente en la zona superior del mismo. El aumento en el tiempo de cocultivo, no se manifiesta en un aumento del número de puntos por explanto. En ambos tipos de inoculaciones (P o IN) los valores son similares y los puntos se encuentran también mayormente en la cara superior del explanto. La eficiencia de transformación en Ha300b fue mayor que en los genotipos R5 y R6, aunque la distribución de las áreas transformadas fue similar.

Habiendo observado que las zonas transformadas en los discos se ubican mayormente en las zonas centrales de los explantos y no en el perímetro, o zona de callo más friable candidata a desarrollar embriones, se diseñó un ensayo tomando como hipótesis si la eficiencia de transformación podía variar cambiando el tipo de corte en los explantos y si ubicando a éstos de otra forma se favorecería la interacción célula vegetal-agrobacteria.

Se utilizaron discos (DS)(como en el caso anterior) y secciones longitudinales divididas en dos (SL) , ubicando a éstas en el medio de cultivo con la zona del corte hacia abajo (SLA) o de costado (SLC).

La reacción de β -glucuronidasa mostró en los discos 100% de eficiencia de transformación (por lo menos un evento por explanto), y se distribuyó como anteriormente: alrededor de los haces vasculares y en el tejido medular, no así en el callo formado alrededor del explanto. Las SL no superaron el 60% de transformación en ambas posiciones, y en el caso de los SLC sólo se encontraron estrías azules muy tenues en el sentido de los haces vasculares. Es decir que el cambio del corte y posición de los hipocótilos no sólo no aumentó la eficiencia de transformación, sino que la disminuyó, quizás por haber cambiado la superficie de contacto entre célula y bacteria.

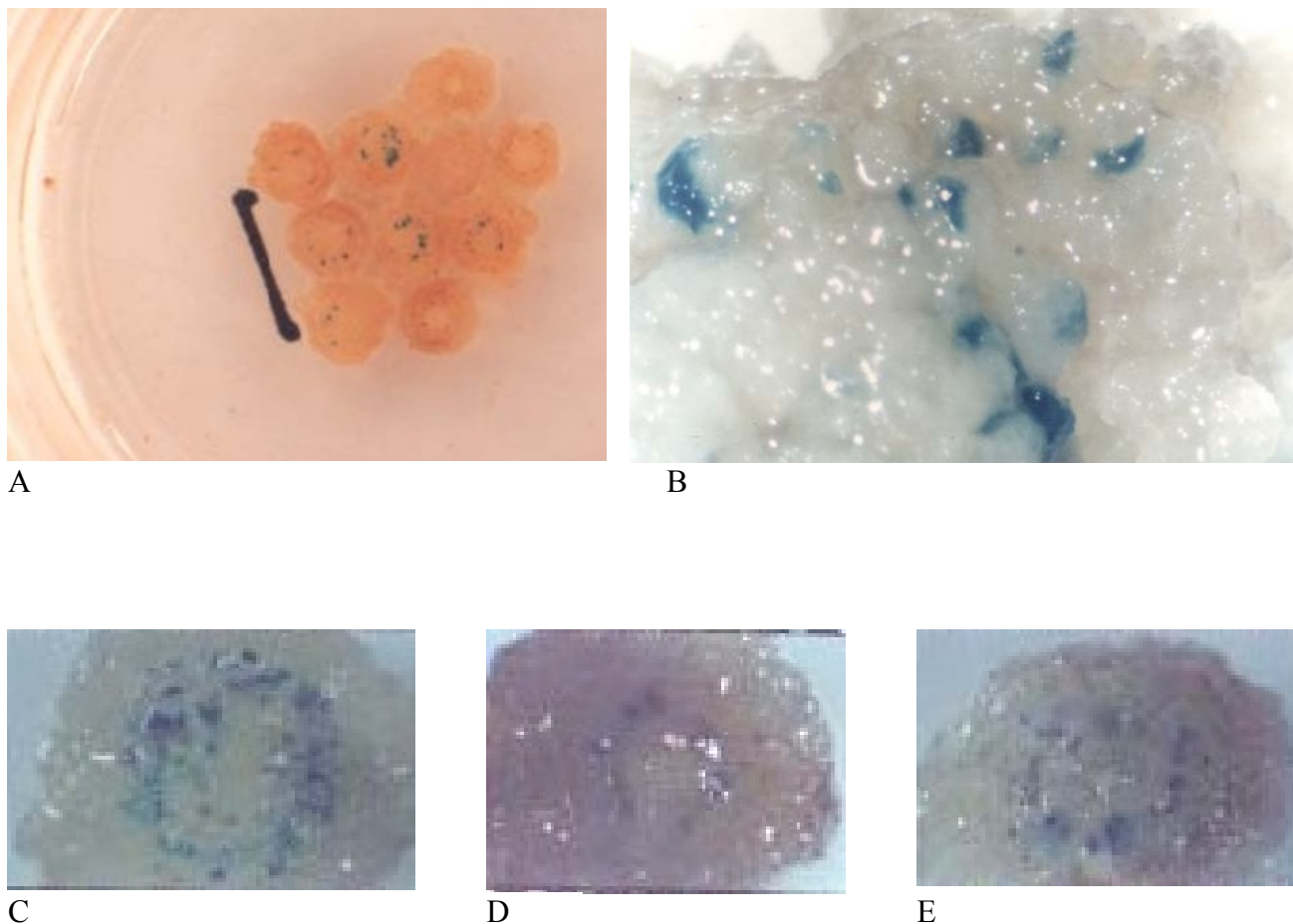


Figura 3.1.

Distribución de las células o grupo de células transformadas en discos de hipocótilos, revelado mediante el test histoquímico de β -glucuronidasa.

A: disposición de los discos en placas de Petri al realizar la reacción mostrando el tamaño de los mismos. Referencia: 1cm.

B, C, D y E: detalle de discos tratados mostrando la prevalencia de la coloración azul en las zonas de haces vasculares.

RESULTADOS HOJAS

Con el fin de estudiar la factibilidad de usar a las hojas como explanto para la regeneración y transformación, se realizaron ensayos con diferentes combinaciones de reguladores de crecimiento y fuente de carbono. En la tabla y [figura hojas 1](#) se vuelcan las principales respuestas obtenidas en el cultivo *in vitro* de hojas:

Medio de cultivo	Componentes adicionados al medio de cultivo						Respuestas				
	ANA (mg/l)	BAP (mg/l)	ZEA (mg/l)	GA ₃ (mg/l)	glucosa (g/l)	sacarosa (g/l)	callo	Regeneración	raíces	Embriones somáticos	Plantas enteras
HC	0	1	0	0,1	0	30					
HD	0,5	0	0	0,1	0	30	X	X		X	X
HE	0	0,5	0	0,1	0	30	X	X		X	X
HF	0	2	0	0,1	0	30					
HG	0,5	1	0	0,1	0	30	X	X			
HH	0,5	0	0	0,1	10	0		X		X	X
HI	0,5	0,5	0	0,1	0	30	X	X		X	X
HJ	0,5	0	0,5	0	0	30	X				
HK	0	0	0,5	0	0	30	X			X	
HL	0	0	2	0	0	30					
HM	0,5	0	3	0	0	30	X		X		

En todos los tratamientos, a los 5 días de cultivo se observaron cambios morfológicos, consistentes en hiperplasia de células, desdiferenciación de tejidos y formación de callos según los casos. En general a mayor relación ANA:BAP se favoreció la desdiferenciación celular con la consiguiente formación de callos. A menor relación ANA:BAP, la respuesta fue de aumento de volumen celular, deformación y enrollamiento de las hojas. En la relación 0,5:0,5 de ANA:BAP se encontraron ambos efectos combinados. Los medios que sólo contenían ANA también formaron callos, pero menos extendidos. Los medios con otras relaciones de ANA/BAP produjeron también raíces y estructuras de tejidos diferenciados de tipo embriogénicas.

A 10 días de tratamiento se observaron formaciones de callos en los medios HD,HE,HG e HI; sobre estos callos se formaron embriones somáticos en los medios D, E e I. Los medios con menor respuesta fueron HC y HF, es decir, los que contenían solamente BAP. Los embriones o estructuras meristemáticas se separaron del explanto original y se subcultivaron a medio MS 0,1 mg/l de BAP y una vez desarrolladas las primeras hojas, se subcultivaron a medio 0,25 MS. Luego de 30 días, sólo siguieron su desarrollo normal los provenientes de los medios HD y

HE (0,5/0 y 0/0,5 de ANA/BAP). En el medio HE, de los 12 embriones aislados, 7 desarrollaron en plántulas de las cuales 3 enraizaron y el resto continuó formando callo en la base en lugar de raíces. En el medio HD se obtuvieron 19 estructuras meristemáticas (a partir de 25 hojas originalmente) de los cuales sólo progresaron 4 formando brotes pero no enraizaron; en el medio HH (0,5/0 y glucosa) de los 24 meristemas regenerados desarrollados inicialmente (partiendo de 25 hojas), sólo prosperaron 2, de los cuales, uno formó raíces y el otro botón floral.

La mejor respuesta se obtuvo en el medio HI (0,5/0,5 de ANA:BAP), en la que los callos abarcaron todos los bordes, las nervaduras y las zonas de cortes, y los embriones somáticos se visualizaron antes que en el resto de los tratamientos. A los 10 días de tratamiento, esta combinación mostró una gran proliferación de callo, en casi toda la superficie de la hoja, especialmente en las nervaduras y bordes cortados. Esta combinación fue la de mayor eficiencia de regeneración: desarrollaron 20 embriones somáticos, de los cuales prosperaron 8 plántulas, 7 formaron callo en la base y una botón floral.

Comparación del efecto producido por las dos citoquininas utilizadas (ZEA y BAP): en 10 días de tratamiento comenzaron a formarse callos en todos los tratamientos, pero recién a los 30 días, se distinguieron los diferentes efectos de las combinaciones hormonales: la zeatina aisladamente, produjo formación de callos en las nervaduras, y en las zonas de corte se observaron embriones somáticos; estos efectos se acentuaron más cuando la concentración de zeatina fue la menor (0,5 mg/l). Al combinar la zeatina con las auxinas (medios HJ y HM: 0,5/0,5 y 0,5/2 mg/l de ANA:ZEA), hubo desarrollo de raíces y disminución de la cantidad de embriones desarrollados, y los callos se concentraron en las nervaduras. A iguales concentraciones, los efectos de la zeatina fueron menos evidentes que los de BAP.

En los experimentos de transformación en hojas se intentaron distintas variantes: se probaron dos tiempos de cocultivo: 24 y 48 horas en cultivo líquido; se modificó el tipo de corte, diferenciando la parte media, distal y proximal de la hoja, y clasificando por tamaño de hoja (pequeñas o grandes). Luego se probó el reemplazo de la sacarosa por la glucosa y el cocultivo en medio líquido bajo agitación versus sin agitación para evitar la aparición de contaminaciones que hubo en ensayos preliminares. Se utilizaron las concentraciones de ANA:BAP que mejor respuesta dieron en los ensayos de combinaciones hormonales y se separaron las

nervaduras del mesófilo de la hoja , con el objeto de crear condiciones de interacción diferentes entre célula y bacteria.

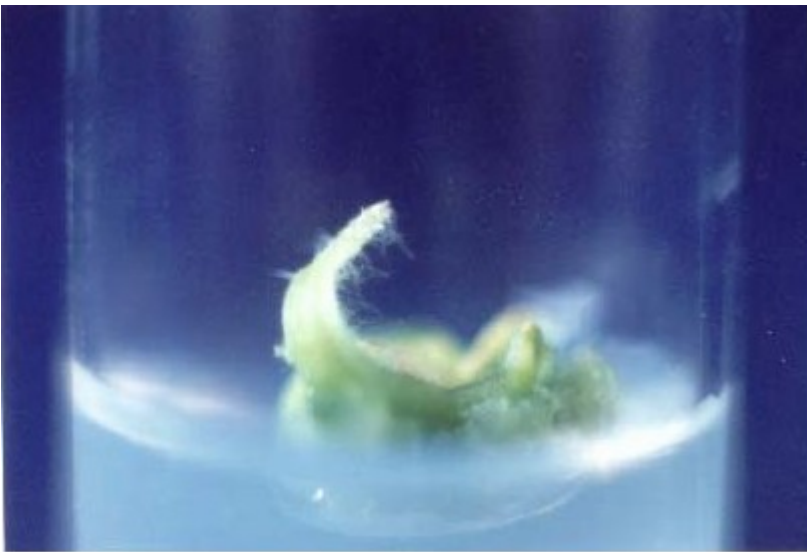
Como resultado de todas las pruebas realizadas no se obtuvieron puntos azules en las pruebas histoquímicas de ninguno de los ensayos.



A



B



C



D

Figura hojas 1

Cultivo *in vitro* de hojas.

A: inicio del cultivo en medio HI.

B: cultivo en medio donde no prolifera el callo.

C: hoja en medio HI con callo desarrollándose.

D: plántula regenerada a partir de embriones somáticos desarrollados en los callos.

RESULTADOS HEMI EMBRIONES (MERISTEMAS)

Para abordar el estudio de factibilidad de uso de un nuevo explanto como blanco de transformación, los meristemas apicales de los embriones maduros, se realizaron diversos ensayos conducentes a establecer las condiciones óptimas de regeneración y de transformación de los mismos, así como la evaluación de la aptitud de diversos genotipos para este sistema de cultivo de tejidos.

1. EVALUACIÓN DE LA APTITUD DE DIFERENTES GENOTIPOS PARA LA REGENERACIÓN DE BROTES A PARTIR DE MERISTEMAS.

Se evaluó la aptitud de diversos genotipos pertenecientes a líneas públicas y comerciales en relación a la capacidad de generar brotes a partir de sus meristemas extraídos como explanto inicial (figura 1.1). Se consideró como dato relevante el número de yemas a obtener por explanto sembrado. No todos los genotipos respondieron de la misma forma bajo las condiciones de cultivo establecidas. La tabla muestra la tasa de multiplicación de yemas obtenida para los diferentes genotipos evaluados. Las diferencias entre las repeticiones de un mismo genotipo siempre fueron menores que aquellas encontradas entre genotipos.

Tabla 1.1.: Eficiencia de regeneración de los genotipos estudiados en número de yemas obtenidas por explanto inicial.

Genotipos	Número de yemas por explanto
Líneas públicas	
Ha 372	1,5
Ha	2,5
Ha 821	1,5
Ha 89	3,2
Ha 370	2,6
Ha 300	3,0
Ha 302	2,6
Ha 61	2,0
Ha 124	2,2
RHa 275	1,8
Líneas Manfredi	
B 81-1786	2,6
B 85-11-8	0,2
B 83-3	1,45
B 82-11-2	1,2
R 88-19	2,1
R 79-73	1,7
R 88-16	2,0
R 88-20	2,5

La continuidad de los ensayos de cultivo *in vitro* con los genotipos públicos, se llevó a cabo principalmente con los genotipos Ha 89b y Ha 300b debido a que mostraron una buena tasa de multiplicación además de la viabilidad de las yemas regeneradas. El seguimiento de un ensayo evaluando la capacidad de regeneración de Ha89 indica que de 30 explantos sembrados se rescataron 115 yemas (3,8 yemas/explanto) de las cuales alrededor del 50% fue posible enraizar, rusticar y transferir a invernáculo.

En lo que se refiere al genotipo Ha 300b (partiendo de igual número de explantos) se obtuvieron 15 plantas en invernáculo de las cuales sólo 2 presentaron un aspecto normal en lo referido al número de hojas, altura y diámetro del capítulo.

Los resultados obtenidos muestran claramente la diferente aptitud para las respuestas *in vitro* de los genotipos ensayados, desde el punto de vista del cultivo de tejidos el genotipo Ha 89 a mostrado ser, entre todos los probados, el de mejor comportamiento como fuente de estos explantos debido a que posee una buena tasa de multiplicación, enraíza satisfactoriamente y muestra un vigor aceptable en la etapa de rusticación del material, además de ser una línea considerada de buena aptitud y calidad por los criadores.

2. TRANSFORMACIÓN CON *AGROBACTERIUM*

2.1. EVALUACIÓN DE LA APTITUD DE DIVERSOS GENOTIPOS PARA LA TRANSFORMACIÓN CON *AGROBACTERIUM*

En la tabla 2.1 se muestran las eficiencias obtenidas en el tratamiento con *Agrobacterium*, revelados mediante el test histoquímico de la β -glucuronidasa. Se comenzó a trabajar utilizando como genotipo modelo el Ha300b, obteniéndose una eficiencia de transformación de 49% (tomando como positivos los explantos que mostraban por lo menos un evento de transformación). Habiendo observado que esta eficiencia de transformación era razonablemente efectiva, se ensayó el sistema en otros genotipos (líneas públicas y privadas) para evaluar la aplicabilidad del mismo. Durante el manipuleo de las semillas para el corte, se observó que éstas variaban en el nivel de dureza e imbibición, según los genotipos. Como puede observarse en la tabla 3, todos los genotipos respondieron positivamente ante el

protocolo probado, con una eficiencia de transformación cercana o mayor al 50%, siendo los de mayor eficiencia los R3, R1, R4 y R2.

Los eventos de transformación poseían diversas formas: puntos o áreas con coloración azul intenso ([figura 2.1.1](#)). Estas zonas azules (áreas y puntos) coexisten en el mismo explanto, tanto en la parte basal como en los brotes en diferente proporción según el genotipo. En el genotipo B1 sólo se encontraron áreas transformadas, y en el resto de los genotipos tanto puntos aislados como áreas.

En nuestro genotipo modelo, Ha300b, de 142 explantos analizados por el test histoquímico, 48% mostró zonas transgénicas, presentando tanto puntos como áreas; de estos ensayos posteriormente se obtuvieron plantas de las cuales 30% resultaron quimeras, mostrando la actividad del transgén en diversas zonas, especialmente en tejido vascular (nervaduras en hojas o haces en tallos) y un 4% resultaron ser uniformemente transgénicas (brotes azules) ([figura 2.1.2](#)).

El índice de distribución (I.D.) tuvo variaciones entre los genotipos: B5, R1 y R2 mostraron mayor concentración de células transformadas en el sector basal (I.D. menor a 0.2) y , mayor concentración en los brotes desarrollados a partir de los explantos tratados (I.D. mayor a 0,7).

Algunos de los genotipos que respondieron de manera favorable a la agroinfección desarrollaron muy pocas yemas por explanto (B1, B5, R4); de manera que los genotipos que reunieron favorablemente ambas características fueron: Ha89, B2, y R3 en primer lugar y Ha300b, R1 y R4 en segundo lugar. Dentro de los genotipos con mayor % de transformación, el Ha89 además reúne la característica de poseer alto ID y alto número de brotes por explanto.

Tabla 2.1: Eventos positivos (en forma de puntos o áreas azules) revelados con el test histoquímico de la β -glucuronidasa en diferentes genotipos observados en muestras extraídas entre los 15 y 20 días de la agroinfección.

Genotipo	n (1)	puntos (%) (2)	areas (%) (3)	% transf. (4)	I.D. br/b (5)
Ha300b	142	23,24	25,35	48,59	0,85
Ha 89	84	27,4	42,8	70,2	0,77
B1	31	0	62	62	0,63
B2	79	27,84	44,3	72,14	0,75
B4	34	18	35	53	0,7
B5	33	34,5	47	82,5	0
R1	32	41	53	83	0,2
R2	40	55	30	85	0,18
R3	33	51	40	91	0,72
R4	30	37	50	87	0,44

(1) número de muestras tomadas de ensayos con un mínimo de 3 repeticiones cada uno y un n mayor de 30 cada uno.

(2) eventos de transformación revelados con la reacción de β -glucuronidasa en forma de puntos aislados. El porcentaje se calculó en función de la muestra tomada para el test.

(3) idem 2 pero en forma de áreas azules de tejido transformado.

(4) Número total de explantos con eventos positivos (puntos y áreas) en relación al número de muestras extraídas para el test histoquímico.

(5) Índice de Distribución calculado en base a la distribución de las zonas azules encontradas entre el explanto original (b) y el o los brotes desarrollados a partir de éste (br).

2.2. ESTUDIO COMPARATIVO DE LA INFLUENCIA DE COMPUESTOS FENÓLICOS SOBRE LA TRANSFORMACIÓN CON *AGROBACTERIUM*.

Se ha descrito que en presencia de compuestos fenólicos como la acetosiringona, que es naturalmente secretada por los tejidos de algunas especies vegetales dañados por heridas, favorece la inducción de la infección por *Agrobacterium* (Zupan y Zambryski, 1995).

A su vez, según estudios de los indicadores bioquímicos de la resistencia de girasol al hongo fitopatógeno *Sclerotinia sclerotiorum*, la presencia de compuestos fenólicos y la variación en la producción de los mismos en diferentes genotipos estaría correlacionada con la resistencia a este hongo (Bazzalo et al, 1991). La hipótesis planteada entonces fue si la alta producción de compuestos fenólicos podría correlacionarse con la capacidad de transformación de esos genotipos, y en los que no son productores naturalmente de fenoles, cuál sería la forma más apropiada para la incorporación de ACS en el cocultivo. Contando con los genotipos caracterizados por su alta producción de fenoles, se realizaron los ensayos de inducción mediante el agregado de ACS en la placa de cocultivo, en el medio de cultivo de las bacterias y en la suspensión obtenida para infectar. Paralelamente se

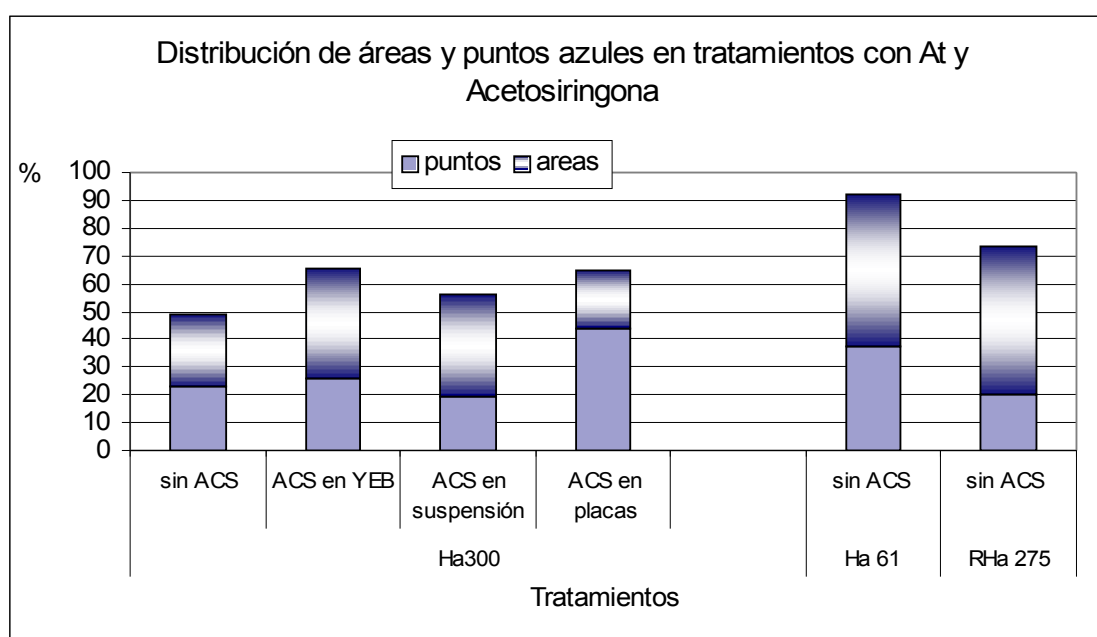
infectaron dos genotipos de alta producción de fenoles (Ha61 y Rha 275) para estudiar su comportamiento frente a la agroinfección.

En la tabla 2.2 se observan los resultados de transformación con *Agrobacterium* obtenidos en respuesta a los compuestos fenólicos al colocarse externamente (en Ha300b) y al secretarse de forma natural en genotipos con mayor producción de estos compuestos, en respuesta a las heridas.

Tabla 2.2: Eventos positivos (en forma de puntos o áreas azules) revelados con el ensayo histoquímico de la β -glucuronidasa en ensayos en Ha300b con acetosiringonas y en genotipos de mayor producción de compuestos fenólicos (Ha61 y Rha 275). Observaciones hechas en muestras extraídas entre los 15 y 20 días de la agroinfección.

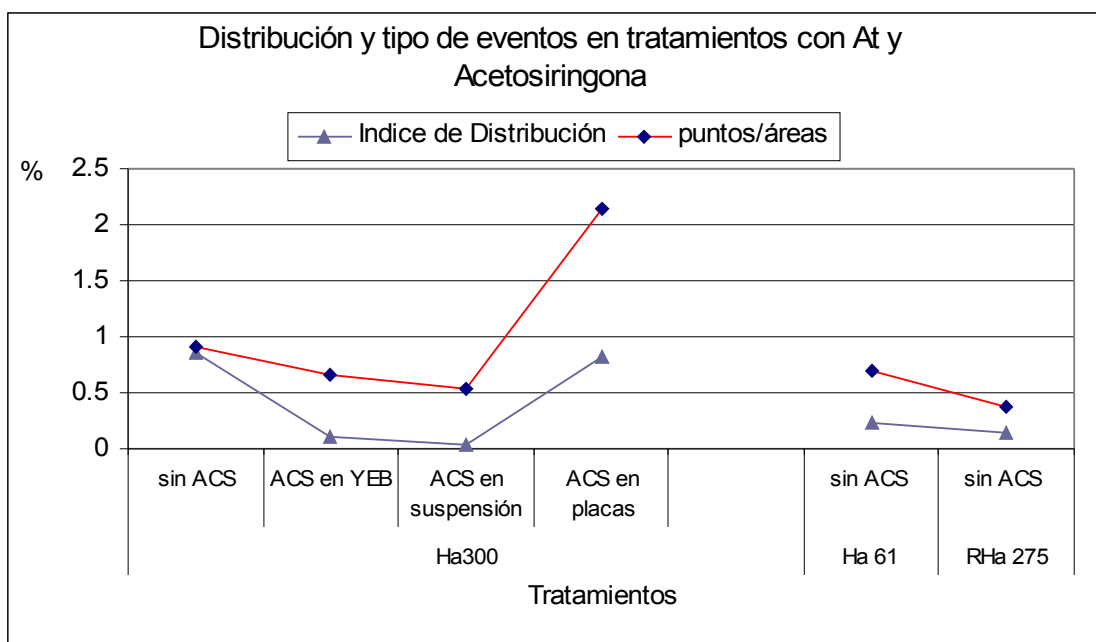
genotipo	tratamiento	n	puntos	areas	Ef transf (%)	I,D,
Ha300						
	a) sin AC	142	23,24	25,35	48,59	0,85
	b) AC en YEB	46	26,08	39,13	65,21	0,11
	c) AC en suspensión	41	19,51	36,58	56,09	0,04
	d) AC en placas	34	44,11	20,58	64,69	0,83
Ha 61	sin AC	53	37,68	54,7	92,38	0,24
RHa 275	sin AC	45	19,9	53,3	73,2	0,14

Gráfico 2.2. : Distribución de los eventos de transformación según ubicación y tipo en explantos tratados con y sin acetosiringona (ACS) en el genotipo Ha300b y en los genotipos Ha61 y Rha275.



El genotipo Ha300b no mostró diferencias en la eficiencia de transformación entre los tratamientos con acetosiringonas (medio YEB, placa y suspensión) y el control. Los genotipos Ha61 y Rha 275, mostraron una eficiencia de transformación de 92% y 73% respectivamente, estos valores superan en 43% y 24% a Ha300b sin ACS. Los eventos de transformación se observaron como puntos y/o áreas azules en la prueba histoquímica, variando la cantidad relativa de unos y otros en cada tratamiento. Para el genotipo Ha300b, se encontró igual cantidad de áreas que de puntos en el control sin ACS (23:25), pero en los tratamientos en los que la acetosiringona se adicionó en el medio YEB o en la suspensión para inocular, fue mayor la cantidad de áreas que de puntos (26:39 y 19:36); la mayor proporción de puntos en relación a las áreas se encontró en el caso de ACS en placa (44:20). En cambio, tanto para el genotipo Ha61 como para Rha 275, la diferencia entre puntos y áreas fue más acentuada en favor de las áreas y con diferencias mayores (37:54 y 19:53).

Gráfico 2.3.: Descripción de la distribución y tipo de eventos obtenidos en los tratamientos con y sin ACS en los genotipos Ha300b, Ha61 y Rha275.



Se describió un Índice de Distribución (ID= número de explantos con eventos en la base/ número de explantos con eventos en área apical). En términos del parámetro ID, (gráfico 2.3) de las tres alternativas probadas en el genotipo Ha300b, con el

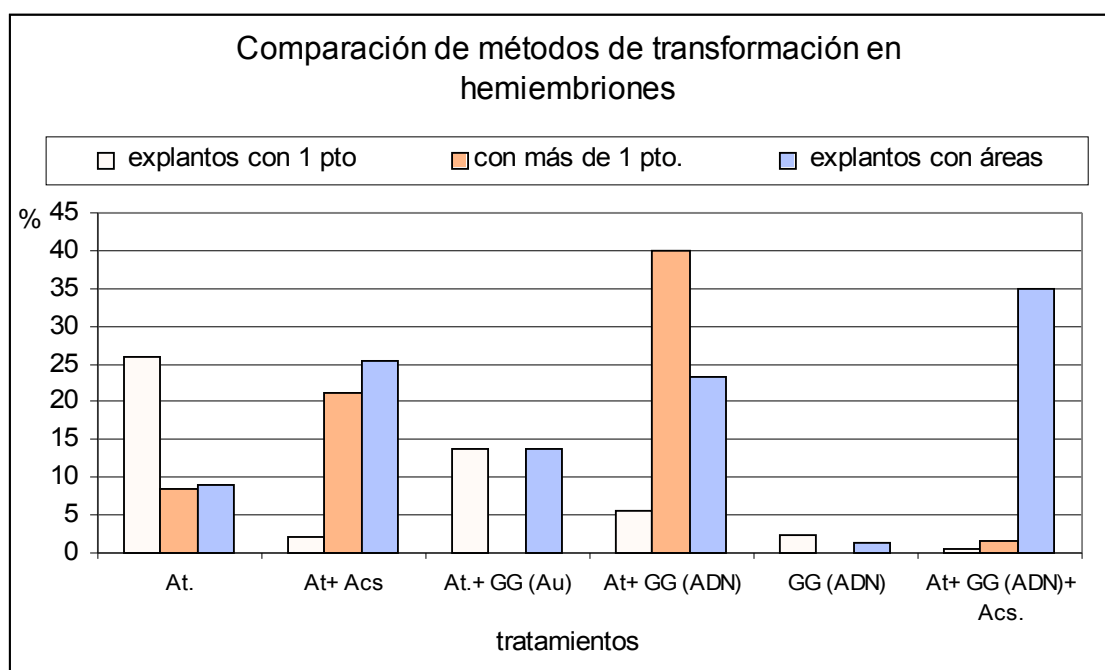
agregado de ACS en la placa de cocultivo se obtuvo un I.D. similar al control sin ACS mientras que el agregado en el medio de las agrobacterias y en la suspensión de bacterias para el cocultivo produjeron comportamientos similares entre sí (0,11 y 0,14) y con respecto a los genotipos Rha 275 y Ha61 (0,14 y 0,24). Es decir, que aún sin el agregado de ACS, estos genotipos caracterizados como de alto contenido de fenoles, se comportaron como el de bajo contenido con agregado de ACS en relación a la distribución de los eventos de transformación observados en las pruebas histoquímicas. ([figura 2.2.1](#))

3.3. ESTUDIO COMPARATIVO DE DIFERENTES MÉTODOS DE TRANSFORMACIÓN

Se realizaron ensayos para comparar la eficiencia de transformación, medida como expresión transiente a los 10 días del tratamiento. En el gráfico 3.3 se observan los resultados de las diversas técnicas de transformación estudiadas. Se utilizó el parámetro eficiencia de transformación (ET%) medido como número de explantos obtenidos con por lo menos un punto o área azul, en relación el número inicial de explantos tratados y se diferenciaron los resultados según la respuesta en cantidad de explantos con uno o más puntos o áreas.

El agregado de acetosiringona (100 mM) al tratamiento de cocultivo con *At.* provocó un aumento en el número de puntos y áreas azules. El bombardeo con partículas de oro sin recubrir, no incrementó la eficiencia de la transformación con *At.* En cambio, cuando se utilizaron partículas de oro cubiertas con ADN, el incremento fue notable en el número de puntos y en áreas azules. El bombardeo sólo con partículas con ADN tuvo la menor eficiencia de todas las combinaciones probadas. La combinación que resultó en una mayor cantidad de explantos con áreas azules fue la de *At.*, acetosiringona y con bombardeo de partículas con DNA.

Gráfico 3.3. Expresión transiente de la enzima β -glucuronidasa medida a los 10 días de la transformación. Referencias: At: cocultivo con *Agrobacterium*; Acs: Acetosiringona; GG(Au): bombardeo con partículas de oro sin recubrir con ADN; GG(ADN): bombardeo con partículas de oro recubiertas con ADN conteniendo la misma construcción que *Agrobacterium*; 1 pto: sólo con un punto azul en todo el explanto; áreas: zonas azules extendidas en el explanto.

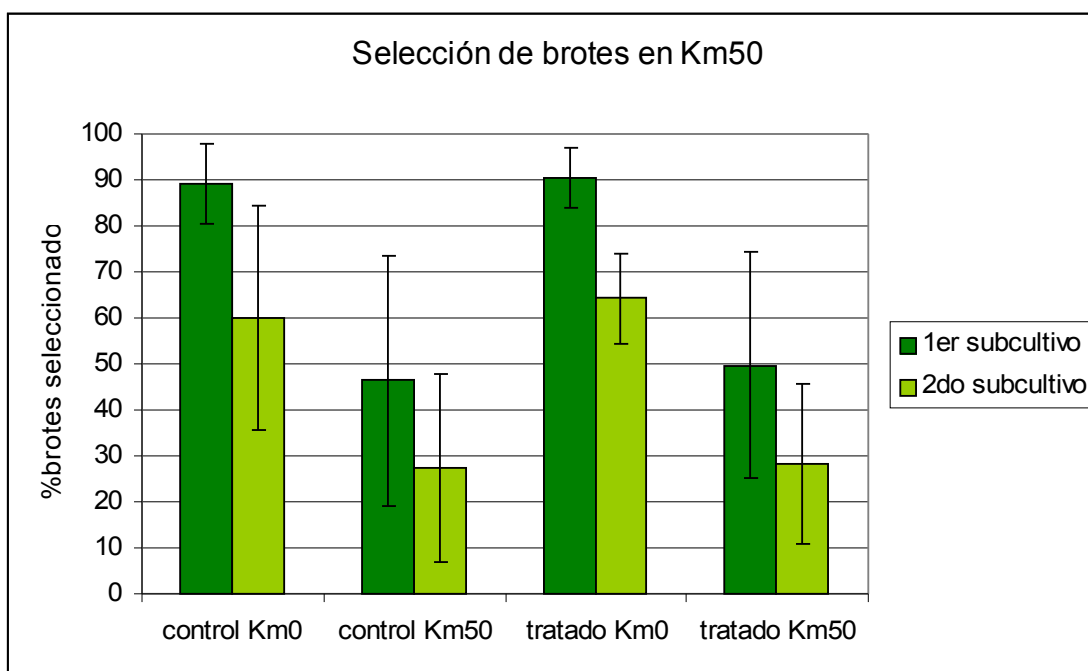


4. SELECCIÓN DE BROTES EN KANAMICINA.

4.1. SELECCIÓN DE BROTES EN KANAMICINA TRANSFORMADOS POR COCULTIVO EN PLACA.

Para estudiar la eficiencia del esquema de selección propuesto en la transformación de cocultivo en placa, se realizó un relevamiento de la cantidad de brotes viables aislados en los primeros dos subcultivos de los meristemas tratados con y sin kanamicina 50 mM.

Gráfico 4.1.1.: Eficiencia de selección, medida como % de brotes seleccionados en tratamientos con y sin kanamicina relevados en el primer y segundo subcultivo del esquema de selección.



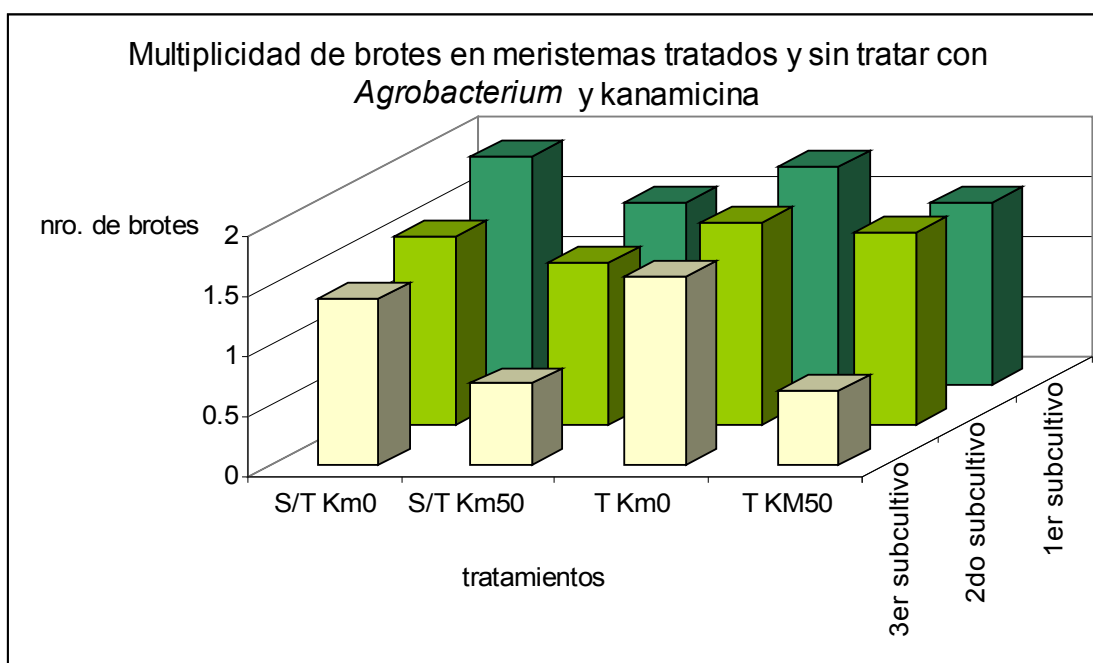
Para los brotes seleccionados en el primer subcultivo, se observan diferencias significativas entre los controles (sin transformar) con y sin km, así como entre los tratados (por cocultivo en placa) con y sin Km. Para el segundo subcultivo las diferencias significativas se observan sólo entre los tratados, con y sin km. Tanto en controles como en tratados, el porcentaje de brotes aislados disminuyó considerablemente en los tratamientos con km. También se observa que el tratamiento de transformación con cocultivo no estaría afectando *per se* la formación de brotes, ya que los niveles obtenidos en km para tratados y controles son similares.

5. ESTUDIO DE LA VARIACIÓN EN LA MULTIPLICIDAD DE BROTES OBTENIDOS MEDIANTE EL COCULTIVO DE HEMIMERISTEMAS CON A.T.

5.1. MULTIPLICIDAD DE BROTES EN LOS SUCESIVOS REPIQUES EN TÉCNICA DE COCULTIVO

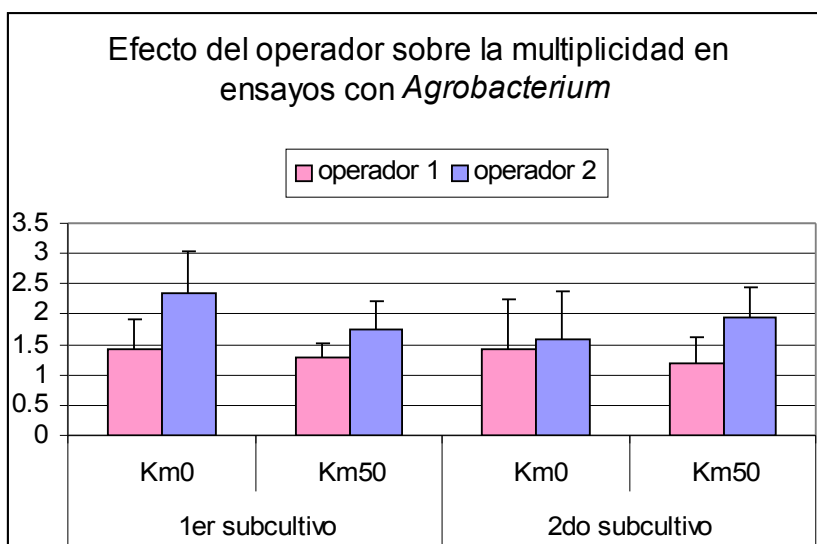
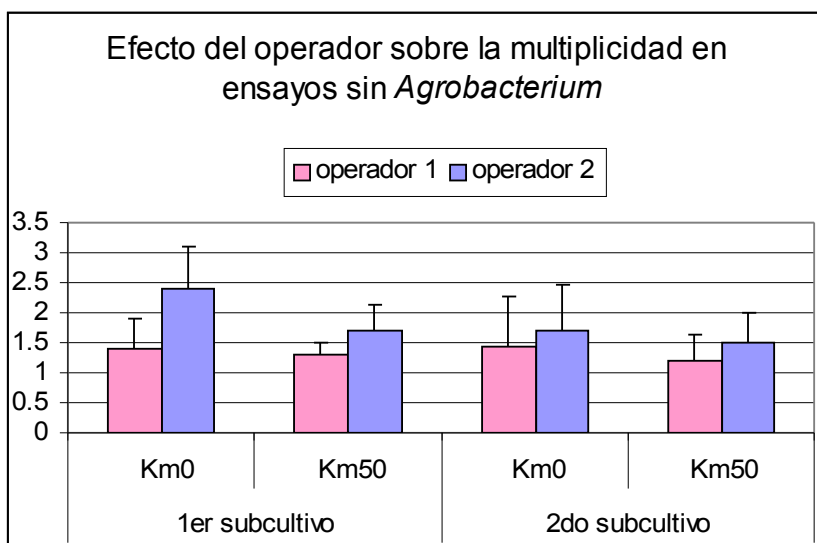
Se realizaron ensayos para estudiar el efecto de la kanamicina (50 mg/l) y el cocultivo con *Agrobacterium* sobre la multiplicidad de los brotes obtenidos en los sucesivos subcultivos de los meristemas tanto en cocultivo en cajas de Petri como en cocultivo en medio líquido. En el gráfico 5.1.1 cada barra corresponde al promedio obtenido en 15 ensayos con el genotipo HA89. Se observa que el cocultivo con *Agrobacterium* no afecta *per se* la capacidad de organogénesis a partir de estos explantos meristemáticos, pero el agente selectivo kanamicina tiene un efecto que se ve más acentuado en el primer y el tercer subcultivo.

Gráfico 5.1.1. Multiplicidad de brotes obtenidos en los explantos meristemáticos en presencia de *Agrobacterium* y kanamicina.



Observando que el promedio de multiplicidad en una gran cantidad de ensayos disminuyó en relación a los ensayos comparativos entre genotipos (2.4 vs. 3.2), se plantearon diversas hipótesis explicando este fenómeno, como el efecto del operador y del número inicial de explantos tratados. En los gráficos 5.1.2 y 5.1.3 se analizan estas dos variables.

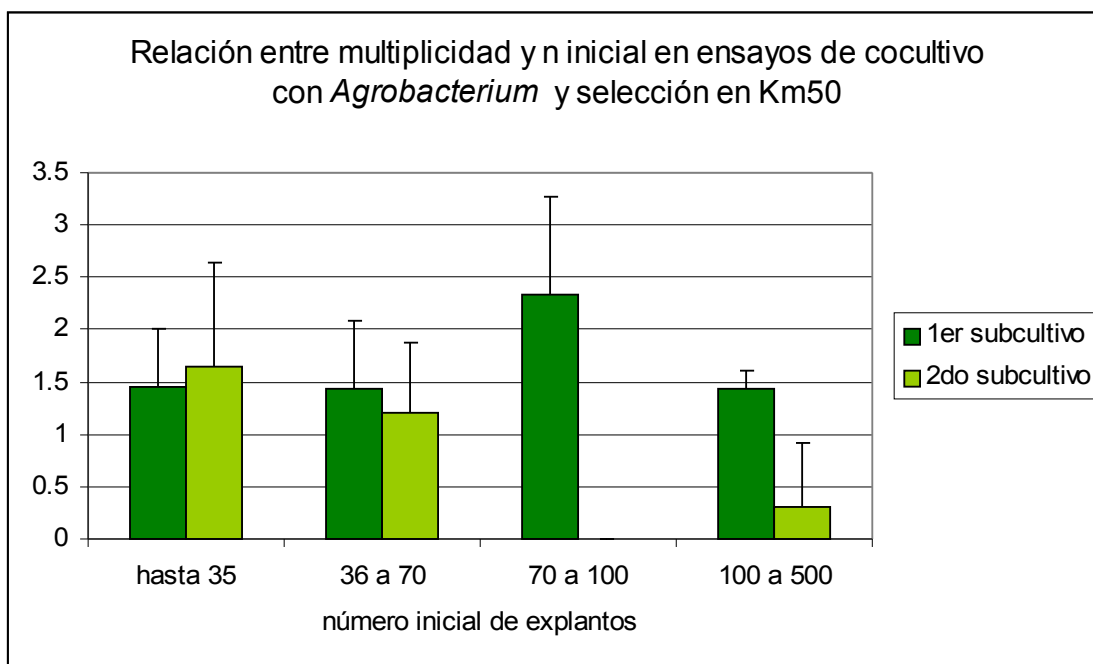
Gráfico 5.1.2: Incidencia de la variable operador en la multiplicidad en ensayos de cocultivo.



Se observa una diferencia e operadores en el número de brotes obtenido en el primer subcultivo con o sin At. La diferencia encontrada se aproxima al número de brotes de los primeros ensayos sin km (3.1).

La multiplicidad tiende a disminuir con el aumento del n inicial. Esta tendencia se acentúa más en el segundo subcultivo. El mayor cambio se observa al manipular más de 70 explantos iniciales por ensayo. Entre 20 y 70 explantos iniciales no hay diferencias entre los dos subcultivos.

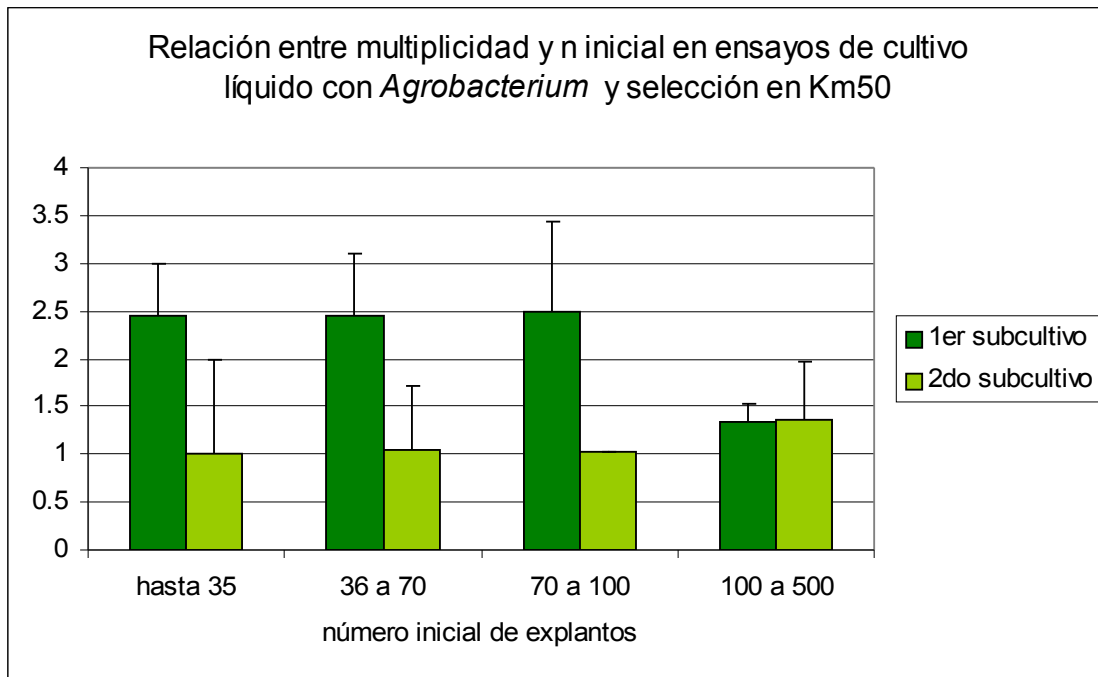
Gráfico 5.1.3.: Estudio del número inicial de explantos por ensayo sobre la multiplicidad.



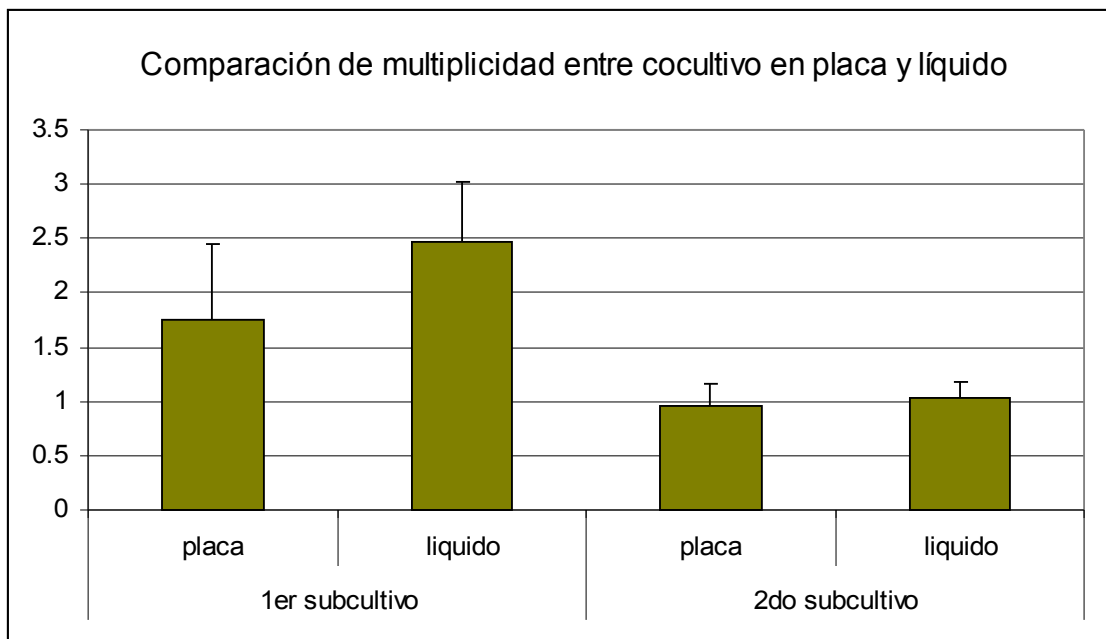
5.2. MULTIPLICIDAD DE BROTES EN CULTIVO LÍQUIDO

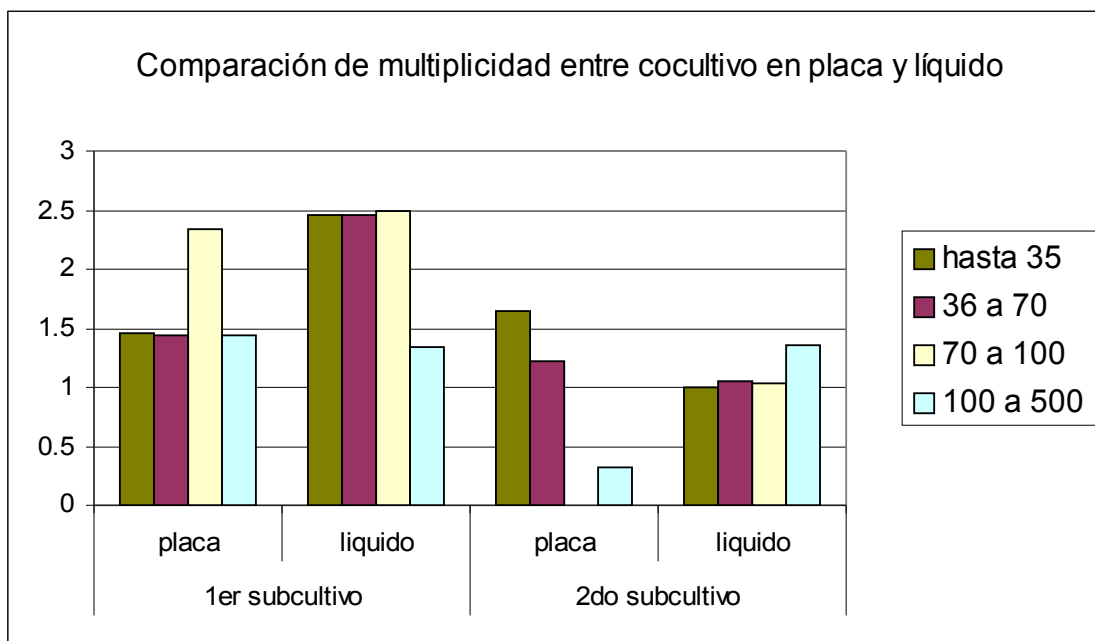
Se comparó la multiplicidad de brotes obtenidos durante los ensayos de cocultivo en medio líquido en relación al número inicial de explantos tratados. En el gráfico 5.2.1. se observan los resultados. En este sistema es menor la variación encontrada de multiplicidad en relación al número inicial de explantos tratados. A diferencia con el cocultivo en placa, en el líquido esta variable parece ser independiente del n inicial hasta 100 iniciales. Con más de 100, disminuye notablemente en el primer repique, y se mantiene en el segundo.

Gráfico 5.2.1.: Multiplicidad de brotes en relación al número inicial de explantos tratados en cocultivo líquido.



5.3. COMPARACIÓN DE LA MULTIPLICIDAD ENTRE COCULTIVO EN PLACA Y LÍQUIDO





Como se observó en los gráficos anteriores, la multiplicidad en el segundo subcultivo es menor en ambas técnicas de cocultivo. Pero para el cocultivo líquido, la tendencia marca una mayor multiplicidad en el primer subcultivo, especialmente cuando el n inicial es menor a 100.

6. COMPARACIÓN DE EFICIENCIAS DE TRANSFORMACIÓN POR TRATAMIENTOS Y CEPAS DE AT.

El tratamiento de cocultivo con At. en medio líquido se ajustó mediante ensayos previos en los cuales se colocaron los explantos en medio MS líquido y con agitación durante tres días, para luego colocar ubicarlos en medio MS sólido y seguir el mismo esquema de selección como con cocultivo en placa. Inicialmente se probaron diferentes diluciones de las agrobacterias en el medio (1:10, 1:30, 1:60) y se observó que la dilución 1:60 era la más efectiva. Esta dilución fue la que finalmente se utilizó en el resto de los experimentos.

Además de analizar el sistema de cocultivo en placa y líquido para la multiplicidad de los brotes, se compararon las eficiencias de transformación de cada sistema de transformación observando el número de brotes con PCR positiva obtenidos de cada tratamiento en relación al número inicial de explantos tratados. Se elaboraron tres índices que miden la eficiencia: (1): números de brotes con PCR positiva sobre

número inicial de explantos tratados; (2) % de brotes PCR positivos sobre el número de brotes injertados y (3) brotes injertados sobre explantos tratados (Tabla 6).

Tabla 6: Eficiencias de transformación obtenidas en diferentes tratamientos y cepas.

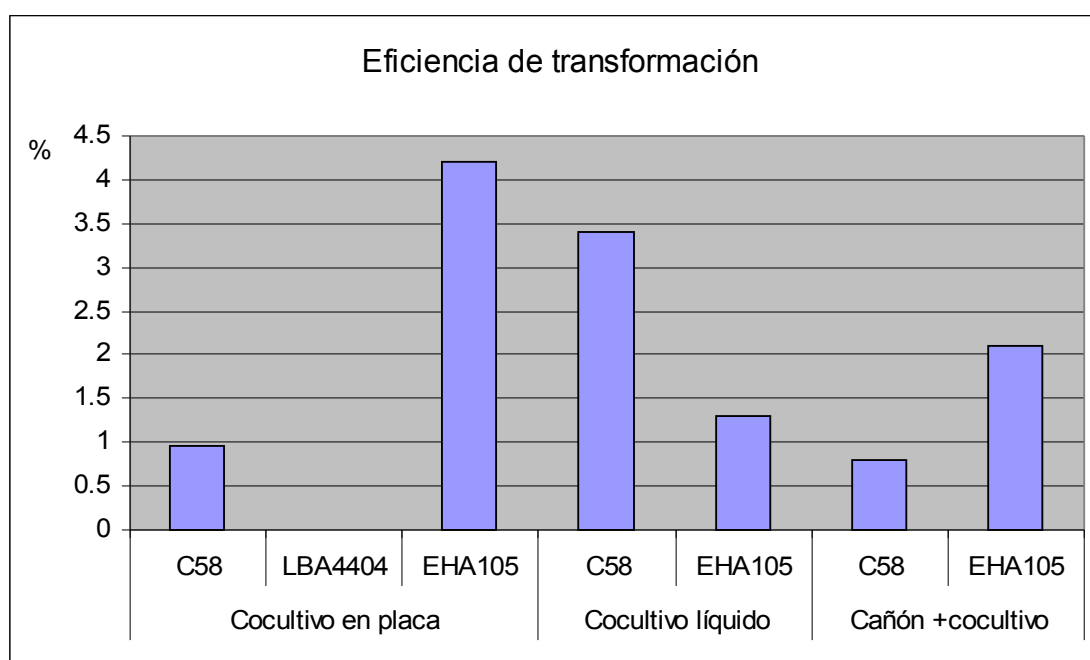
Tratamientos	Cepas de <i>A. tumefaciens</i>	Número de ensayos	Número de explantos (ni)	Número de brotes injertados	Eficiencia de transformación (%)		
					(1) prc+/ ni	(2) %prc+/inj	(3) inj/ ni
Cocultivo en placa	C58	10	1142	43	0,95	18,6	3,76
	LBA4404	20	3289	77	0	0	2,34
	EHA105	2	354	19	4,2	78	5,37
Cocultivo líquido	C58	9	720	71	3,4	35	9,86
	EHA105	2	154	2	1,3	100	1,30
Cañón + cocultivo	C58	5	369	44	0,8	6,8	11,92
	EHA105	1	46	2	2,1	50	4,35

(1) número de plantas PCR positivas sobre número inicial de explantos tratados.

(2) Número de plantas PCR positivas sobre el número de brotes injertados.

(3) Número de brotes injertados sobre número inicial de explantos tratados.

Gráfico 6.1. :



Se observó que la eficiencia de transformación varía según el tratamiento y la cepa utilizada. Para la cepa C58 se obtuvo mejor eficiencia en el cocultivo líquido, en cambio con la EHA105 el comportamiento en placa fue superior, tanto con o sin

bombardeo previo. En cuanto al índice (2) (% pcr+/inj, o cuántos brotes positivos se injertan en relación al total) que expresa el nivel de escapes del sistema, se observa que es mayor para la cepa EHA105 para los tres tratamientos. Con la cepa LBA4404 no se obtuvieron plantas positivas en ningún caso. En cada reacción de PCR se realizaron paralelamente controles internos con primers ITS ([figuras 6.1 y 6.2](#)).

Como ejemplo, en uno de los ensayos de cocultivo con la cepa EHA 105, de los 15 brotes injertados, fue posible relevar por PCR 12 plantas, de las cuales, 11 fueron PCR positivas y dos de ellas dieron semillas de aspecto normal. Asimismo, en un ensayo con la cepa C58, de 400 explantos iniciales llegaron a injertarse 29 brotes (7%), se relevaron 11 y 5 de ellos fueron PCR positivos. Con la utilización del cañón génico, en uno de los ensayos, de 55 explantos iniciales, se obtuvieron 9 brotes que llegaron a injertarse, de los cuales 5 fueron PCR positivos.

6.1. TRANSFORMACIÓN UTILIZANDO UN PLÁSMIDO QUE CONTIENE EL GEN DE *BACILLUS THURINGIENSIS* VAR. *KURSTAKII*

Se realizaron ensayos con el objetivo de demostrar la aplicación del método de transformación desarrollado en esta tesis con un ejemplo de importancia agronómica: la obtención de plantas transgénicas para el gen de la δ -entomotoxina que confiere resistencia a lepidópteros.

Para el cumplimiento de este objetivo, se llevaron a cabo ensayos de transformación utilizando el protocolo de cocultivo en medio líquido con la cepa de At. C58 Btk

En todos los ensayos se llevaron controles paralelos sin transformar, de los que no hubo sobrevivientes para injertar.

En la siguiente tabla se muestran los valores correspondientes a 7 ensayos de transformación de cultivo en medio líquido con la cepa C58 Btk:

Tabla 6.1

Ensayo	Número inicial de explantos (a)	Brotos a Km 1° subcultivo ¹	Brotos a Km (2° subcultivo) ²	Brotos injertados (b)	Plantas PCR+ (c)	Índice de injertos I% ³ (b/a)	Eficiencia de transformación (%) (c/a)
L9	45	103	18	16	8	30	17.78
L10	19	169	27	6	0	9	0.00
L11	64	185	43	20	0	24	0.00
L12	74	226	23	4	2	3	2.70
L13	89	96	7	3	2	6	2.25
L14	40	187	14	2	1	5.4	2.70
L15	80	179	26	17	10	23.6	13.89
media						14.51	5.23

¹número de brotes que se subcultivan a Km (50 mg/l)

²número de brotes que se subcultivan por segunda vez a Km 50.

³Índice I%: número de brotes injertados sobre número inicial de explantos tratados.

Como se había observado en los ensayos anteriores, luego del cocultivo hay una multiplicación en la cantidad de brotes en el primer subcultivo que luego del proceso de selección se va reduciendo. En 6 de los siete ensayos se obtuvieron plantas PCR positivas con eficiencias diferentes. El índice de injertos promedio es de $14,5 \pm 12,6$ mientras que la eficiencia de transformación obtenida es de 5,23%, variando entre 0 y 13,89%. Las reacciones de PCR se encuentran en la [figura 6.3](#).

7. INJERTOS

En los primeros ensayos de transformación llevados a cabo, se había observado que las plantas rescatadas de los tubos con medio selectivo, debido a su reducido tamaño (no más de 2 cm de altura) llegaban a la etapa de floración con una reducida superficie foliar, lo que no les permitía realizar un buen cuajado (por la reducida producción de polen) ni llenado de las semillas ([figura 7.1](#)). Por esta razón, se optó por instrumentar un sistema de injertos de las yemas rescatadas *in vitro* del medio selectivo (Knittel et al., 1994) sobre pies de híbridos que puedan aportar los fotosintatos suficientes en el momento del llenado ([figura 7.2](#)).

Toda esta tarea se llevó a cabo en el invernáculo del Instituto de Biotecnología, el cual se acondicionó especialmente para el crecimiento de las plantas de girasol (temperatura de $20^{\circ}\text{C} \pm 5$ y fotoperíodo de 18 horas de luz). Los pies de injertos se hicieron crecer en macetas y se los utilizó cuando llegaron a tener 3 pares de hojas, ya que en ensayos previos, con más pares de hojas no fue posible obtener un buen

desarrollo de las flores y posteriormente de semillas, debido a que el pie entraba en etapa de senescencia cuando el injerto precisaba aún un desarrollo fisiológico activo.

En un ensayo preliminar, de 27 injertos practicados, 15 llegaron a desarrollar flores que dieron entre 1 y 48 semillas cada uno. En otro experimento, de 60 plantas injertadas, sobrevivieron 35 que dieron entre 3 y 20 semillas por capítulo.

Entre los inconvenientes encontrados durante la puesta a punto de los injertos, se encuentra:

-la rusticación: adaptación al nuevo ambiente (invernáculo) de las plantas provenientes de la cámara de cría (cultivadas *in vitro*). Muchas plantas no sobreviven a esta etapa debido a la desecación por el cambio de humedad relativa ambiental. Esto fue superándose mediante el seguimiento diario de los injertos cubiertos con bolsas de nylon y la apertura en etapas de las mismas para evitar también la saturación de humedad y la consiguiente infestación con hongos.

-plagas: se encontraron infestaciones de arañuela e insectos (mosca blanca) dentro del invernáculo, pero que fueron superándose con agroquímicos ajustando los productos y las dosis de los mismos.

-viabilidad y cantidad de polen: En muchos casos las semillas cosechadas eran vanas, a veces debido a la gran cantidad de capítulos por planta y otras a la incapacidad de autofecundarse. Para salvar este último inconveniente, se practicó la polinización artificial cruzándolas con polen proveniente de plantas Ha61 y Ha89 sin transformar sembradas en macetas y desarrolladas dentro del mismo invernáculo.

De este modo, pudieron obtenerse plantas aptas para desarrollar semillas. El número de capítulos desarrollada por cada planta injertada fue variable y generalmente se formó más de un capítulo por brote injertado (entre 2 y 15). También el número de semillas desarrolladas normalmente varió entre 2 y 100. Se pudieron cosechar aquenios de plantas que dieron reacción PCR positiva y de esta manera contar con descendencia para estudiar la herencia del transgén. ([figura 7.3](#))

8. ANÁLISIS DE LA HERENCIA DEL TRANSGÉN EN LAS PLANTAS DESCENDIENTES DE LAS T₀ TRANSGÉNICAS

Las plantas T₀ que resultaron PCR-positivas obtenidas en algunos de los ensayos de cocultivo en placa y líquido y dieron descendencia pudieron analizarse posteriormente. En la tabla 8.1 se muestran algunos de los ensayos a modo de ejemplo en los cuales se han obtenido plantas transgénicas. De estos ensayos se tomaron algunas T₀ a las que se les asignó un nombre de fantasía (#82, #41, #81 y B24) para analizar la herencia del transgén.

Tabla 8.1: ejemplos de ensayos en los que se analizó la descendencia de algunas de las plantas positivas. Nombres asignados a las mismas.

Ensayo	tratamiento	cepa	ni	brotes a Km 50		brotes no ojertados	PCR (gen nptII)			E. T. pcr+/ni (%)	nombre de la planta T ₀ analizada
				1° subcv	2° subcv		(+)	(-)	nd		
HM. EG 19	Control ¹	-	46	81	0	0					
HM. EG 19	Cocultivo ²	C58	409	455	209	29	5	6	18	1,22	
HM. EG 19	2D ³ + At	C58	45		28	9	2	1	6	4,44	
HM. EG 19	2D	-	55	81	23	9	5	1	3	9,09	
HM.EG 21	control	-	74	67	9	0					
HM.EG 21	2D+ At	EHA 105	46			2	1	1	0	2,17	
HM.EG 21	cocultivo	C58	328	252	42	5	3		2	0,91	#82 (cabezas a y b)
HM.EG 21	cocultivo	EHA 105	282	295	51	15	13	2	0	4,61	#41(cabezas a y b)
HM.EG 21	2D	-	22			3	2	1	0	9,09	#81
HM EG 25	control	-	50	45	7	0					
HM EG 25	Coc. líquido	EHA105	72	161	13	4	2		2	2,78	B24

Referencias: (1) sin transformar; (2) cocultivo con suspensión de At. en la placa de Petri; (3): bombardeado dos veces. E.T.: eficiencia de transformación

Ensayo	tratamiento	cepa	ni	brotes a Km 50		brotes injetados	PCR (gen <i>nptII</i>)			ef. Tr. (%) pcr+/ni	nombre T0 analizada
				1 subc.	2 subc.		(+)	(-)	nd		
H.E. EG 19	control		46	81	0	0					
H.E. EG 19	cocultivo	C58	409	455	209	29	5	6	18	1.22	
H.E. EG 19	2D+ At	C58	45		28	9	2	1	6	4.44	
H.E. EG 19	2D		55	81	23	9	5	1	3	9.09	
H.E. EG 21	control		74	67	9	0					
H.E. EG 21	2D+ At	EHA 105	46			2	1	1	0	2.17	
H.E. EG 21	cocultivo	C58	328	252	42	5	3		2	0.91	#82 (cabezas a y b)
H.E. EG 21	cocultivo	EHA 105	282	295	51	15	13	2	0	4.61	#41(cabezas a y b)
H.E. EG 21	2D		22			3	2	1	0	9.09	#81
HE EG 25	control		50	45	7	0					
HE EG 25	cocultivo	EHA105	72	161	13	4	2		2	2.78	B24

T0		T1		T2		Tasa de segregación	Southern (+)	Expresión de GUS
Plantas analizadas	capítulos	Número de Plantas analizadas	pcr+:pcr-	Número de plantas Analizadas	pcr+:pcr-			
#82 (cabezas a y b)	82a	2	2:0					
	82b	3	0:3					
#41(cabezas a y b)	41a	2	2:0					
	41b	2	2:0					
#81		2	0:2					
B24	B24.1	4	4:0	(B24,1,1) 13	7:6	1,16:1 ¹	5	5
				(B24,1,4) 22	18:4	4,5:1 ²	9	4
	B24.2	1	1:0					
	B24.3	3	3:0	11	9:2	4,5:1		
	B24.4	4	4:0					

Tabla 8.2: Análisis de la descendencia de las plantas identificadas en la tabla 8.1.

Herencia del gen *nptII* determinada por PCR

¹ tasa de segregación no significativamente diferente de 1:1 (test de CHI cuadrado 0,0256 < 3,84 para p= 0,05)

² tasa de segregación no significativamente diferente de 3:1.(chi: 0,75 < 3.84 para p= 0,05)

Se analizó la descendencia de algunos eventos (tabla 8.2): La planta #82 procede de ensayo con cepa C58 y la #41 con la cepa EHA105 y provienen del cocultivo en placa. La planta B24 fue transformada por cocultivo líquido con EHA105. Todas con GUS y NPTII.

Para la generación T₁, de la planta #82 se analizaron las descendencias de las dos cabezas (capítulos) que produjo (a y b). Del capítulo 82a se sembraron todas las semillas y sólo se establecieron dos plantas que fueron PCR positivas; del 82b, tres

plantas negativas. Para la planta #41 todas las plantas de la descendencia analizadas de las dos cabezas fueron positivas. Y para la #81, todas negativas.

De la planta B24 se analizaron las descendencias de las 4 cabezas y las plantas T₁ fueron todas positivas; en la generación T₂ el transgén segregó con una frecuencia 7:6 para la B24.1.1, 18:4 para B24.1.4 y 9:2 para la descendencia de la cabeza B24.3. Estos valores se ajustan a una segregación 1:1 en el primer caso y 3:1 en los otros dos.

En los Southern blot que se realizaron con DNAs de las plantas T₂ de B24 (B24.1.1 y B24.1.4) se observan una o dos copias del transgén para las descendientes de B24.1.4 ([figura 8.1](#)) y más de dos copias para las de B24.1.1 ([figura 8.2](#)).

Se pudo comprobar la expresión del gen *uidA* (codificante para GUS) en distintos órganos y tejidos de las plantas derivadas de B24: hojas, lígulas, pecíolos, tejidos de conducción ([figuras 8.4 y 8.5](#)).

Se analizaron algunas descendencias de plantas transgénicas transformadas con la cepa C58 p2x35SBtk derivadas de ensayos en cocultivo líquido (tabla 8.3).

Tabla 8.3: análisis de la descendencia de algunas plantas T₀ provenientes de ensayos en cocultivo líquido con la cepa C58 p2x35SBtk

Plantas T ₀	pcr Bt	T ₁		T ₂		T ₃		T ₄	
		Número de cosechadas	Número de plantas analizadas	Número de plantas analizadas	Porcentaje de plantas positivas (+) / negativas (-)	Nombre de plantas analizadas	pcr Bt	Número de plantas analizadas	pcr Bt
TB79	+	22	B79.5.1	4	4 : 0				
			B79.5.3	5	4 : 1	B79.5.3.4 B79.5.3.2	+	6 3	2 2
TB65	+	127	B65.1	7	1:6	B65.1.7	+	1	
			B65.2	3	1:2				
			B65.3	2	1:1	B65.3.3	+	1	
			B65.4	1	1:0				
TB3	+	149	B3.1	5	3:2				
			B3.2	1	0:1				
			B3.4	7	4:3				
			B3.6	7	3:4				

Para el estudio de la herencia del transgén se tomaron las descendencias de las plantas pcr positivas de cada generación. En la descendencia de la B79 se observa una relación similar a 3:1 en dos progenies derivadas de plantas pcr positivas; mientras que en la de B65 no se pudo establecer una relación determinada en la descendencia de 4 plantas T₂. Sin embargo en dos generaciones más (T₃ y T₄) se pudo amplificar uno de los transgenes. Con respecto a la B3, las proporciones encontradas en las progenies de 4 plantas positivas, son semejantes a 1:1 en la T₂,

por lo que se puede inferir que hay más de una copia del gen. En el análisis mediante Southern blot realizado para 5 plantas derivadas de ensayos con esta cepa que contiene el gen de Btk, dos plantas hibridaron con la sonda del gen de Btk: la planta B3 y la planta B65 (la B79 no se analizó) ([figura 8.6](#)). En este Southern sólo se observó la presencia del transgén pero no se cortó con enzimas para verificar el número de copias.

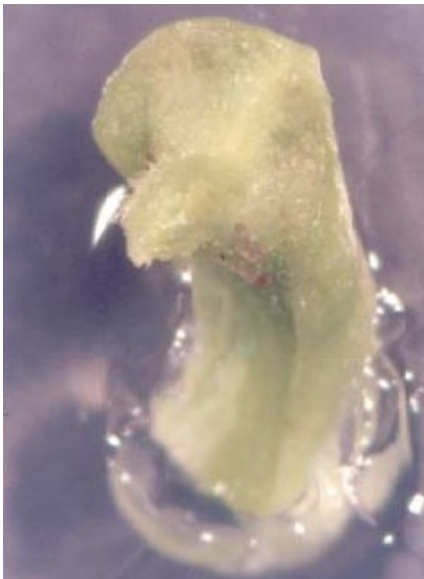
Figura 1.1



A



B



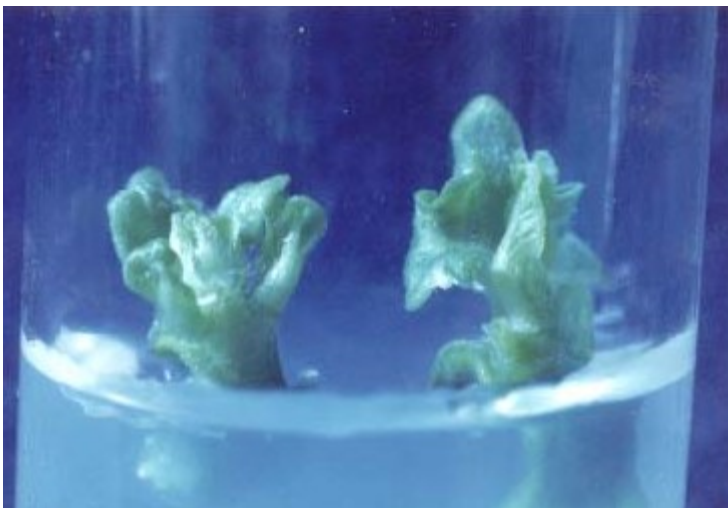
C



E



F



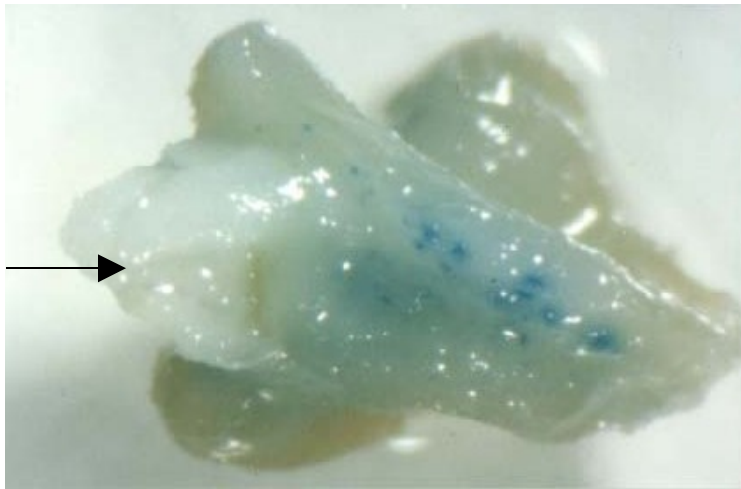
G



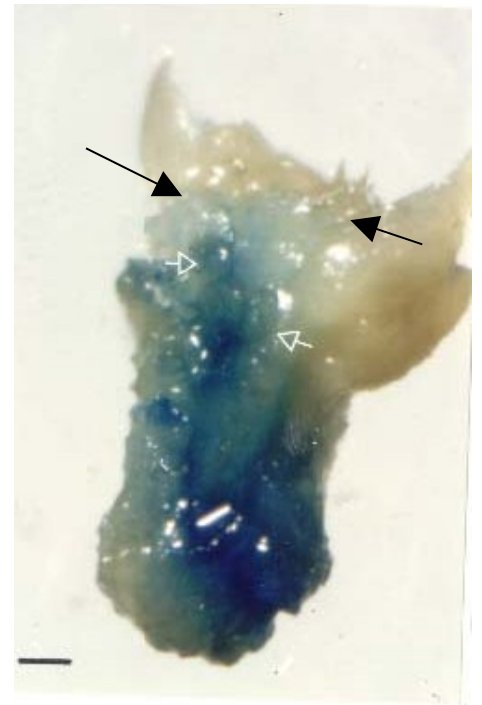
H

Figura 1.1:

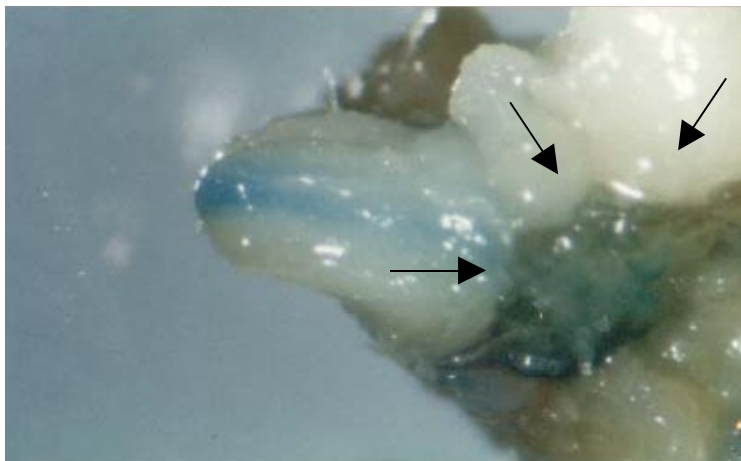
Secuencia en el cultivo de tejidos de explantos provenientes de meristemas divididos (Hemimeristemas, HM). A: detalle de la zona meristémica cultivada luego del corte de los cotiledones y la división del ápice. B: explanto cultivándose en el medio de inducción de brote. C y D: brotes desarrollándose a partir de meristemas preexistentes. F: múltiples brotes desarrollados a partir de meristemas laterales y formados de novo en el cultivo in vitro con BAP. G: disposición de los explantos HM en el medio de cultivo dentro de los tubos. H: brotes con hojas diferenciadas.



A



B



C

Figura 2.1.1

Reacción histoquímica de β -glucuronidasa efectuada sobre explantos tratados con At. Se muestra los diversos tipos de eventos en forma de puntos o áreas azules índigo. Las flechas indican las zonas meristemáticas.

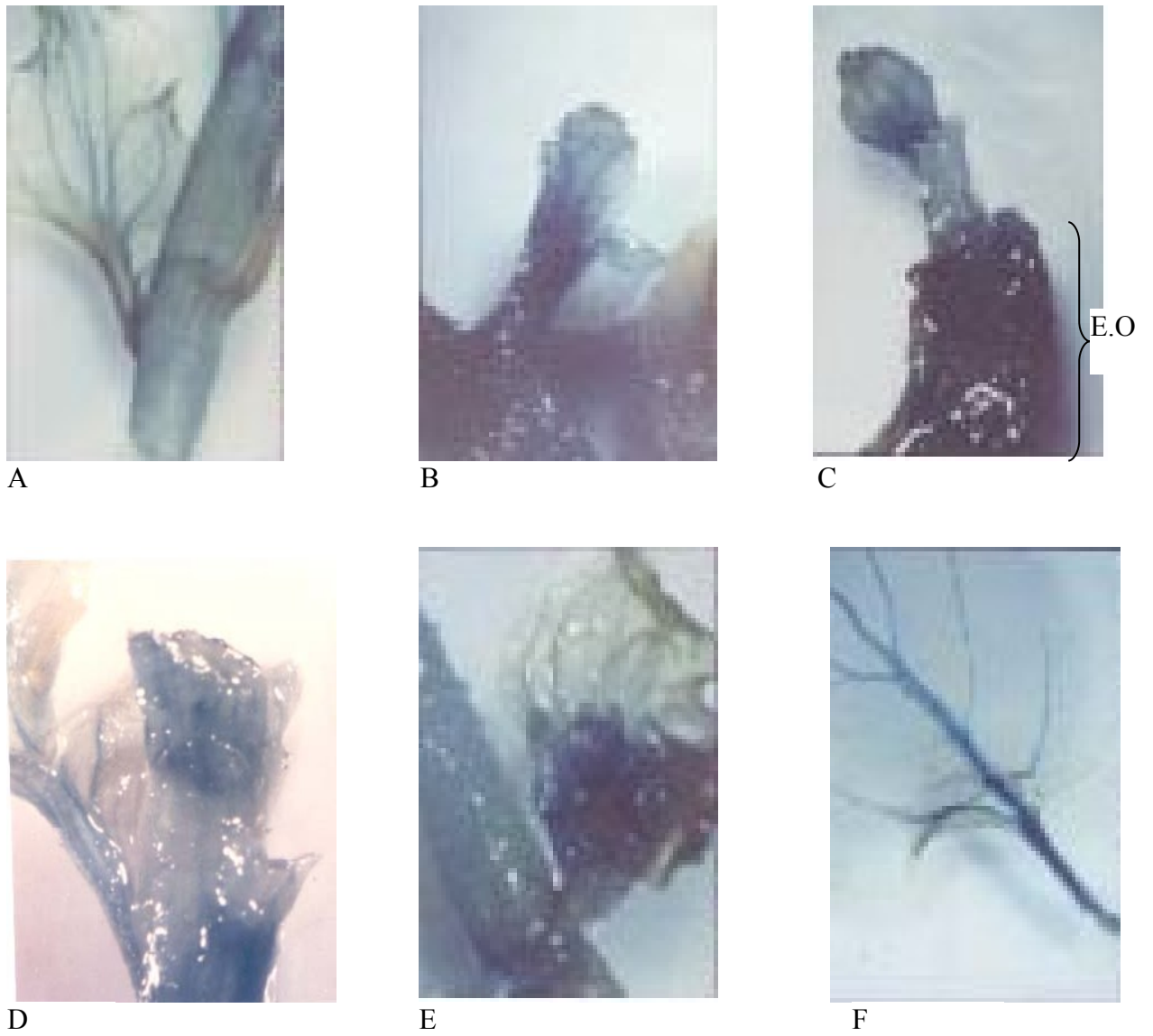


Figura 2. 1. 2.

Reacción histoquímica de β -glucuronidasa efectuada sobre brotes (A, B, C, D, E) y hojas (F) obtenidos a partir de explantos transformados con el gen GUS.

En la figura C se indica cuál fue el explanto original tratado a partir del cual se desarrolló el brote transformado.

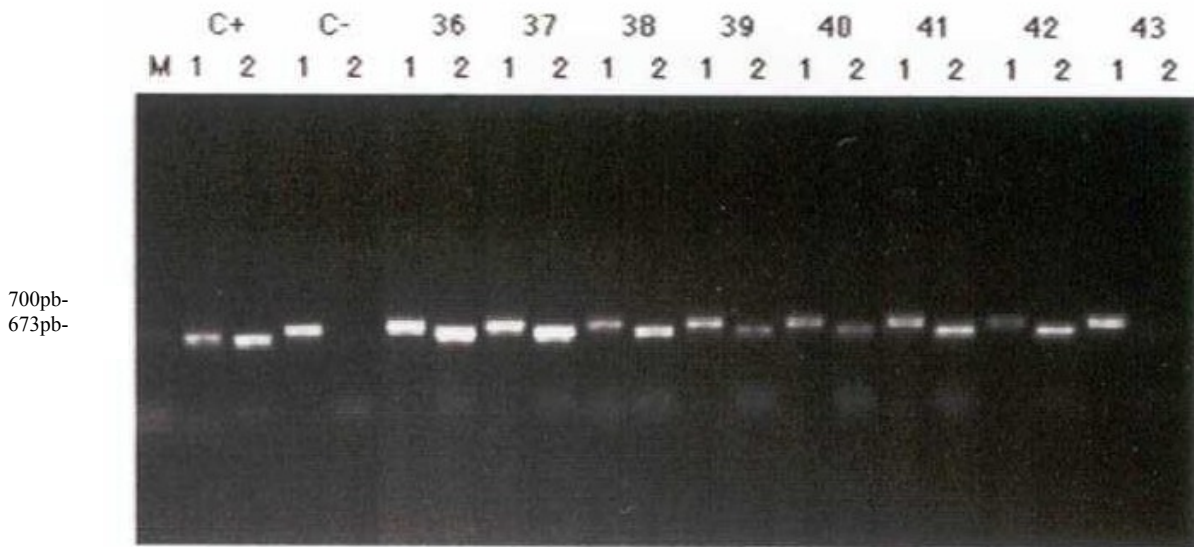


Figura 6.1

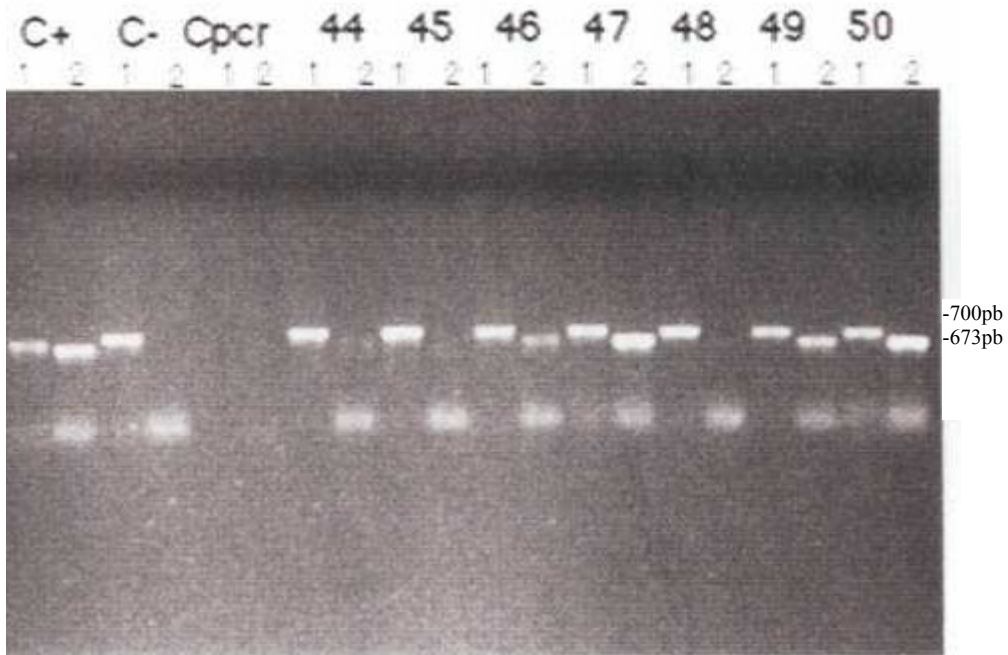


Figura 6.2

Figuras 6.1 y 6.2

Se observan los productos de amplificación corridos en geles de agarosa correspondientes a 15 de las plantas chequeadas, 11 de las cuales muestran reacción positiva para ITS (números 1) y nptII (números 2, neomicina fosfotransferasa), se observan también los controles positivos (amplificación de ADN de plantas transgénicas) y negativos (ADN de plantas no tratadas) para ambos.

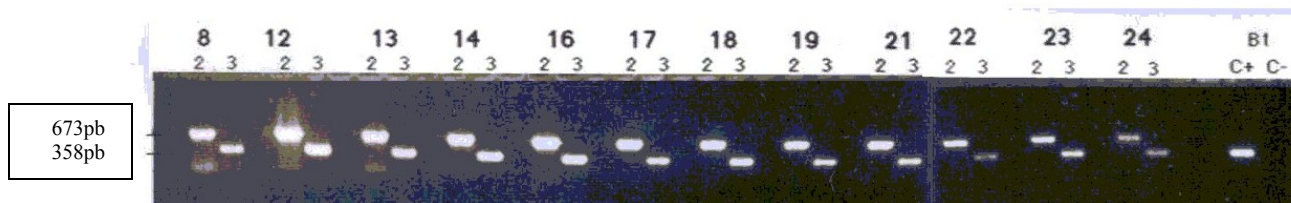


Figura 6.3.

PCRs de las plantas transformadas con la cepa C58Btk.

Calles (2) : amplificación con primers sobre el gen NPTII

Calles (3): amplificación con primers sobre el gen Btk.



Figura 7.1

Plantas T0 provenientes de brotes enraizados *in vitro* mostrando floración precoz en macetas

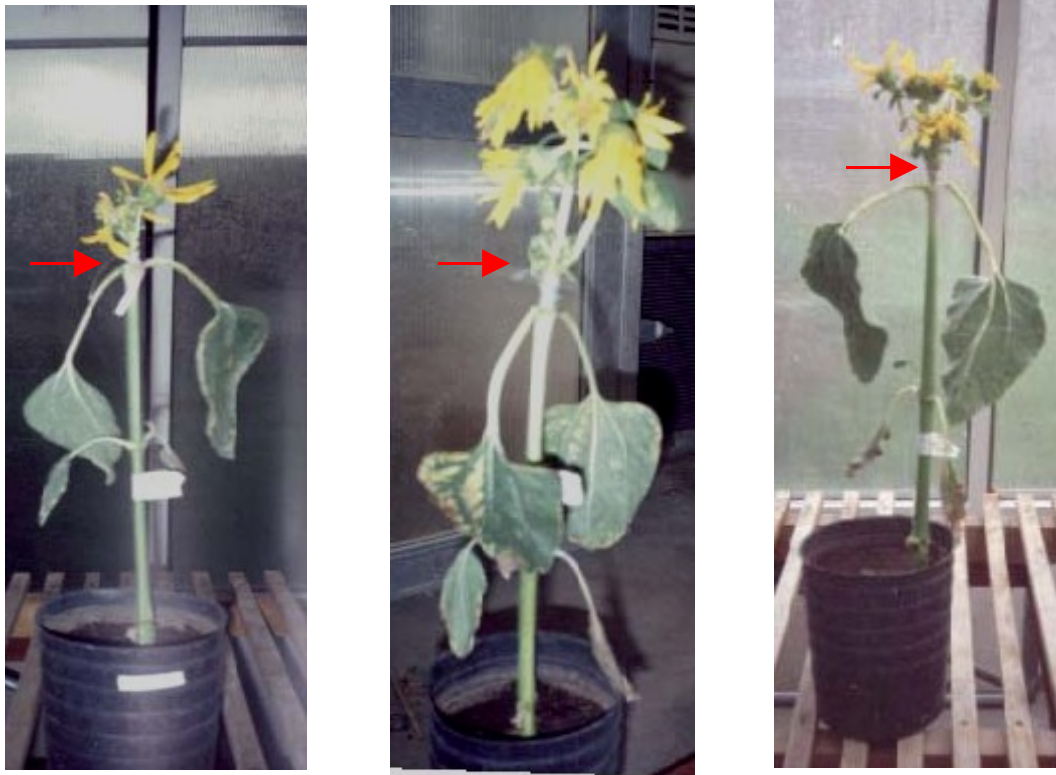


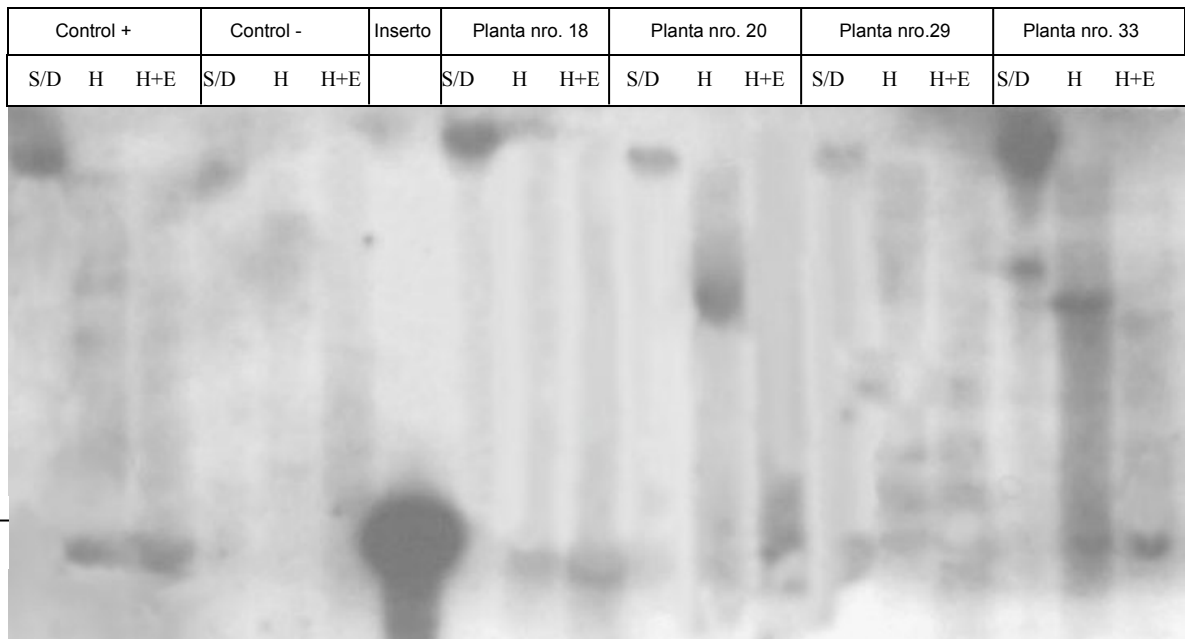
Figura 7.2

Injertos de brotes provenientes de ensayos de transformación, desarrollados *in vitro* realizados en invernáculo sobre pies de girasol comerciales con 2 pares de hojas desarrolladas. Las flechas muestran el sitio de unión del injerto. Se observa la múltiple cantidad de capítulos desarrollados en cada planta.



Figura 7.3

Floración en plantas T1, T2 y T3, desarrolladas en macetas en invernáculo.



2.73 pb —

Figura 8.1: Southern blot de las plantas 18, 20, 29 y 33 (son 4 descendientes de B24.1.4), transformadas por cocultivo en placa con la cepa EHA 105.

Control(+): ADN de planta de papa transformada con pBI121.2

Control (-): ADN de planta HA89 sin transformar.

Inserto: fragmento de 2.73 Kb extraído del plásmido cortado con HindIII y BamHI.

Hibridación con sonda cortada con HindIII y BamHI.

S/D: ADN sin digerir;

H: cortado con HindIII;

H+B: cortado con HindIII y BamHI.

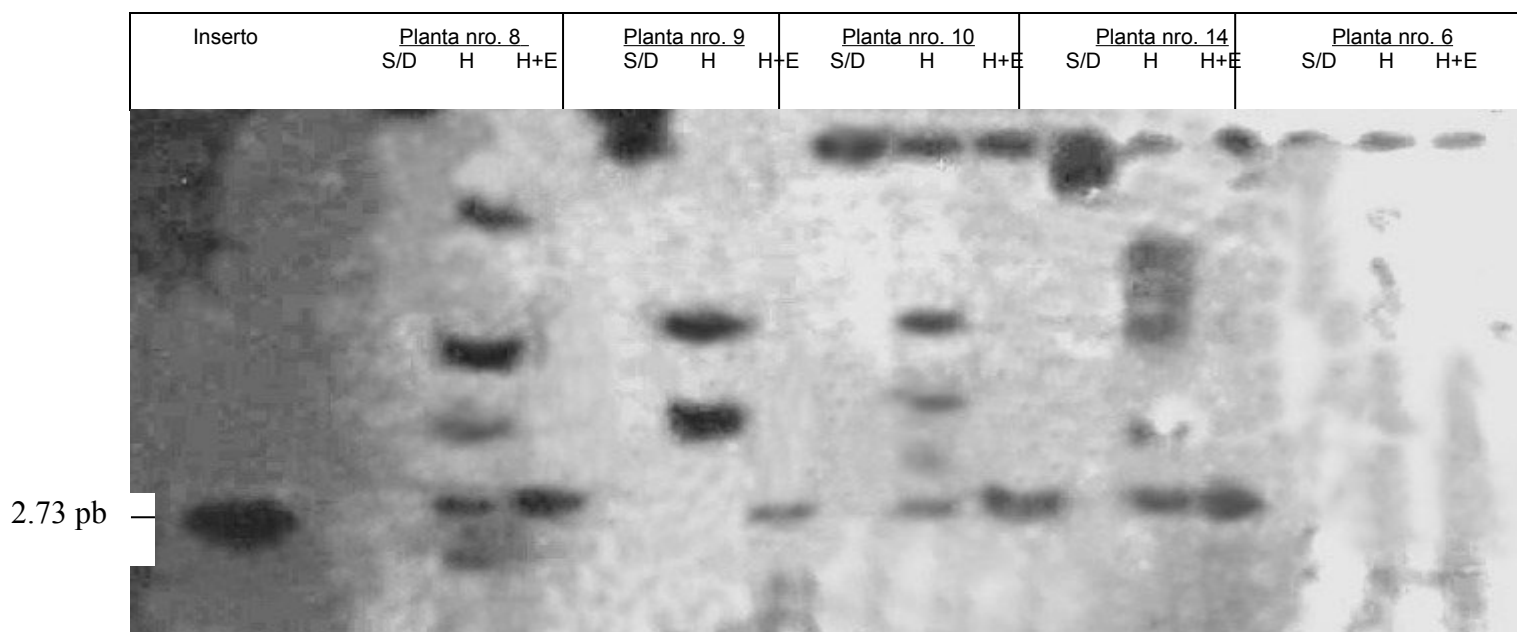


Figura 8.2

Southern blot de plantas descendientes de B24.1.1. Las plantas 8, 9, 10 y 14 son pcr positivas para el gen gus y nptII. La planta 6 es pcr negativa para ambos genes.

Inserto: fragmento de 2.73 Kb extraído del plásmido cortado con HindIII y BamHI.

Hibridación con sonda cortada con HindIII y BamHI.

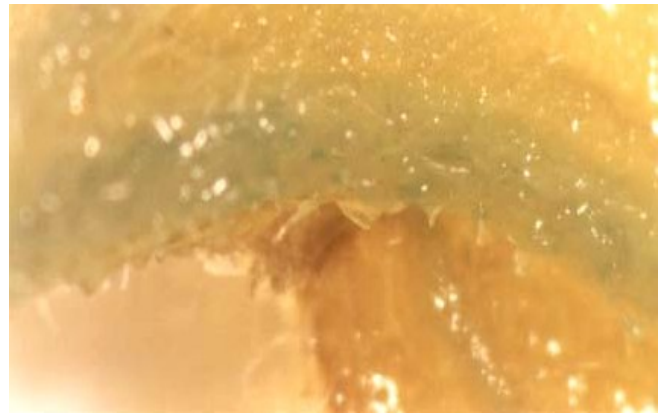
S/D: ADN sin digerir;

H:cortado con HindIII;

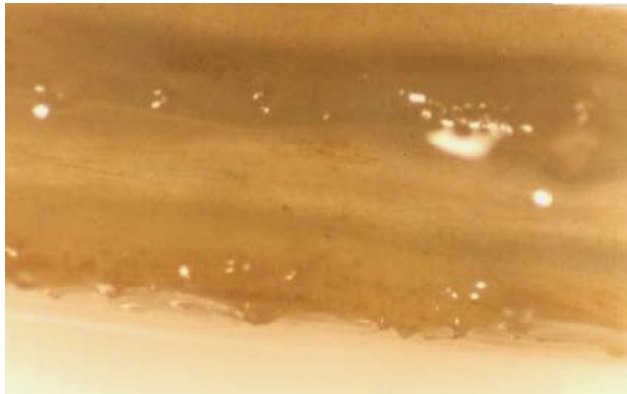
H+B: cortado con HindIII y BamHI



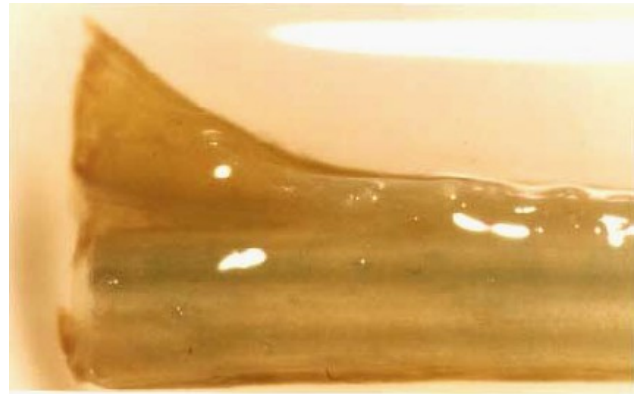
A



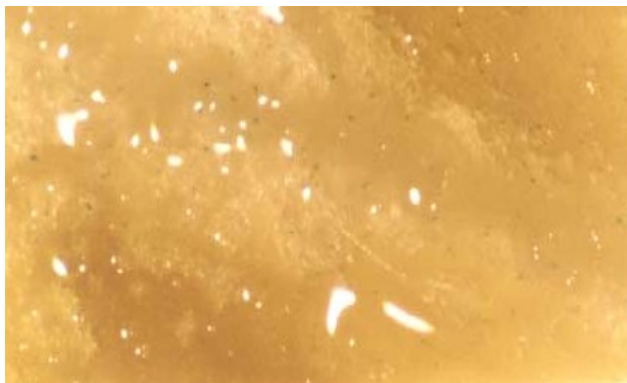
B



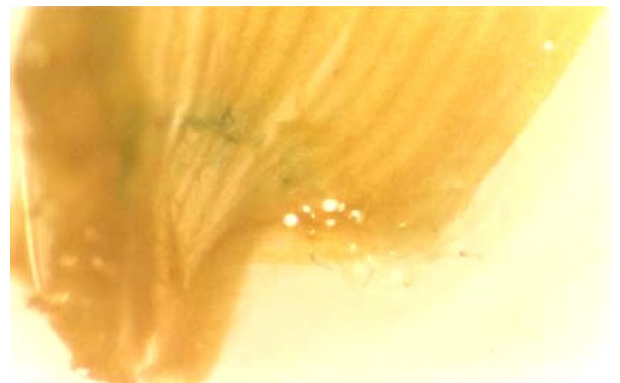
C



D



E



F

Figuras 8.4

Reacción histoquímica de β -glucuronidasa realizada en diversos órganos de plantas T2 transformadas con el plásmido conteniendo el gen GUS.

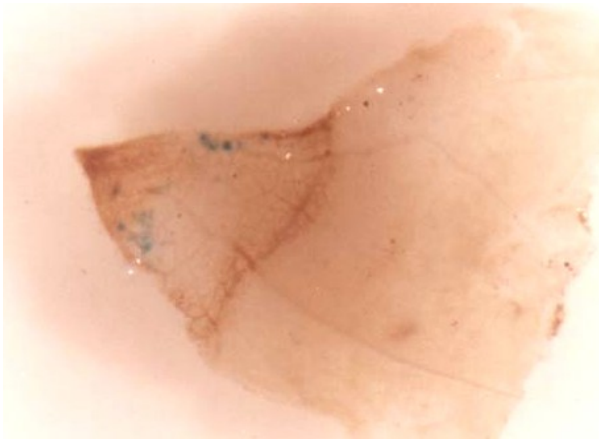
A: cara adaxial de hoja (tinción en pelos).

B: zona de tejido de conducción en nervadura principal de hoja.

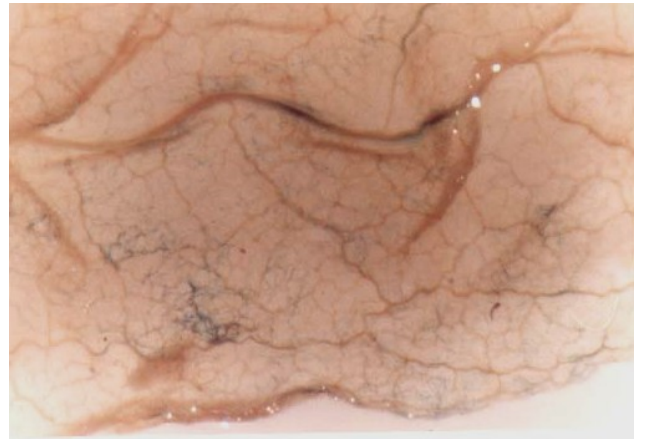
C-D: pecíolos de hojas con tinción en tejido de conducción.

E: cara abaxial de hoja con puntos azules.

F: flor ligulada con zonas de tinción cerca de la base.



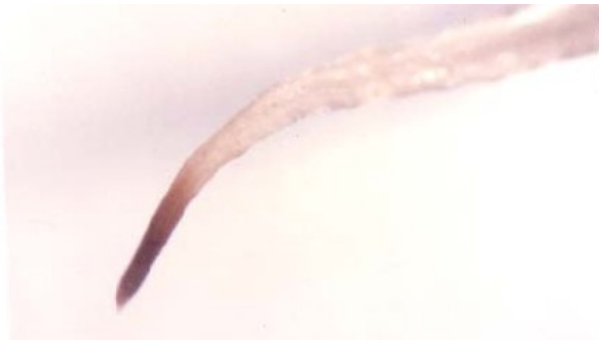
A



B



C



D

Figura 8.5

Expresión del gen GUS en hojas (A y B) y raíces (C) de plantas T2.

(D): raíz sin expresión de GUS de plantas PCR negativa para ese transgén.

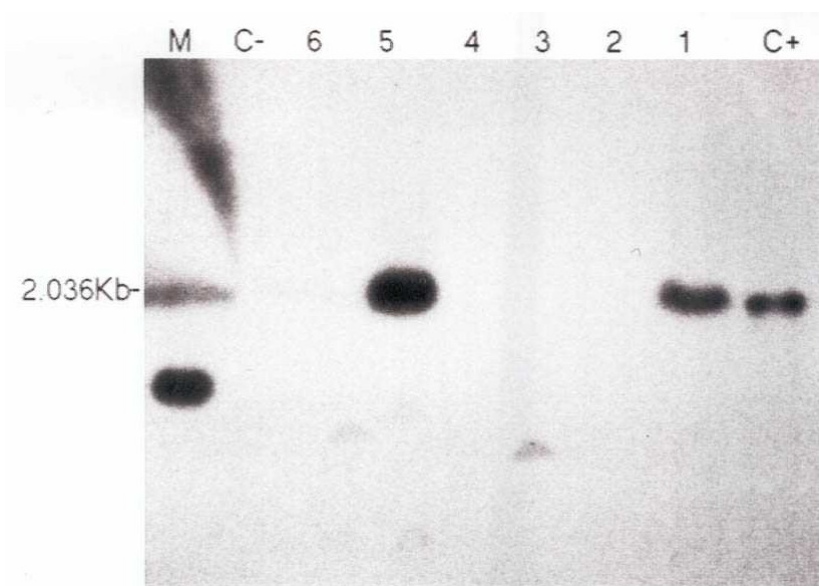


Figura 8.3

Southern blot de plantas transformadas con el plásmido 2X35S-K. El ADN de las plantas de cortó con BamH1. Como sonda se utilizó el producto de la restricción del plásmido p2X35S-K mediante la enzima BamHI que libera la región codificante del gen mínimo de *Bacillus thuringiensis*.

C(-): ADN de una planta sin transformar.

C(+): 25 ng de ADN del vector. 1-5: ADN de plantas incógnitas. En la fotografía se observa la banda esperada de 2Kb, correspondiente al gen Btk mínimo en el control positivo y en dos de las seis plantas probadas: la 1 (B3) y la 5 (B65).

(M) es el marcador utilizado.

DISCUSIÓN

a. Cotiledones

Efecto de los agentes selectivos sobre el desarrollo de callos a partir de cotiledones

No se observó un efecto de la kanamicina sobre el desarrollo y el aspecto de los callos derivados de cotiledones en ninguna de las concentraciones utilizadas. Este resultado concuerda con el reportado por Escandón y Hahne (1991); se observa una respuesta que muestra la sensibilidad natural de los explantos, la cual se incrementaría con el aumento del tiempo de precultivo.

Paromomicina y Basta provocaron efectos marcados en el desarrollo de los callos a partir de estos explantos. La Pm fue la que provocó un efecto más marcado, impidiendo directamente la formación de callo a partir de los cotiledones o provocando la muerte celular de los callos ya formados desde concentraciones de 50 mg/l. El Basta produce síntomas similares, pero actuando sobre tejidos aún no desdiferenciados (0 y 5 días de precultivo). Laparra (1995) encuentra que la concentración de Pm más adecuada para seleccionar a partir de cotiledones es entre 50 y 100 mg/l. En coincidencia con Escandón y Hahne (1991), se observó que la Pm es una buena alternativa como agente selectivo. Es posible que las diferencias de toxicidad entre Km y Pm, se deban a la estructura química de cada uno de estos agentes fitotóxicos, que le permitiría a la Pm una mayor facilidad de ingreso a las células. Las diferencias de concentración entre los aminoglucósidos y la fosfotricina es debida a la distinta toxicidad. La fosfotricina actúa bloqueando la glutamina sintetasa provocando la muerte celular por acumulación de amoníaco (De Block et al, 1987). Los aminoglucósidos impiden la función ribosomal de las organelas, siendo menos drástico su modo de acción en relación a la fosfotricina quizás por la especificidad de ésta última.

Considerando que la formación de centros meristemáticos se observa a los 5-7 días de iniciado el cultivo de los explantos provenientes de cotiledones (Ceriani, 1992), las condiciones usadas (25 mg/l de Pm), serían apropiadas para discriminar entre el material transformado y no transformado. Las células no transformadas que son afectadas por el agente selectivo secretan metabolitos que pueden provocar efectos fitotóxicos sobre las células transgénicas que sobreviven en el mismo callo. Con

esta concentración se evitaría el efecto fitotóxico sobre las células transformadas. Si bien se corre el riesgo de incrementar la probabilidad de falsos positivos es una solución de compromiso que permite asegurarse la viabilidad del material transformado. De acuerdo a esto, las concentraciones adecuadas para impedir el desarrollo de callo a partir de células no transformadas serían de 25 mg/l para Pm y de 2,5 mg/l para fosfinotricina.

Efecto del ácido giberélico sobre el desarrollo de callos y la regeneración

Es bien conocido el potente efecto del GA₃ sobre el girasol bajo condiciones de cultivo *in vitro* de tejidos (Baker, 1999, Escandón y Hahne, 1991; Paterson y Everett, 1984; Greco et al, 1984). Este regulador de crecimiento tiene la propiedad de amplificar el efecto de otros reguladores y sustancias modificantes de la fisiología de los tejidos (ej. antibióticos y/o herbicidas). En efecto, Paterson y Everett (1984) y Greco et al (1984) reportaron un mejoramiento significativo en la capacidad morfogénica de los cultivos al suplementar el medio de cultivo con este regulador. Escandón y Hahne (1991) señalaron un importante incremento de la sensibilidad de los explantos frente a la Pm y al Basta, agregando GA₃ al medio; se lograba evidenciar aún más la condición de transformado de la de control. Estas características tornan muy atractiva la utilización de esta hormona en los medios de selección y regeneración.

El agregado de 0,1 mg/l de GA₃ a cualquier combinación hormonal, aumenta el porcentaje de regeneración y fue especialmente efectivo para la combinación de 0,75/0,1 mg/l de ANA/BAP. El número de brotes por explanto se ve incrementado con el agregado 0,1 mg/l de GA₃ en explantos de 5 y 7 días de precultivo. En todas las concentraciones de GA₃ la suplementación a los 12 días del cultivo produce un aumento considerable del brotado en los callos ya existentes.

Estos resultados ponen en evidencia la necesidad de contar con un callo ya desarrollado (por lo menos con 7 días de precultivo) para suplementar con GA₃, en el cual los centros meristemáticos ya se han formado. De esta manera es posible obtener un mayor número de brotes y que los mismos sean favorecidos por la presencia de GA₃ en el medio para su posterior elongación caulinar.

Respuesta de los cotiledones a la transformación con *Agrobacterium*

Sólo con la estrategia de regeneración indirecta (la combinación de 0,75/0,1 mg/l ANA/BAP) se obtiene alguna respuesta a la transformación que alcanza al 70% de los explantos a los 15 días de precultivo. Se evidencia una mayor eficiencia en la infección de tejido desdiferenciado (callos) que en tejido organizado. Esta combinación de reguladores de crecimiento, que induce una activa proliferación celular, estaría favoreciendo la multiplicación del material transformado. En este sentido, es más eficiente la infección de callos que de tejido organizado. La división mitótica favorecería la incorporación de ADN al genoma en duplicación, y posteriormente un mayor número de células expresarían la actividad del transgén. El cultivo del tejido en un medio con una relación hormonal para inducir la regeneración directa, no favorece una proliferación celular masiva, sino ordenada en función de generar meristemas, por lo que las posibilidades de un evento de transformación disminuirían.

Estos experimentos muestran la importancia que poseen la composición del medio de cultivo y el estado fisiológico del material a transformar. Esto significa que al estado de callo el material es más sensible a la agroinfección que el tejido organizado del cotiledón maduro. De acuerdo a lo reportado por Ceriani et al (1992), la formación de centros meristemáticos (estructuras del callo responsables de la organogénesis) ocurre entre los días 5 y 7 de cultivo. Esta afirmación junto a los resultados mostrados en estos experimentos, muestran que la alternativa de la regeneración indirecta en cotiledones es la aconsejable para una estrategia de transformación a partir de ese explanto, es decir, el uso de callo como material blanco para *Agrobacterium* en el periodo de formación de los centros meristemáticos.

Otros factores estudiados que podrían intervenir en la eficiencia de transformación

De acuerdo con algunos autores, la interacción de las bacterias con las células vegetales es uno de los puntos determinantes del proceso de agroinfección (Sheng and Citovsky, 1996). Se ha estudiado el efecto de la macerozima® y la combinación de esta enzima con el ácido giberélico sobre la eficiencia de transformación. Los resultados mostraron que sólo se produce un incremento en los puntos de expresión transiente sobre los cotiledones de 3 días de germinación con 0,1% de macerozima® previo a la agroinfección. Solamente se obtiene alguna mejora sobre

la regeneración respecto al control cuando a la macerozima® se la combina con el giberélico. Alibert y col (1999) logran aumentar la eficiencia de transformación en explantos meristemáticos al tratarlos con macerozima® desde 0,1%, demostrando que este tratamiento incrementa el número de bacterias que interactúan con el explanto. Weber (2003), en cambio, encuentra un efecto negativo en la regeneración de brotes a partir de explantos tratados con macerozima®. En este trabajo no se evidenció un mejoramiento del sistema de transformación de explantos provenientes de cotiledones mediante la acción de esta enzima. De acuerdo con Laparra (1995) los eventos de transformación que obtuvieron se limitaron exclusivamente a una pequeña área del cotiledón, que curiosamente correspondía a la zona en la cual la regeneración estaba limitada. En cualquiera de las modificaciones ensayadas en las condiciones de crecimiento de la agrobacterias no se observaron efectos sobre la eficiencia de transformación. En contraste, las condiciones de cocultivo fueron importantes tanto para el crecimiento de la bacteria como para la eficiencia de transformación. Sin embargo bajo condiciones optimizadas, la inducción de brotes resultó completamente inviable y sólo se obtuvieron callos no morfogénicos.

La transformación ocurrió en una región tisular apropiada, pero no en el tipo celular específico que resulta totipotente (competente) para la regeneración. En contraste, algunas células aisladas que se encuentran en la parte superior de la epidermis, expresan el transgén. Éstas contienen el tipo celular correcto pero no es una región favorable para la regeneración, ya que nunca se observaron brotes originándose en este sector (Laparra, 1996).

Los experimentos de transformación de cotiledones de girasol con *At* ilustran la complejidad de la transformación en un sistema donde la regeneración es directa, limitada a un cierto tipo celular y que requiere condiciones especiales para mantener la integridad del explanto. En estos casos, el tipo celular que regenera no es aquel preferentemente transformado por *At*. En un sistema de regeneración indirecta donde el cultivo puede ser enriquecido por las células transformadas mientras mantiene su potencial morfogénico y puede ser inducido a regenerar en un momento posterior, no sufriría los mismos problemas.

Por estas razones se plantearon otros tipos de explantos como material de partida (hipocótilos, hojas) para realizar experimentos de transformación sobre tejidos aptos para formar callos y dar lugar posteriormente a regeneración indirecta.

b. Hipocótiles

De los primeros experimentos con este tipo de explantos se desprende que existe un efecto genotípico en la respuesta de los explantos derivados de hipocótiles para la formación de callos embriogénicos. En el mismo medio de cultivo se estudiaron las respuestas de nueve genotipos además del Ha300b. Las mayores diferencias consistieron en la capacidad de abarcar todo el explanto para desarrollar el callo y la friabilidad del mismo. Se observó que los callos más friables son los aptos para la formación de embriones somáticos. Paterson y Everett (1985) señalaron que el potencial de regeneración tendría un control multigénico y de dominancia incompleta, y que se puede estudiar la capacidad de regeneración de los genotipos con el sistema de hipocótiles. El genotipo Ha300b presentó esta condición y produjo embriones somáticos de los cuales se pudieron obtener plantas.

La transformación de las zonas potencialmente embriogénicas no fue posible. Las zonas abarcadas por eventos de transformación, observadas mediante el ensayo histoquímico, fueron las centrales correspondientes a los haces vasculares y médula y no las periféricas.

Las variaciones en las condiciones del cultivo de hipocótiles permitieron observar que los callos de mejor aspecto se desarrollaron en el medio con iguales concentraciones de ANA/BAP (1/1). Esta proporción hormonal era la propuesta por Paterson y Everett (1985) con la cual obtuvieron callos de iguales características que las de este trabajo y también embriogénesis somática. Durante el desarrollo del callo se observó que el tejido central mantiene una tasa de desarrollo diferente al callo proveniente de la región periférica. Una posible explicación de la respuesta observada se puede encontrar en la dirección de las mitosis en una y otra región del explanto. El crecimiento de un callo se produce por la proliferación celular en las capas exteriores del mismo, en este caso, en la región cortical predominaron las mitosis en sentido sinclinal (lateralmente) y en la medular la proporción de divisiones sinclinales fue pareja con la de divisiones anticlinales (en sentido longitudinal) lo que contribuyó a la formación de una estructura callosa isodiamétrica. Este sentido diferencial de las divisiones y la proliferación de la masa callosa provocaron un debilitamiento de la unión entre las regiones mencionadas lo que habría ocasionado la separación de ambas. Las diferencias entre una y otra región, fue,

como se mencionó anteriormente, en el sector de la periferia donde se produjo la formación de callo friable y de intenso color verde, similares a los descriptos por Paterson y Everett (1985) y Escandón y col (1990). Según estos autores, el agregado de BAP al medio en relación al ANA, es indispensable para lograr la regeneración y el GA₃ hace aumentar la capacidad de regeneración. En estas estructuras luego de 7 días de cultivo a la luz, comenzó el proceso de morfogénesis, que derivó en el desarrollo posterior de plántulas.

La paromomicina como agente selectivo afectó el desarrollo de embriones somáticos en los explantos tratados con At Everett y col (1987), observaron un efecto semejante al aplicar kanamicina como agente selectivo al medio de crecimiento de los hipocótilos, y consideraron que era conveniente hacer crecer los callos una vez seleccionados en ausencia de kanamicina para lograr regeneración posteriormente, ya que ambos procesos (selección y regeneración) no pueden realizarse simultáneamente en este sistema, posiblemente debido a la diferente sensibilidad al antibiótico de los tejidos indiferenciados en relación a los diferenciados (embriones somáticos).

Mediante la agroinfección se individualizaron áreas con mayor tendencia a ser transformadas. En los genotipos estudiados la mayoría de las áreas transformadas se ubicó en la zona central del explanto, correspondiente al tejido medular y de conducción del hipocótilo. Los tejidos de conducción representarían un polo de atracción para At; este fenómeno podría deberse a que por su estructura presentarían una superficie de contacto que facilitaría la interacción con las bacterias, o porque liberan señales (como por ejemplo compuestos fenólicos, ver sección fenoles de este trabajo) reconocidas por las agrobacterias, que inducen a las mismas a la infección. Es conocido, además, que At puede desplazarse en el tejido de conducción. Las áreas azules reveladas mediante el ensayo histoquímico se encontraron en la cara superior del explanto en ambos tipos de inoculaciones (P o IN) y las eficiencias de transformación en ambos casos fue similar, por lo que se continuó infectando agregando la suspensión directamente a la placa de Petri conteniendo los discos. La diferente respuesta de los tejidos centrales en relación a los periféricos, obedecería a una influencia de los reguladores de crecimiento en la división celular. Escandón y Hahne (1991) reportan que bajo condiciones de desdiferenciación (respuesta dependiente de auxina) se obtiene una mayor

eficiencia de transformación en relación a combinaciones hormonales no tan fuertemente inductoras de callo (como por ejemplo, de mayor relación ANA:BAP). La mayor cantidad de eventos de transformación se localizaron en la zona central del explanto, coincidiendo con la ubicación del tejido de conducción y no en la zona de mayor poder de generación de embriones, con lo cual se limita enormemente la probabilidad de obtener embriogénesis somática a partir de tejido transformado. Este fenómeno no se contrarrestó al cambiar la zona de contacto del explanto con el At, lo que lleva a la conclusión que no es la posición diferente, ni el corte del explanto lo que hace aumentar la interacción célula-bacteria, sino que ésta depende en gran medida del tipo celular que forma el tejido vegetal con el que la bacteria podría tener mejor interacción y de los metabolitos excretados por los distintos tipos de células que componen los tejidos, que inducirían a la bacteria a la infección.

La eficiencia de regeneración por embriogénesis somática en el material sin infectar fue mayor en los explantos SL, pero en el caso de los infectados, la mayor eficiencia la obtuvieron los discos. Esta eficiencia de regeneración es baja en comparación a la obtenida con los cotiledones, y teniendo en cuenta que para obtener una planta regenerada y transformada por este sistema, debería coincidir la zona transformada en el callo proveniente del hipocótilo con la zona de embriogénesis somática, la probabilidad disminuiría notablemente, tornando muy ineficiente este sistema de regeneración-transformación.

En este sistema de regeneración – transformación se evidenciaron diversos inconvenientes que tienden a disminuir las probabilidades de obtener una planta transgénica. Estos son: la concentración de la transformación en la zona central del explanto y de la formación de embriones en el sector periférico, la disminución de la capacidad de regeneración observada en el material agroinfectado y los inconvenientes respecto a la selectividad en la transformación. Everett y col. (1987) reportaron la primer planta transgénica de girasol a partir de callos embriogénicos en hipocótilos con un protocolo dependiente del genotipo y de muy baja eficiencia. Algunos investigadores suponen que parte de estos inconvenientes encontrados podrían superarse buscando estrategias alternativas de transformación como la electroporación de tejidos o el uso del método biolístico o combinaciones de metodologías. Müller y col. (2001) han logrado una eficiencia de 0,01% utilizando un

sistema similar al propuesto aquí pero utilizando la proteína verde fluorescente (gfp) para detectar los brotes transgénicos en el medio de cultivo, limitando ese protocolo al estudio de la transformación en sí pero sin aplicabilidad para transformar con genes de interés (cabe aclarar que este trabajo de tesis se realizó con anterioridad a esa publicación). La alternativa propuesta en este punto es el uso de otro sistema que involucre otro explanto inicial, como hojas o meristemas apicales.

c. Hojas

Las hojas mostraron tener comportamientos *in vitro* distintos ante diferentes reguladores de crecimiento, respondiendo de manera positiva, es decir, regenerando plántulas en aquellas condiciones en que la relación entre auxinas y citoquininas prevaleció como más favorable (0.5/0.5 ANA/BAP). Se ha observado que aún sin hormonas en el medio se puede obtener embriogénesis somática en tejidos de hoja en el híbrido *H. annuus* x *H. tuberosus*, por lo que las células somáticas que forman parte de los tejidos foliares no han perdido aún su potencial morfogénico, típico de las células cigóticas (Fambrini, 1996). En los ensayos analizados, se encontraron diferentes respuestas según la combinación de hormonas utilizada. La mejor eficiencia de regeneración se obtuvo en el medio con iguales concentraciones de ANA y BAP. La regeneración por embriogénesis somática, a partir de explantos de hojas, mostró ser una alternativa interesante para el desarrollo de una rutina de regeneración. Este equilibrio se desplaza hacia la formación de callo abundante o de hiperplasia del tejido conforme varía la relación entre los reguladores en el medio: a mayor relación ANA:BAP el efecto es de mayor formación de callos, y a menor relación ANA:BAP, la respuesta tiende al aumento de volumen celular, con la consiguiente deformación de la hoja y enrollamiento. En la relación equilibrada de ANA:BAP se encontraron ambos efectos combinados, y la mayor eficiencia regenerativa. Pugliesi et al (1993) obtiene la mayor eficiencia de regeneración a partir de hojas de genotipo HA89 en la combinación 0,5:0,5 y 0,5:1 mg/l de ANA:BAP. Punia y Bohorova (1992) a su vez, en especies salvajes de *Helianthus*, obtienen mayor desarrollo de callo regenerativo utilizando proporcionalmente mayor cantidad de citoquinina que de auxina. Konov y col. (1998) observan la formación de estructuras nodulares (yemas) y brotes en la cara adaxial de las hojas luego de inducirlas sólo con citoquininas. Posiblemente se deba encontrar un equilibrio entre auxinas y citoquininas en los tejidos que se desarrollan

a partir de los callos de hojas para lograr que los brotes regenerados desarrollen raíces posteriormente. Los brotes desarrollados en medio con citoquinina (medio E con 0,5 mg/l de BAP) no desarrollaron raíces. Greco (1984) obtiene diferente respuesta (regeneración directa a indirecta) ante las concentraciones crecientes de BAP en explantos de hoja de girasol y postula la necesidad de usar auxinas en cantidades proporcionalmente crecientes para lograr un equilibrio hormonal para el desarrollo total de la planta.

El uso de hojas como explantos aporta variantes interesantes en relación a las respuestas ante los estímulos de los diversos reguladores de crecimiento. El contacto de estos explantos con el medio de cultivo, es más directo y no se introduce el efecto filtro de otros tejidos o estructuras (como callos) y, por consiguiente las respuestas de las células, visualizadas como cambios morfológicos, se observan rápidamente. Este efecto puede ser de gran utilidad a la hora de regenerar e identificar el crecimiento diferencial de sectores provenientes de células transformadas, ofreciéndoles las condiciones que favorezcan su desarrollo en un medio selectivo y de esta manera poder evitar los escapes, o la mortalidad de células transformadas por la toxicidad provocada por los metabolitos provenientes de las células vecinas afectadas.

En otras especies, como la papa, se ha podido transformar tejido de hoja con *Agrobacterium* (del Vas, 1993, De Block, 1988). Se han obtenido plantas transgénicas a partir de explantos de hoja en híbrido interespecífico *Helianthus annuus* × *Helianthus tuberosus* (Pugliesi, 1992). En *Helianthus annuus* no se han reportado resultados de transformación utilizando este tipo de explantos. A pesar de las ventajas comentadas más arriba que podría tener este sistema de regeneración a nivel de cultivo *in vitro*, la imposibilidad de lograr áreas o células transformadas en este sistema bajo las condiciones ensayadas torna muy dificultoso la utilización del mismo en la obtención de plantas transgénicas. Posiblemente, se precisen cepas de *Agrobacterium* más potentes, o identificar genotipos más aptos para la transformación de hojas (considerando la dependencia genotípica para la transformación vegetal) o como en el caso de los hipocótilos, se debería probar un sistema diferente de transformación, como el biolístico, en el cual no se depende de la interacción entre la célula vegetal y otro organismo, como la bacteria, sino que el ADN se introduce en las células sin discriminar su origen, tamaño y forma o velocidad de crecimiento.

d. Meristemas

La organogénesis directa de brotes a partir de los explantos obtenidos de ápices meristemáticos mostró una respuesta diferente en cada genotipo ensayado. Varios autores optan por este tipo de cultivo *in vitro* para evitar esta dependencia con el genotipo (Bidney, 1992; Knittel, 1994; Rao y Rohini, 1999; Weber, 2003), sin embargo, esta estrategia, en la que no se pasa por un período de desdiferenciación para formar un callo a partir del cual se organiza la embriogénesis como en el caso de los hipocótilos, también resulta genotipo-dependiente. Una ventaja de la misma es el corto tiempo de cultivo *in vitro* del explanto y también la posibilidad de obtener más de un brote por explanto según el genotipo a utilizar. El daño producido durante el corte del meristema apical permite que se desarrollen las yemas laterales de las bases de los cotiledones, además de ser vía de entrada de *Agrobacterium*. La capacidad organogénica de las células tratadas será un factor decisivo en el momento de la transformación. Se han hecho esfuerzos para aumentar la organogénesis a partir de los explantos de meristemas, como bombardeo con genes de citoquininas para provocar una mayor producción de este regulador en forma transiente durante la transformación con At (Müller, 2002). En este trabajo se observó que, por lo menos con el genotipo HA89 se pueden obtener en algunos casos más de 5 brotes por explanto. Este fenómeno agrega una ventaja a la hora de usar este explanto para transformar con At, y es que las células que se transforman antes de organizarse como parte de un meristema nuevo aumentan la probabilidad de obtener brotes transgénicos con menor grado de quimerismo (Burrus, 1996). El genotipo HA89 mostró un comportamiento mucho mejor que el HA300b para la regeneración y la transformación en hemimeristemas. Este genotipo no había sido usado anteriormente en estas condiciones de cultivo *in vitro*.

El ensayo histoquímico sobre los explantos tratados y tejidos derivados de ellos, reveló células o grupos de células acotados en su tinción y también zonas más extensas de color índigo, que llamamos puntos o áreas azules. Además del tipo de agrupamientos se observó la distribución de los mismos en el explanto. Tanto un parámetro como el otro tuvieron diferentes valores entre genotipos. De esta manera se pudo identificar cuáles genotipos poseen una mayor tendencia a transformar sólo

sus células pertenecientes al explanto inicial y cuáles presentaron una mayor cantidad de eventos, áreas o puntos, en los brotes originados de los meristemas formados luego de la transformación. Con el índice de distribución (ID) se identificaron también los patrones de comportamiento diferencial entre los genotipos reportados como de mayor producción de compuestos fenólicos (APF) y los de menor producción, característica relacionada a su menor o mayor susceptibilidad *Sclerotinia scleroiuorum*. De los seis genotipos que presentaron mayor porcentaje de transformación, Ha89, B2, y R3 se ubicaron en primer lugar y Ha300b, R1 y R4 en segundo lugar. El HA89 mostró además alto ID y buena eficiencia de generación de brotes a partir de este explanto. Se observó que la relación puntos/áreas y el índice de distribución sostienen una tendencia similar para todos los tratamientos y genotipos. De los resultados obtenidos en los experimentos con genotipos de alta producción de fenoles en comparación con HA300b y sus variaciones en la adición de ACS en el inóculo de At, se desprende que: 1) al tratar hemimeristemas con At hay una sensibilidad diferente entre genotipos. La eficiencia de transformación varía entre 50% y 92%. 2) hay una tasa de distribución de eventos diferente entre genotipos y 3) hay dos tipos de eventos de transformación, puntos y áreas, observados en la prueba histoquímica.

La presencia de compuestos fenólicos (endógeno o exógeno, de acuerdo al modo de adición) produjo diferencias cualitativas y cuantitativas en la interacción girasol-*Agrobacterium*. La diferencia cuantitativa se revela por la variación de eficiencia de transformación entre genotipos. La cualitativa está indicada por el índice de distribución en relación a la presencia de los compuestos fenólicos. En efecto, los genotipos descritos por Bazzalo y col (1991) como de alta producción de fenoles bajo la infección de *Sclerotinia* (HA61 y RHA275), tuvieron baja tasa de regeneración, alta eficiencia de transformación (en términos de puntos o áreas por explanto) y similar índice de distribución. La primer evidencia que se encontró en este trabajo acerca de la importancia potencial de compuestos fenólicos en la relación *Agrobacterium*/girasol fue en relación a la infección de discos de hipocótilo. En estos explantos al cocultivarlos con At, los eventos de transformación se localizaron principalmente en las áreas de los haces vasculares, independientemente del genotipo. La prevalencia de la expresión de GUS en tejido vascular ya había sido reportada por Schrammeijer (1990) con transformación de meristemas enteros. Parte del tejido vascular contiene células con las paredes

lignificadas y con compuestos fenólicos esterificados con los polisacáridos de las mismas. El daño producido al obtener los explantos permite la liberación de los compuestos fenólicos dando lugar a la expresión de los genes *vir* en *Agrobacterium* para disparar la infección celular y sería la razón de la alta tasa de transformación en este área de explanto.

Para encontrar una explicación a las diferencias observadas, se combinaron los tratamientos de At y acetosiringona sobre hemimeristemas del genotipo Ha300B. La respuesta obtenida se comparó con la de los genotipos de alta producción de fenoles. El índice de distribución en los tratamientos b y c (ACS en medio YEB y en suspensión) fue similar al de los genotipos Ha61 y Rha275. Y la eficiencia de transformación en estos dos genotipos fue mayor que cualquiera de los otros tratamientos comparados con el agregado de ACS. Por lo que una vez más se registra la influencia del genotipo en la respuesta a la agroinfección. Hansen y col (1994) tampoco encuentran incrementos en la eficiencia de transformación con la adición de ACS en el cocultivo. Está claramente demostrado que la ACS provoca la inducción de los genes *virA* (Zupan and Zambryski, 1995) y se ha mostrado que el pretratamiento de tejidos de plantas dicotiledóneas o la adición de ACS durante el cocultivo mejora la eficiencia de transformación (Guivarch y col., 1993; Owens y col., 1988). En este trabajo no se han obtenido mejoras apreciables en la eficiencia mediante la adición de ACS, pero sí se han observado comportamientos diferentes en genotipos reportados como de alta producción de compuestos fenólicos. Una posible explicación de este comportamiento diferencial puede deberse a la condición de inducción de las bacterias en el momento del contacto con el explanto. Tanto en los tratamientos de preinducción como en los genotipos APF se observa una mayor concentración de áreas o puntos en la zona original del explanto (basal), y menor en los tejidos formados con posterioridad (meristemas laterales y brotes). En los otros tratamientos y en el control esta distribución es más uniforme. Esto indicaría que la inducción sobre los genes *vir* provocada por la alta concentración de fenoles en los genotipos APF es comparable a la ACS adicionada en el precultivo de las bacterias. Esta condición provocaría la concentración de la mayor cantidad de zonas transformadas en el explanto con los cortes expuestos, mientras que ante la falta de inducción previa (control y ACS en placa) las bacterias provocan transformaciones cuando se inducen más tarde, pudiendo estar en contacto entonces con células en activa división (meristemas nuevos o brotes). De ser así,

cabe plantearse el uso de ACS según el tipo de tejido que se quiere abordar y tener en cuenta los tiempos de inducción según la fuente de compuestos fenólicos presente.

Con el objetivo de perfeccionar el protocolo de transformación estudiado, se ensayaron diversos tratamientos de transformación para hemimeristemas en el genotipo HA300B. Concordando con lo expuesto más arriba, el tratamiento con ACS en este genotipo provocó mayor cantidad de eventos medidos como puntos o áreas azules. Con el agregado del bombardeo con partículas cubiertas de ADN esta eficiencia aumentó y fue la combinación que mayor cantidad de explantos con áreas mostró entre los tratamientos. Bidney (1992) compara tratamientos de At con y sin bombardeo en meristemas enteros y afirma que el bombardeo es efectivo para incrementar la frecuencia de transformación por At. Asimismo la combinación de At con bombardeo con partículas desnudas aumentó la eficiencia (aún sin la presencia de ACS) por lo que posiblemente las heridas provocadas por el oro incrementaron las posibilidades de transformación, aumentando el número de explantos con puntos azules. La adición de ACS en el precultivo de la bacterias provocó incremento de áreas azules más que de puntos. El bombardeo con oro cubierto con ADN y sin At mostró la menor eficiencia de todos los tratamientos. La combinación de At + B podría ser muy útil en los sistemas donde las células con potencial de regeneración están en la región dañada por el bombardeo. Según los resultados de este trabajo, sería más factible obtener sectores transformados con esta última combinación. La mayor posibilidad de transformar áreas más extensas puede resultar en la obtención de líneas celulares que eventualmente comprometan las yemas axilares formadas *de novo* que darán lugar a la formación de brotes.

Además de las variaciones en la eficiencia de transformación de las distintas técnicas se estudió la influencia de la agroinfección sobre la regeneración de brotes. Inicialmente se había realizado un barrido de diversos genotipos en relación a la capacidad de generar organogénesis a partir de meristemas divididos. El genotipo HA89 resultó ser el de mejor comportamiento en el factor multiplicidad y también mostró una buena eficiencia de transformación. Al optar por este genotipo para continuar con los ensayos de transformación se estudió el efecto de At y de la Km sobre la multiplicidad. La agroinfección *per se* no produjo disminución en la

multiplicidad, pero sí la Km. Se ha reportado como síntoma del efecto de este antibiótico al blanqueamiento de los brotes y no se había prestado atención al parámetro multiplicidad. En el tercer subcultivo de los brotes es donde se vieron más acentuados los efectos del antibiótico. En este paso los brotes no transformados (o sin cantidad suficiente de sectores con expresión del transgén) se ven más afectados por el tiempo de exposición a la Km y la debilidad con que se desarrollaron en esas condiciones. Los brotes que superaron esta etapa y fueron injertados posiblemente tenían un sector importante transgénico o por lo menos de alta expresión del transgén para sobreponerse al estrés del antibiótico y de la rustificación en el injerto.

De todas maneras la multiplicidad observada inicialmente en HA89 disminuyó en los ensayos de transformación subsiguientes con respecto a las observaciones hechas inicialmente. Para explicar la disminución en la multiplicidad se plantearon dos causas posibles: el aumento en el número inicial de explantos tratados por ensayo (y consiguientemente en el resto del ensayo) y/o el efecto del operador, ya que al ser ensayos de gran número de explantos debían por lo menos trabajar dos personas al mismo tiempo para extraer el número de explantos necesarios y subcultivarlos. El análisis del operador mostró que este efecto existe, sobre todo en los primeros subcultivos. Los brotes obtenidos durante el primer subcultivo en Km son afectados antes por el agente selectivo, por lo que en el segundo subcultivo en Km la diferencia de desarrollo de los brotes es más fácil de observar, lo que se plasma en la menor variación encontrada en esta segunda etapa.

El número inicial de explantos manipulados por ensayo varió dramáticamente la multiplicidad de los brotes especialmente en el segundo subcultivo. Pasando la barrera de 70 explantos iniciales se observa una muy baja tasa de multiplicación. Este efecto puede deberse a que en el momento de realizar los subcultivos, se puede operar con más detenimiento sobre cada individuo si el ensayo no es muy numeroso. La necesidad de observar con mayor detenimiento la formación de brotes nuevos y subcultivarlos influirá en la eficiencia de transformación. El mayor número de brotes regenerados por explanto aumenta las probabilidades de encontrar entre éstos algún brote transgénico.

El origen de los brotes transformados puede ser de meristemas preexistentes o de novo. En el último caso la transformación precede a la morfogénesis mientras que en el primero la transformación puede producirse sobre una o pocas células del

meristema preexistentes (Burrus,1996). Desde el punto de vista práctico, la ocurrencia de meristemas apicales transformados es rara y difícil de detectar y explotar. Sin embargo, las yemas axilares son a veces parte de los sectores transformados que pueden en definitiva dar origen a brotes transformados y éstos dar descendencia. La mayoría, si no todos los brotes gus positivos parecen derivar de meristemas preexistentes en los que un pequeño número de células han sido transformadas por *Agrobacterium*. En el caso de precisarse realizar ensayos a gran escala con el sistema de cocultivo en placa, se debería evaluar la conveniencia de hacer ensayos grandes (más de 100) en detrimento de la multiplicación en el segundo subcultivo. Este análisis es relevante ya que habría mayor probabilidad de obtener brotes quimeras a partir de las yemas apicales (asiladas en el primer subcultivo) que en los de las yemas secundarias que se desarrollan en un medio selectivo y cuya individualización puede realizarse a partir del segundo subcultivo. Este análisis corresponde a las observaciones hechas en los ensayos de cocultivo en placa. En el caso del cocultivo líquido y en comparación con la técnica en placa, el efecto de la multiplicidad en relación al número inicial de explantos tratados es menos directo. Aún con 100 iniciales, no se observan diferencias significativas. Aunque sigue existiendo diferencia de multiplicidad entre primer y segundo subcultivo. Utilizando la técnica de cocultivo líquido se podría partir de un mayor n inicial que en placa (más de 100), ya que no se ve tan afectada la obtención de brotes.

Este sistema de transformación por cocultivo en medio líquido varía en su eficiencia con la cepa utilizada (la C58 se comportó mejor que la EHA105), pero se debe tener en cuenta también la eficiencia en el número de brotes injertados PCR positivos en relación al n inicial, a la hora de decidir la cepa a utilizar (con EHA105 este valor fue el más alto en los dos sistemas). Diversos autores obtienen transformación con LBA 4404 (Schrammeijer, 1990; Knittel, 1994; Rao y Rohini , 1999) o con EHA101 en hemimeristemas con cocultivo en placa (Bidney, 1992; Malone-Schoeneberg, 1994). La virulencia de las cepas de At varían entre los hospedantes y es de particular importancia en especies recalcitrantes. Han (2000) encuentra una superioridad en la eficiencia de transformación de álamo por cocultivo en la cepa EHA 105 en relación a C58.

Con la cepa EHA105 no se han reportado transformaciones en este tipo de explantos en girasol.

La técnica de cocultivo líquido no se ha descrito aún para transformación de girasol y en este trabajo se muestra que puede tener ventaja sobre las técnicas anteriormente utilizadas respecto a la posibilidad de manejar muchos explantos iniciales sin detrimento del número de brotes a obtener luego de la transformación y selección en Km. Además, este método de transformación resulta muy apropiado debido a su facilidad en el manipuleo de los explantos y la alta eficiencia de transformación (3,4 y 1,3 para C58 y EHA105 respectivamente; 35% y 100% de brotes PCR positivos injertados para cada cepa). Diversos autores reportan eficiencias similares o menores con este tipo de explanto pero utilizando otras cepas de *At* (LBA4404 o GV2260). El más semejante al tratamiento reportado en este trabajo es el de Knittel (1994) con 3,1 de eficiencia pero utilizando semillas de dos días de germinación y 5 días de precultivo de genotipo LG60 y LG61.

Para comprobar si este sistema de transformación se puede aplicar a otros plásmidos, se realizaron experimentos de transformación con la cepa C58 con el plásmido que contiene el gen Btk de la toxina del *Bacillus thuringhensis*. La eficiencia de transformación osciló entre 0 y 13,89% con una media de 5,23%. Estos valores muestran que el procedimiento de cocultivo líquido para la transformación de meristemas divididos se puede aplicar también para cepas de *Agrobacterium* con otros plásmidos, y que la cepa C58 conteniendo tanto el plásmido pBI121.2 como el p35SBtk es apta para esta técnica de transformación.

En general las plantas T0 obtenidas formaron más de un capítulo por planta. El sistema de transformación utilizado permitió obtener más de un evento por meristema tratado y a su vez distintos tipos de quimerismos en las T0. Se encontraron combinaciones de tejido derivados de células somáticas transformadas y sin transformar, tejidos transformados y líneas germinales no transformadas, así como líneas germinales transformadas y líneas somáticas sin transformar en la misma planta. Del análisis de la descendencia de la plantas T0 transgénicas determinadas por PCR se desprende que, en un caso, la línea germinal no estaba transformada y la descendencia chequeada fue negativa (#81). En el caso de la planta #82 una de las cabezas produjo descendencia transgénica y la otra no, por lo que puede inferirse que, además de las líneas celulares somáticas, parte de la línea germinal se transformó dando origen a por lo menos un capítulo con semillas transgénicas. La descendencia de todas las cabezas de la #41y de la B24 fue

transgénica en la T1. En la generación T2 de la B24 se observó que la herencia del transgén era diferente (1:1 y 3:1) en las plantas que derivaban del mismo capítulo (B24.1.4 y B24.1.1) y en el Southern blot también se verificó un número de copias diferente, por lo que se infiere que se trata de eventos diferentes en un mismo meristema original, que dieron origen a líneas celulares germinales diferentes para un mismo capítulo o de células adyacentes transformadas en el mismo meristema. En la otra cabeza analizada de esa planta (B24.3) se observa una segregación 1:1 por lo que podría ser el mismo evento que dio origen a una línea germinal que derivó en capítulos diferentes (B24.3 y B24.1). Se han reportado resultados similares en cuanto a la distribución de las líneas transformadas (germinales y somáticas) en la planta tratada (Malone-Schoneberg, 1994). En los eventos obtenidos con el plásmido conteniendo el gen Btk se verificó mediante PCR y Southern blot la presencia del transgén en varios eventos.

Se observaron fenómenos similares para ambos tipos de eventos con plásmidos diferentes lo que muestra que independientemente del plásmido utilizado en la transformación, las células germinales o somáticas son transformadas aleatoriamente. A pesar de no haber podido establecer en algunos casos el tipo de herencia del transgén, se pudo comprobar la presencia del mismo hasta en la generación T4 para algunos eventos. Es decir que el transgén se conservó en el genoma del girasol por más de dos generaciones en los eventos analizados obtenidos mediante cocultivo tanto en placa como en cultivo líquido y utilizando cepas de *At* (EHA105 y C58) y plásmidos distintos (pBI 121.2 y 2x35S-K).

El girasol es una de las especies con dificultad para ser transformada genéticamente debido a es difícil combinar la transformación y la regeneración en el mismo tipo de células (Potrykus,1990). Se han reportado numerosas variantes en cuanto a la transformación de meristemas derivados de embriones maduros de girasol en función de desarrollar un protocolo de transformación de mayor eficiencia y que pueda ser aplicado de rutina en ensayos con genes de interés. En la mayoría de los trabajos utilizan el gen GUS INT y el marcador selectivo Kanamicina. Schrammeijer (1990) comienza a utilizar este explanto sin dividir y reporta una eficiencia de 0.1% con las cepas EHA101 y LBA4404. Bidney (1992) introduce la variante de bombardear con partículas de oro para mejorar la eficiencia de transformación provocando mayor daño celular para incrementar las posibilidades de transformación con *At*. Este autor reporta 0,05% de eficiencia. Este efecto

también es buscado mediante el tratamiento con enzimas de maceración (Weber, 2003) sobre el genotipo HA300b o con otro tipo de daños (Grayburn y Vick, 1995). Burrus (1996) realiza una descripción minuciosa del tipo de células y tejidos alcanzados por la transformación con *At* usando un protocolo similar al de Schrammeijer y compara a su vez el comportamiento de meristemas enteros versus hemimeristemas sobre HA300b y con la cepa GV2260. Knittel (1994) reporta una eficiencia de 3% en explantos tratados con *At* y bombardeo con la cepa LBA 4404 utilizando explantos con 5 días de precultivo provenientes de semillas con dos días de germinación de genotipo LG60 y LG61. Rao y Rohini plantean simplificar el protocolo mediante el uso de explantos consistentes en germinaciones de dos días a las que se les extrae sólo un cotiledón y reportan 2% de eficiencia con la cepa LBA4404 en el genotipo KBSH1. Con el fin de incrementar la multiplicidad de organogénesis sobre las zonas meristemáticas, Molinier (2002) propone el bombardeo con genes *ipt* de síntesis de citocininas para provocar la expresión transitoria de este regulador de crecimiento y lograr mayor cantidad de brotes por explanto tratado; obtiene un 6% de eficiencia en la prueba histoquímica.

En el presente trabajo se ha logrado obtener plantas transgénicas a partir de diversos genotipos, concentrando la atención en el genotipo HA89 mediante una modificación del protocolo propuesto por los autores antes mencionados que consiste en someter los explantos (hemimeristemas) a un cocultivo líquido en agitación durante tres días donde se ajustaron las concentraciones de las agrobacterias (para las cepas EHA 105 y C58) obteniendo una eficiencia de transformación de 3.4 y 1.3 (para EHA105 y C58 respectivamente) y 5.23% para la C58 conteniendo el plásmido 2x35SBtk, medida como porcentaje de plantas PCR positivas obtenidas en relación al número inicial de explantos tratados. Se ha demostrado que el sistema propuesto es factible de aplicación con diversas cepas de *At* y plásmidos conteniendo distintos genes (tanto reporteros como de interés agronómico). También se ha estudiado la factibilidad de realizar ensayos a gran escala con el protocolo propuesto sin detrimento de la eficiencia de transformación.

CONCLUSIONES

En este trabajo se han ensayado variaciones sobre sistemas de cultivo *in vitro* a partir de explantos derivados de cotiledones, hipocótilos, hojas y meristemas de distintos genotipos de girasol, a partir de las cuales se ha logrado regeneración directa o indirecta según el caso. Paralelamente se han probado diferentes condiciones de cocultivo con diversas cepas de *Agrobacterium*, y la posibilidad de seleccionar las células transformadas con varios agentes selectivos.

En los explantos derivados de cotiledones la formación de centros meristemáticos se observa a partir de 5 a 7 días de iniciado el cultivo. El ácido giberélico (0,1 mg/l) aumenta el porcentaje de regeneración, especialmente para la combinación de 0.75/0.1 de ANA/BAP luego del comienzo del desarrollo de los centros meristemáticos. Es recomendable el uso de GA₃ para acentuar la eficiencia en el proceso de regeneración y de selección.

Ninguna de las concentraciones de Km ensayada tuvo efecto en el desarrollo y aspecto de los callos obtenidos de los cotiledones. Tanto la paromomicina (25 mg/l) y fosfinotricina (2,5 mg/l) podrían usarse como agentes selectivos para discriminar el crecimiento entre células transformadas y no transformadas.

La transformación de células en explantos derivados de cotiledón es mayor en tejido indiferenciado que en el organizado del cotiledón maduro.

Es aconsejable la alternativa de regeneración indirecta para la transformación de explantos derivados de cotiledones, más precisamente en el período de formación de los centros meristemáticos.

El tratamiento de los explantos con macerozima® previo a la agroinfección no incrementó la eficiencia de transformación.

El sistema que plantea el uso de cotiledones como explanto para la regeneración y transformación, muestra la complejidad de la transformación donde las células que regeneran no son las que preferentemente se transforman.

En el caso del uso de explantos derivados de hipocótilos existe un efecto genotípico en la respuesta de los explantos para la formación de callos embriogénicos.

Los callos de mejor aspecto se desarrollaron en el medio con iguales concentraciones de ANA/BAP (1:1). Los callos más friables son los más aptos para la formación de embriones somáticos.

La transformación de las zonas potencialmente embriogénicas no fue posible. Se evidenciaron áreas con mayor tendencia a ser transformadas, ubicadas en la zona central de explanto correspondientes a los haces vasculares.

La mayor concentración de eventos de transformación se encontró en la zona central del explanto, pero no coincide con la zona de embriogénesis, lo que limita la posibilidad de obtención de embriones a partir de tejido transformado.

Se evidenció que la interacción célula-bacteria depende del tipo celular y de los metabolitos excretados por los distintos tipos de células que inducirían a la bacteria a la infección.

La concentración de las células transformadas en la zona central del explanto, la formación de embriones en el sector periférico, la disminución de la capacidad de regeneración del material agroinfectado e inconvenientes respecto de la selectividad, contribuyen a disminuir las posibilidades de obtención de una planta transgénica a partir de explantos derivados de hipocótilos.

En los explantos derivados de hojas, la mayor eficiencia de regeneración se obtuvo en el medio con iguales concentraciones de ANA/BAP. La embriogénesis somática a partir de explantos de hojas mostró ser una alternativa interesante para una rutina de regeneración.

La imposibilidad de lograr áreas o células transformadas en explantos de hojas bajo las condiciones ensayadas torna muy dificultoso la utilización de este sistema en la obtención de plantas transgénicas.

Los explantos derivados de embriones maduros, se trataron divididos en partes iguales: meristemas o hemi-meristemas. La organogénesis directa de brotes a partir a partir de explantos meristemáticos mostró una respuesta diferente en cada genotipo ensayado. El genotipo Ha89 se comportó mejor que el Ha300b tanto para

la regeneración como para la transformación en hemimeristemas. El comportamiento del genotipo Ha89 ante las condiciones de cultivo *in vitro* ensayadas descritas en este trabajo no había sido reportado hasta el momento.

Se pudo identificar genotipos con mayor tendencia a la transformación de las células del explanto inicial y otros con mayor respuesta en los brotes originados de los meristemas formados luego de la transformación. También se identificaron patrones diferentes de comportamiento frente a la agroinfección entre genotipos descritos con diferente producción de compuestos fenólicos. La presencia de estos compuestos produjo diferencias cualitativas y cuantitativas sobre la interacción girasol-*Agrobacterium*. La adición de acetosiringona no produjo mejoras apreciables en la eficiencia de transformación por cocultivo, pero permitió discriminar comportamientos diferentes en los genotipos reportados como de alta producción de compuestos fenólicos, por lo que cabe plantearse el uso de ACS según el tejido que se quiere transformar y tener en cuenta los tiempos de inducción según la fuente de compuestos fenólicos presente.

La eficiencia de transformación fue mayor en la combinación de cocultivo con bombardeo de partículas de oro cubiertas con ADN. Esta combinación puede ser útil en los casos que las células competencial de regeneración se encuentran en la región alcanzada por las partículas.

Se estudió la influencia de diversos factores sobre el parámetro multiplicidad de brotes obtenidos a partir de hemimeristemas. La agroinfección no produjo *per sé* una disminución sobre la regeneración, pero la Km sí lo hizo. El factor del operador produjo efecto sobre la multiplicidad de los brotes en tratamiento de cocultivo, así como el número inicial de explantos manipulados en cada ensayo, por lo que se recomienda no exceder los 70 explantos iniciales por ensayo.

En el sistema de cocultivo líquido, en cambio, se pueden realizar ensayos con un número inicial de explantos mayor, si existiera la necesidad. En cocultivo líquido la eficiencia de transformación varía según la cepa utilizada.

Este sistema de transformación permitió tener más de un evento por meristema tratado y se han observado quimerismos en las plantas T0. Estos fenómenos se observaron independientemente de la cepa o el plásmido utilizado, lo que muestra que las células germinales o somáticas son transformadas aleatoriamente. El análisis de la herencia del transgén se pudo seguir hasta la generación T4 en algunos casos.

Esta técnica no se había descrito aún para girasol y puede tener ventajas sobre las mencionadas anteriormente por la posibilidad de manejar muchos explantos inicialmente sin detrimento del número de brotes a obtener luego de la transformación y la selección, la alta eficiencia de transformación que puede lograrse, su bajo costo, la posibilidad de uso de más de una cepa de *At* con genes reporteros o de interés y de incrementar la escala de trabajo.

BIBLIOGRAFÍA

- Alibert, G.; Aslane-Chanabé, Ch. & Burrus, M. (1994). Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. *Plant Physiol. Biochem.* 32(1):31-44.
- Alt-Moerbe, J., Neddermann, P., von Lintig, J., Weiler, E. W. and Schröder, J. (1988) Temperature-sensitive step in Ti plasmid *vir*-region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacterium*. *Mol. Gen. Genet.* 213: 1-8.
- Baker, C. M., Muñoz Fernandez, N., and C.D. Carter (1999). Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58:39-49.
- Bazzalo, M. E. (1986). Mecanismos de defensa en *Helianthus annuus* L. frente al ataque del hongo *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary. Doctoral Thesis. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Argentina.
- Bazzalo, M. E., Heber, E. M. y O. H. Caso (1987). Factores físicos y localización anatómica de compuestos fenólicos en relación con la tolerancia del tallo del girasol (*Helianthus annuus*) frente a *Sclerotinia sclerotiorum*, causal de la podredumbre basal. *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 25 (1-2), 197-212.
- Bazzalo, M. E., Dimarco, P., Martínez, F. & G.R. Daleo (1991). Indicators of resistance of sunflower plant to basal stalk rot *Sclerotinia sclerotiorum*: Symptomatology, biochemical, anatomical, and morphological characters of the host. *Euphytica* 57:195-205.
- Bidney, D.; Scelonge, C.; Martich, J.; Burrus, M.; Sims, L. and Huffman, G. (1992). Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology* 18:301-313.
- Begenisic, F. (2002). El quinquenio de la soja transgénica. Ed. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos.
- Bronner, R.; Jeannin, G. and Hahne, G. Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). *Can. J. Bot.* 72:239-248.
- Burrus, M. Molinier, J. Himber, C., Hunold, R., Bronner, R, Rousselin, P. And G. Hahne (1996). *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: transformation patterns. *Molecular Breeding* 2:329-338.
- Ceriani, M.F.; Hopp, E.; Hahne, G. and Escandón, A. S., (1992). Cotyledons: an explant for routine regeneration of sunflower plants. *Plant Cell Physiol.* 33(2):157-164.
- Choi Pil S., Wong Y. Soh, Youn S. Kim, Ook J. Yoo and Jang R Liu (1994). Genetic transformation and plant regeneration of watermelon using *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports* 13: 344-348.
- Chraïbi, K. M. B., Castelle J. C., Latche, A., Roustan, J. P. And J. Fallot (1992). A genotype independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.) the role of ethylene. *Plant Science*, 86:215-221.
- Connors, D. J. and V. O. Sadras (1992). Physiology of yield expression in sunflower. *Field Crop Research* 30, 333-389.

- De Block, M. Genotype-independent leaf disc transformation of potato (*Solanum tuberosum*) using *Agrobacterium tumefaciens* (1988). Theor. Appl. Genet. 76:767-774.
- De Block, M.; Botterman, J.; Vanderwiele, M.; Dockx, J.; Thoen, C.; Goessele, V.; Movva, N.; Thompson, C.; Van Montagu, M. & Leemans, J. (1987). EMBO J. 6: 2513-2518.
- Delannay, X et al (1989) Bio/technol. 7:1265-1269.
- del Vas, M. (1992) Tesis doctoral Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA.
- De Ropp, M (1947) Amer. J. Bot., 33:591-597.
- Escandón A. & Hahne, G. (1991). Genotype and composition of culture medium are factors important in the selection for transformants sunflower (*Helianthus annuus*) callus. Physiol.Plant. 81:367-376.
- Escandón, A; Lewi, D. y López, N. (1994). Obtención de plantas transgénicas de girasol. Libro de Resúmenes de BIOLATINA'94. Junio de 1994, Buenos Aires, Argentina.
- Espinasse, A., Lay, C. And D. Dybing (1985). Factors controlling in vitro development of sunflower embryos. Agronomie, 5 (9) 825-832.
- Everett, N.; Paterson-Robinson, K. & Mascarenhas, D. (1987). Genetic Engineering of Sunflower (*Helianthus annuus* L) Bio/Technol. 5:1201-1204.
- Fambrini, M.; Cionini, G. and Claudio Pugliesi (1996). Development of somatic embryos from morphogenetic cells of the interspecific hybrid *Helianthus annuus* × *Helianthus tuberosus*. *Plant Science* 114 (2): 205-214.
- Feitelson, J. S. Payne, J. And L. Kim (1992). *Bacillus thuringiensis*: Insects and Beyond. Bio/Technology 10:271-275.
- Fick, G. N. (1997). En : Sunflower Technology and Production. American Society of Agronomy, Inc. Crop Sciences Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin, USA. Cap. 8:395-440.
- Finer, J.J., Vain, P. Jones, M. And M. D. McMullen (1987). Development of the particle inflow gun for DNA delivery to plant cells. Plant Cell Rep. 6: 372-274.
- Fischer, C., Klethi, P. & G. Hahne (1992). Protoplasts from cotyledon and hypocotyl of sunflower (*Helianthus annuus* L): shoot regeneration and seed production. Plant Cell Reports., 11, 632-636.
- Freyssinet, M. and Freyssinet, G. (1988). Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. Plant Sci. 56:177- 181.
- Grayburg, W. S. And B. A. Vick (1995). Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. Plant cell Reports, 14:285-289.
- Goldsborough, P. B., Gelvin, S. B. and Larkins, B. A. (1986). Expression of maize gene in transformed sunflower cells. Mol. Gen. Genet. 202:374-381.
- Goodner, B., Hinkle, G., Gattung, S., Miller, N., Blanchard, M., Qurollo, B., Goldman, B. S., Cao, y., Askenazi, M., Halling, C., Mullin, L., Houmiel, K., Gordon, J., Vaudin, M., Iartchouk, O., Epp, A., Liu, F., Wollam, C., Allinger, M., Doughty, D., Scott, Ch., Lappas, C., Markelz, B., Flanagan, C., Crowell, C., Gurson, J., Lomo, C., Sear, C., Strub, G., Cielo, Ch., and S. Slater (2001). Genome Sequence of the Plant Pathogen and Biotechnology Agent *Agrobacterium tumefaciens* C58. Science 294: 2323-2328.

- Grayburn, W. S. and B. A. Vick (1995). Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. *Plant Cell Rep.* 14:285-289.
- Greco, B.; Tanzarella, O.A.; Carozzo, G. and Blanco, A. (1984). Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Sci. Letters*, 36: 73-77.
- Guivarc'h, A., Caissard, J. C., Brown, S., Marie, D., Dewitte, W., Van Onckelen, H. & Chirqui, D. (1993) *Protoplasma* 174, 10-18.
- Hain, R.; Stabel, P., Czernilofsky, A., Steinbiss, H., Herrera-Estrella, L. & Schell, J. (1985). *Mol.Gen. Genet.* 199: 161-168. -Heiser, C. Jr. (1976) *Plant Breeding of Sunflower*. In: *The Sunflower*, Univ. Oklahoma Press-Norman, 11-184.
- Han, K. H., Meilan, R., Ma, C and S. H. Strauss (2000) An *Agrobacterium tumefaciens* transformation protocol effective on a variety of cottonwood hybrids (genus *Populus*). *Plant Cell Reports* 19:315-320.
- Hansen G., Das, A. and M. D. Chilton (1994). Constitutive expression of the virulence genes improves the efficiency of plant transformation by *Agrobacterium*. *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 91, 7603-7607.
- Hartman, C. L. (1991). *Agrobacterium* transformation in sunflower. En: *Sunflower research workshop*, Fargo, North Dakota, USA, 35-39.
- Heiser, C. B. (1976). *The sunflower*. Univ. Oklahoma Press, Norma, OK.
- Helmer , G., Casadaban, M., Bevan, m., Kayes, L and Cilton, M. (1984). A new quimeric gene as marker for plant transformation: The expresión of *Escherichia coli* β -Galactosidase in sunflower and tobacco cells. *Bio/Technology* 2:520-527.
- Hildebrant, A. G. (1946) *Amer. J. Bot.* 33:591-597.
- Hoekema, A., Hirsch, P.R., Hooykaas, P.J.J., & R.A. Schilperoort (1983). A binary plant vector strategy based on separation of vir and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid, *Nature* 303: 179-180.
- Hofte, H. (1986) *Eur. J. Biochem.* 161:273-280.
- Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R.T. and M. D. Chilton (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *J.Bacteriol.* 168:1291-1301.
- Hood, E. E., Gelvin, S. B., Melchers, S. and A. Hoekema (1993). New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants (EHA105). *Trans Res* 2:208-218.
- Horsch, R.; Fry, J.; Hoffmann, N.; Eichholtz, D.; Rogers, S. and R. Fraley (1985). A simple and general method for transferring genes into plants. *Science* 227:1227-1229.
- Hunold, R.; Bronner, R. and G. Hahne (1995). Early events in microprojectile bombardment: cell viability and particle location. *The Plant Journal* 5(4):593-604.
- James, C. 2002. Global review of commercialized transgenic crops: 2001. ISAAA Briefs No. 24: Preview. ISAAA. Ithaca, NY. <http://www.isaaa.org/>
- Jeannin, G.; Poirot, M. and Hahne, G. (1989) . Cinquenaire de la culture "in vitro", Versailles. Les Colloques de l'INRA, no.51. Ed. INRA, Paris.

- Jefferson, R. A., Kavanagh, T. A. and M. W. Bevan (1987). GUS fusions: β -glucosidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J.* 6:3901-3907.
- Kiss, T.; Kiss, K. Abel, A and F. Solymosy (1989). Nucleotide sequence of the 17s-25s spacer region from tomato DNA. *Nucleic Acids Research* 16:7177-7179.
- Klein, T. M., Arentzen R., Lewis, P. And S Fitzpatrick-McElligott (1992). Transformation of microbes. Plants and animals by particle bombardment. *Biotechnology*, 10:286-291.
- Knittel, N.; Escandón, A.S. and Hahne, G. (1991). Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. *Plant Sci.* 73: 219-226.
- Knittel, N; Gruber, V; Hahne, G and Lenee, P. (1994). Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol. *Plant Cell Rep.* 14:81-86.
- Konov, A.; Bronner, R.; Skryabin, K. and G. Hahne (1998). Formation of epiphyllous buds in sunflower (*Helianthus annuus* L.): induction *in vitro* and cellular origin. *Plant Science* 135 (1) : 77-86.
- Laparra, H.; Burrus, M; Hunold, R; Bravo-Angel, A.M.; Bronner, R. and G. Hahne (1995) Expression of foreign genes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) –evaluation of three gene transfer methods. *Euphytica* 85:63-74.
- Laparra, H., Stoeva, P., Ivanov, P., and G. Hahne (1997). Plant regeneration from different explants in *Helianthus smithii* Heiser. *Plant Cell Reports* 16:692-695.
- Leclercq, P. (1966). Une sterilité male utilisable pour la production d'hybrides simples de tournesol. *Ann. Amélior. Plant.* 16:135-1144.
- Leclercq, P. (1969). Une sterilité cytoplasmique chez le tournesol. *Ann. Amélior. Plant.* 19:99-106.
- Lewi, D.; Lopez, N. y Escandón, A. 1993. Se puede transformar girasol con *Agrobacterium* solamente? *Actas del II Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal.* Huerta Grande - Cdba. Argentina.
- Li, J., Carroll, J. And D. J. Ellar (1991) Crystal structure of insecticidal δ -endotoxin from *Bacillus thuringiensis* at 2.5 Å resolution. *Nature* 353:815-821.
- Liu, C.N., Li, X.Q. & Gelvin, S. B (1992) *Plant Mol. Biol.* 20, 1071-1087.
- Main, P.; Keen, N.; Murillo, J.; Rathus, C.; Nemes, Ch. and Finer, J.J. (1993). Development of the Particle Inflow Gun. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 33:237-246.
- Malone-Schoneberg J. B., Scelonge, C., Burrus, M and De. L. Bidney (1994). Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* split embryonic axis explants. *Plant Science* 103:1999-207.
- Maniatis, T.; Fritsch, E. & Sambrook, J. (1982) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual.*
- Matzke, M. A.; Susani, M.; Binns, A. N.; Lewis, E. D.; Rubenstein, I. & Matzke, A. J. M. (1984) *EMBO J.* 7, 1525-1531.
- McDonnell, R.E.; Clark, R.D.; Smith, W.A. & Hinchee, M.A. (1987) *Plant Mol. Biol. Rep.* 5, 380-386.
- Melchers, L.S., Regensburg-Tuink, A.J.G., Schilperoort, R.A., Hooykaas, P.J.J.(1989). Specificity of signal molecules in the activation of *Agrobacterium* virulence gene expression. *Mol. Microbiol* 3: 969-977.
- Müller, A., Markus, S. & D. Hess (2001). Stable transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) using a non-meristematic regeneration protocol and green fluorescent protein as a vital marker. *Transgenic Research* 10: 435-444.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473- 497.

- Murai N., Sutton, D., Murray M., Slighton, J., Merlo, D., Reichert, N., Sengupta-Gopalan, C., Stock, C., Barker, R., Kemp, J. and Hall, T. (1983). Phaseolin gene from bean is expressed after transfer to sunflower via tumor inducing plasmid vectors. *Science* 222:476-481.
- Nataraja, K. and Ganapathi, T.R. (1989). In vitro plantlet regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* cv. Morden (sunflower). *Indian J. Exp. Bot.* 27: 777-779.
- Nutter, R., Everett, N., Pierce, D., Panganiban, L., Okubara, P., Lachmansingh, R., Mascarenhas, D., Welch, H., Mettler, I., Pomeroy, L., Johnson, J. and Howard, J. (1987). Factors affecting the level of kanamycin resistance in transformed sunflower cells. *Plant Physiol.* 84:1185-1192.
- Owens, L. D. & Smigocki, A. C. (1988) *Plant Physiol.* 88, 570-573.
- Paterson, K. (1984). Shoot tip culture of *Helianthus annuus* Flowering and development of adventitious and multiple shoots. *Amer. J. Bot.* 71: 925-931.
- Paterson, K.E. and Everett, N.P. (1985). Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Sci.* 42:125-132.
- Potrykus, I. (1990). Gene transfer to cereals: an assessment. *Biotechnology* 8:535-542.
- Power, C.J. (1987). Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from the cotyledons of zygotic embryos. *Amer.J.Bot.* 74: 497-503.
- Punia, M. S., and N. E. Bohorova (1992). Callus development and plant regeneration from different explants of six wild species of sunflower (*Helianthus* L.). *Plant Science* 87:72-83.
- Rao, K. S. and V. K. Rohini (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): A simple protocol. *Ann Bot* 83: 347-354.
- Sadhu, M. K.,(1974). *Indian J. Exp. Biol.* 12, 110-114.
- Samaj, J. Auxtova, O. And M. Bobak (1994). Different regeneration potential of various sunflower (*Helianthus annuus* L.) genotypes in meristem culture. *Biologia Plantarum* 36:309-311.
- Samaj, J., Okolot, A., Bobak, M. An Yu Gleba (1994). Increase of callus and embryoid production from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.) by culture in microdops. *Biologia Plantarum* 36:183-190.
- Sautter, c.; Waldner, H.; Neuhaus-Uri, G.; Galli, A.; Neuhaus, G.; Potrykus, I. (1991) Micro-targeting: high efficiency gene transfer using a novel approach for the acceleration of microprojectiles. *Bio/Technology* 9:1080-1085.
- Schrammeijer, B.; Sijmons, P. D.; van den Elzen, P.J.M. and Hoekema, A. (1990). Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium*. *Plant Cell Report* 9:55-60.
- Scott Grayburn, W and Brady A. Vick. (1995). Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. *Plant Cell Reports* 14:285-289.
- Seiler, G. J. (1997). En : Sunflower Technology and Production. American Society of Agronomy, Inc. Crop Sciences Society of America, Inc. Soil Science Society of America, Inc. Publishers. Madison, Wisconsin, USA. Cap. 3:67-112.
- Sheng, J. and V. Citovsky (1996). *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: Have virulence protein, will travel. *Plant Cell* 8:1699-1710.
- Spencer, P.A., Towers, G.H.N. (1988). Specificity of signal compounds detected by *Agrobacterium tumefaciens*. *Phytochemistry* 27: 2781-2785.

- Stachel, S.E., Messens, E., Van montagu, M., Zambryski, P. (1985). Identification of the signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens*. *Nature* 318:624-629.
- Stachel S. E. and Nester, E. W. (1986). The genetic and transcriptional organization of the *vir* region of the A6Ti plasmid of *Agrobacterium tumefaciens*. *EMBO J* 5:1445-1454.
- Ulian, E.C., Smith, R.H., Gould, J.H. and T.D. McKnight (1988). Transformation of plants via the shoot apex. *In Vitro Cell Devel. Biol.* 24:951-954.
- Vaeck, M.; Reynaerts, A.; Höfte, H.; Jansens, S.; De Beuckeleer, M.; Dean, C.; Zabeau, M.; Van Montagu, M. and Leemans, J.(1987). *Nature*, 328: 33-37.
- Vancanneyt, G., Schmidt, R., O'connor-Sanchez, A., Willmitzer, L. and M. Rocha –Sosa (1990). Construction of an intron - containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Mol. Gen. Genet.* 220:245-250.
- Voinnet, O. (2001). RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17:449-459.
- Weber S, Friedt W, Landes N, Molinier J, Himber C, Rousselin P, Hahne G, Horn R. (2003). Improved *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. *Plant Cell Rep* 21:475-82.
- Wilcox Mc Cann, A., Cooley, G. & J. Van Dreser (1988). A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 14:103-110.
- Winans, S. C. (1992). Two way chemical signaling in *Agrobacterium*-plant interactions. *Microbiol Rev.* 56:12-31.
- Wood, D. W., Setubal, J., Kaul, R., Monks, D. E., Kitajima, J., Okura, V., Zhou, Y., Chen, L., Wood, G., Almeida, N., Woo, L., Chen, Y., Paulsen, I., Eisen, J., Karp, P., Bovee, D., Chapman, P., Clendenning, J., Deatherage, G., Gillet, W., Grant, Ch., Kutyaivin, T., Levy, R., Li, M., McClelland, E., Palmieri, A., Raymond, C., Rouse, G., Saenphimmachak, Ch., Wu, Z., Romero, P., ordon, D., Zhang, S., Yoo, H., Tao, Y., Bidlle, P., Jung, M., Krespan, W., Perry, M., Gordon-Kamm, B., Liao, L., Kim, S., Hendrick, C., Zhao, Z., Dolan, M., Chumley, F., Tingey, S., Tomb, J., Gordon, M., Olson, M. and E. W. Nester (2001). The Genome of the Natural Genetic Eengineer *Agrobacterium tumefaciens* C58. *Science* 294: 2317-2322.
- Zambryski, P., Joos, H., Genetello, C., Leemans, J., VanMontagu, M. and Schell, J. (1983). *EMBO J.* 2: 2143-2150.
- Zambryski, P. C. (1992) Chronicles from the *Agrobacterium*-plant cell DNA transfer history. *Annu. Rev. Plnt Physiol Plant. Mol. Biol.* 43:465-490.
- Zupan, R. J. and Patricia Zambryski. (1995) Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell. *Plant Phisiology* 107: 1041-1047.