

Transformación Génica y Cultivo de Tejidos de Girasol. Selección del Antibiótico Utilizado para eliminar *Agrobacterium tumefaciens*.

Betiana Parody, Nilda Lopez, Marisa López Bilbao, Esteban Hopp
Instituto de Biotecnología. CICVyA. INTA-Castelar

Introducción

Los antibióticos son usados en la transformación genética para seleccionar los tejidos transgénicos y/o para eliminar *Agrobacterium* de los cultivos una vez finalizado el período de agrottransformación. La eliminación de *Agrobacterium* es necesaria porque la presencia de la bacteria en los cultivos puede producir la muerte de los mismos o afectar el desarrollo de las plántulas regeneradas, pero además esta eliminación es un pre-requisito para evitar la posible liberación de genes al suelo. La carbenicilina, el cefotaxime y la ticarcilina son los antibióticos más usados para eliminar *Agrobacterium* de los cultivos, pertenecen al grupo de los b-lactámicos y actúan inhibiendo la síntesis de la pared celular. La ticarcilina suplementada con ácido clavulánico, un potente inhibidor de las β -lactamasas, se denomina timentina. El efecto de los antibióticos ha sido estudiado en diversas especies vegetales y existen numerosos datos sobre los distintos efectos, tanto inhibitorios como inductores del desarrollo y/o diferenciación de los cultivos, que éstos antibióticos pueden provocar sobre la respuesta de los cultivos.

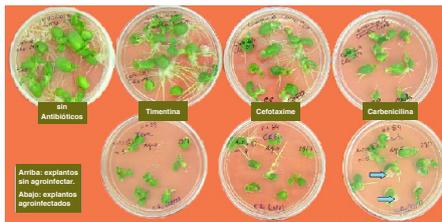
Objetivos

Seleccionar el antibiótico adecuado para eliminar *Agrobacterium tumefaciens* de los cultivos de girasol (*Helianthus annuus* L.), genotipo público HA89, luego de los ensayos de transformación. Para ello se estudiaron los efectos de los antibióticos cefotaxime, carbenicilina y timentina durante el cultivo in vitro, analizando diferentes parámetros.

Resultados

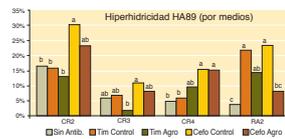
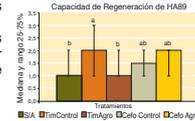
Se analizaron, por medio de la inspección visual continua y además se determinaron cuantitativamente los siguientes parámetros: el número de brotes totales producidos por explanto inicial (regeneración), la proporción de plántulas que presentaron aspecto hiperhídrico (carácter no deseado), la altura de los brotes, el peso fresco y seco de los mismos, el contenido de clorofilas a, b y totales, el contenido de proteínas totales en hojas, la proporción de brotes que desarrollaron botón floral in vitro (otro carácter no deseado en el cultivo in vitro de girasol), la proporción de brotes que enraizaron en los distintos medios, y el porcentaje de recursos asignados a brote y a raíz por las plántulas de cada tratamiento en el medio de cultivo de enraizamiento (al final del período de cultivo in vitro).

1-Inspección visual: Como se observa en la fotografía, la presencia de los antibióticos afecta negativamente el desarrollo de los cultivos. Cuando se compara con el control sin antibiótico, el efecto más marcado o negativo se obtuvo al utilizar carbenicilina, mientras que la timentina produjo el efecto más moderado, presentando los cultivos un aspecto muy similar al control sin antibiótico.



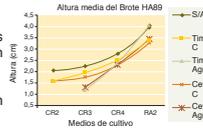
La presencia de *Agrobacterium* desmejoró en todos los casos el aspecto de los cultivos, siendo aquí también los cultivos con timentina los más parecidos al control sin antibióticos. En el caso de carbenicilina se puede observar que además de afectar a los brotes, fue incapaz de controlar el crecimiento de las agrobacterias, marcadas con flechas azules en la fotografía.

2-Regeneración: Las regeneración de los tratamientos con antibióticos (controles y agrobacteriados) fueron iguales o superiores a la de los controles sin antibiótico, siendo el tratamiento control de timentina el que produjo el mayor número de brotes y yemas regenerados por explanto inicial. Si bien durante CR1 los cultivos agrobacteriados habían mostrado menor desarrollo que los controles, a partir de CR2 no hubo una clara respuesta diferenciada entre los cultivos agrobacteriados y no agrobacteriados.



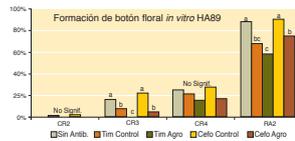
3- Hiperhidricidad: Los antibióticos utilizados, especialmente cefotaxime, favorecen la aparición de hiperhidricidad en mayor proporción que el tratamiento control sin antibiótico, en todos los medio de cultivo. El medio de cultivo CR2, que contiene 0,9^M de BAP, fue el medio que más favoreció la aparición de hiperhidricidad para todos los tratamientos. En el medio RA2, que no provocó hiperhidricidad en los cultivos controles sin antibiótico, los tratamientos con antibiótico tuvieron un aumento pronunciado en el porcentaje de hiperhidricidad. Los cultivos agrobacteriados mostraron menor porcentaje de hiperhidricidad que sus controles respectivos.

4- Altura de los brotes: Los brotes mostraron diferencias significativas entre tratamientos, los cultivos agrobacteriados fueron menores en CR2 y CR3 y luego su altura se acercó a la de los controles; los tratamientos con cefotaxime resultaron ser los que más afectaron negativamente la altura del brote de este genotipo.



5- Peso fresco: Los antibióticos disminuyen el peso de las plántulas con respecto a los controles sin antibióticos. El peso de los explantos muestra diferencias ante los antibióticos utilizados, siendo cefotaxime el que más afecta en forma negativa su crecimiento.

6- Formación de botón floral: el uso de cefotaxime, favorece la aparición del botón floral, mientras que el uso de Timentina no lo hace.



Conclusiones

- La carbenicilina afectó negativamente el crecimiento de los explantos y fue incapaz de controlar el crecimiento de las agrobacterias.
- El antibiótico cefotaxime afectó negativamente el desarrollo de los explantos en todas las situaciones analizadas.
- El antibiótico de elección para el genotipo HA89 es la timentina.