

Tesis Doctoral

Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol

Radonic, Laura Mabel

2010

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Radonic, Laura Mabel. (2010). Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Radonic, Laura Mabel. "Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2010.

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

NUEVAS ESTRATEGIAS PARA LA TRANSFORMACIÓN Y EXPRESIÓN DE GENES DE INTERÉS EN GIRASOL

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de
Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

Lic. Laura Mabel Radonic

Director de tesis y Consejero de estudios: Dr. H. Esteban Hopp

Director Asistente: Dra. Marisa López Bilbao

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria, Castelar

Buenos Aires, 2010

Nuevas estrategias para la transformación y expresión de genes de interés en girasol

El girasol es una especie de la familia Asteraceae (Compositae) de gran importancia económica, considerada hasta hace una década recalcitrante al cultivo *in vitro* y la transformación genética.

En un trabajo previo (Radonic, 2005) se logró establecer el protocolo de selección por enraizamiento en kanamicina con una eficiencia del 0,7 %. En esta tesis se mejoró este protocolo utilizando una construcción portadora de los genes antifúngicos glucanasa y quitinasa, ambos bajo el control del promotor CaMV35S y el enhancer Ω del TMV, obteniéndose una eficiencia de 1,26 %, al aumentar gradualmente la concentración del antibiótico kanamicina en los sucesivos medios de regeneración.

También se evaluó la especificidad y estabilidad de dos vectores conteniendo la construcción CaMV35S-secuencia codificante para la β -glucuronidasa (GUS)-interrumpida por un intrón. Las plantas T1 derivadas de los eventos de transformación presentaron un patrón de expresión de tipo no constitutivo, con expresión de GUS localizada exclusivamente en los tricomas de las nervaduras de la cara abaxial de las hojas, siendo necesario la utilización de lupa para su visualización. En las plantas T2 no se pudo detectar la presencia de los transgenes. El nivel bajo de expresión es similar al descrito en crisantemo y la inestabilidad génica obtenida con este mismo promotor fue también descrita en lechuga, ambas de la familia Asteraceae. Estos datos llevaron a la búsqueda de nuevos promotores para la transformación de girasol.

Los promotores ensayados fueron CaMV35S- Ω TMV, PPC, nos, 2X35S y rbcS1. Estos promotores fueron incorporados en el vector Gateway pKGWFS7,0, diseñado para el análisis de promotores regulando, en todos los casos, la expresión del gen reportero GUS. Este vector, además posee el gen nptII de resistencia a kanamicina bajo la regulación del promotor nos.

Para analizar la funcionalidad de las construcciones obtenidas se realizaron ensayos de agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana*. La actividad de los promotores en girasol fue evaluada mediante ensayos de agroinfiltración en hojas de plantas en invernáculo y la evaluación temprana de los explantos blanco de transformación, por determinación histoquímica de GUS y cuantificación fluorométrica de MUG. Para los ensayos de agroinfiltración de girasol se logró establecer un protocolo, considerado hasta este momento como no factible, determinando el estadio de desarrollo de la planta, la cepa bacteriana a utilizar y el tiempo de análisis. Estos análisis permitieron seleccionar al promotor rbcS1 como el más adecuado, ya que presentó buenos niveles de actividad enzimática y, a diferencia del promotor CaMV35S- Ω TMV, se expresó mayoritariamente en la zona meristemática de los explantos blanco de transformación, región a partir de la cual se regeneran los brotes.

Los resultados obtenidos en los ensayos de transformación estable mostraron que el uso del promotor rbcS1, en comparación al CaMV35S- Ω TMV, no solo aumentó los niveles de expresión de GUS (donde grandes regiones del mesófilo mostraron expresión) sino que modificó la expresión del gen nptII, mejorando notoriamente la eficiencia de transformación (aumentando de 1,26 % a 7,06 %). Además, mejoró la respuesta y el aspecto de las plantas obtenidas (T0) al ser transferidas al invernáculo (tanto por pasaje a tierra directo como por injerto), siendo éstas de gran porte y con capítulos florales más grandes, que resultaron en un aumento del número y tamaño de los aquenios obtenidos. Resultados similares fueron publicados en *Arabidopsis* donde el promotor CaMV35S afectaba y alteraba en trans el patrón de expresión de transgenes y cambiaba el fenotipo de las plantas transgénicas. El análisis de las plantas T1 permitió observar altos niveles de expresión del gen reportero, comparable al de otras especies vegetales.

Los resultados expuestos muestran que es posible transformar girasol con buenos niveles de eficiencia y expresión.

Palabras claves: girasol, selección, promotores, agroinfiltración, transformación

New strategies for the transformation and expression of genes of interest in sunflower

The sunflower is a species from the Asteraceae family of great economic importance, considered recalcitrant to in vitro culture and genetic transformation until a decade ago.

In a previous work (Radonic, 2005) it was possible to establish a selection protocol by rooting in kanamycin with an efficiency of 0,7 %. In this thesis this protocol was improved using a construct carrying glucanase and chitinase antifungal genes, both under the CaMV35S promoter and TMV enhancer Ω , obtaining an efficiency of 1,26 % by gradually increasing kanamycin concentration in the successive regeneration media.

The specificity and stability of two vectors containing the construct CaMV35S- β -glucuronidase codifying sequence (GUS)-interrupted by an intron was also evaluated. The T1 plants derived from the transformation events showed a non-constitutive expression pattern, with GUS expression located only in the trichomes of the leaf veins on the abaxial surface of leaves, for its visualization it was necessary to use a magnifying glass. Detection of transgenes was not possible in T2 plants. This low expression level is similar to that described in chrysanthemum and the genetic instability achieved with the same promoter was also described in lettuce, both of the Asteraceae family. These data led to the search for new promoters for sunflower transformation.

CaMV35S- Ω TMV, PPC, nos, rbcS1 and 2X35S promoters were assayed. These promoters were incorporated in pKGWFS7,0 Gateway vector, which is designed for promoter analysis regulating, in all cases, GUS reporter gene expression. This vector, also has the nptII kanamycin resistance gene under the regulation of nos promoter.

Agroinfiltration assays in *Nicotiana benthamiana* in order to analyze de functionality of the obtained constructs were performed. Promoter activity in sunflower was evaluated in leaf agroinfiltration assays in greenhouse plants and early evaluation of the transformation target explants, by GUS histochemical determination and MUG fluorometric cuantification. A sunflower agroinfiltration protocol was established, until this moment considered not feasible, by determining the developmental plant stage, the bacterial strain used and the time of analysis. These analysis allowed to select rbcS1 promoter as the most suitable, as it showed good enzymatic activity levels and, unlike the CaMV35S- Ω TMV promoter, it is mostly expressed in the meristematic zone from the transformation target explants, region from which shoots regenerate.

Results obtained in stable transformation assays showed that the use of rbcS1 promoter, compared with CaMV35S- Ω TMV promoter, not only increased GUS expression levels (where large regions of the mesophyll showed expression) but modified nptII gene expression, greatly improving transformation efficiency (which increased from 1,26 % to 7,06 %). Moreover, response and aspect of the obtained plants (T0) was improved when they were transferred to the greenhouse (both by direct passage to earth or grafting), they were large-sized and with larger floral chapters, resulting in an increase in the number and size of the obtained achenes. Similar results were published in *Arabidopsis* where the CaMV35S promoter affected and altered in trans transgene pattern expression and changed transgenic plants phenotype. T1 plants analysis allowed to observe high levels of reporter gene expression, comparable to that of other plant species.

The above results show that it is possible to transform sunflower with good levels of efficiency and expression.

Key words: sunflower, selection, promoters, agroinfiltration, transformation

Agradezco al INTA, a la ANPCyT y al CONICET por otorgarme las Becas de Postgrado y por permitirme desarrollar este trabajo. A la UNSAM y la UBA por la formación.

A los directores Dr. Osvaldo Rossetti e Ing. Agr. Raul Ríos y a la directora del Instituto Dra. Elisa Carrillo, por haberme dado la oportunidad de desarrollar mi trabajo de tesis y mi vocación en el Instituto de Biotecnología.

A Esteban por aceptar ser director.

A Marisa, gracias por todo, por dejarme formar parte del grupo “girasolero”, por ser algo más que una jefa y preocuparte por cosas que van más allá del trabajo.

A Nilda, gracias por enseñarme y ayudarme desde mis primeros pasos en el laboratorio.

A Vale y Cintia, por estar siempre, son mi oído y mi hombro, mi alegría, por ser mis amigas.

A Tere y VePe, compañeras y madres postizas.

A Julián, agradezco todo su trabajo y compañerismo.

A ¡Dieguito!, Guille, Naty y Vane M por sus ideas, ayuda y consejos.

A mis compañeros de laboratorio: Susana, Cintia, Pamela, Daniela, Betiana y Mariano, por hacer el día grato.

A Lau R, Vero N, Julia, Vale R, Vane N, Gaby C, Gaby L, Luis, Paula R, Caro y Ceci VR. Por *los mates y charlas, por la ayuda, por los consejos, por la buena onda, por tantos motivos...*

A APu, Pablito y Vero N, por su trabajo en el secuenciador y por llevarme tantas veces.

A Nacho, Matías y Agustín por cuidar con tanta dedicación las plantas y hacer más fácil el trabajo en el invernáculo.

A Isabel, Rosana, Vilma, Fabián y Jorge, por su valioso trabajo en “la cocina” del instituto.

A Marcos gracias por su ayuda con los análisis estadísticos, su paciencia y explicaciones fueron invaluableles.

A toda la gente del Instituto de Biotecnología que de alguna manera me ayudó durante este tiempo.

A Malala, Eri, Dani, Jose y Vicky, porque siempre están y tienen un lugarcito en su corazón para mí, como yo lo tengo para uds.

A Martín, por ser mi alegría, mi hombro, mis sueños, mi presente y mi futuro... sin tu apoyo constante y tu paciencia no podría haber terminado esta tesis.

Por sobre todo agradezco a mi familia: A mi abuela, mi madrina y mi tía, por cuidarme, preocuparse y soñar conmigo. A mi hermano Dani, porque te quiero. A mamá y papá, por *estar conmigo, cuidarme, preocuparse, ayudarme, enseñarme...* Uds. me dieron todo y son TODO.

Índice

Índice

| | |
|--|-------------|
| Resumen | i |
| Abstract | ii |
| Índice | iv |
| Abreviaturas | viii |
| 1. Introducción | 1 |
| 1.1. Familia Asteraceae | 1 |
| 1.2. Girasol | 2 |
| 1.2.1. Especie | 2 |
| 1.2.2. El girasol en Argentina | 2 |
| 1.2.3. Importancia económica | 3 |
| 1.2.3.1. Mercado internacional | 3 |
| 1.2.3.2. La producción de girasol en la Argentina | 4 |
| 1.3. Mejoramiento vegetal y biotecnología | 5 |
| 1.4. Cultivo de tejidos | 6 |
| 1.5. Cultivo de tejidos y transformación en especies asteráceas | 7 |
| 1.6. Cultivo de tejidos y transformación genética en girasol | 8 |
| 1.6.1. Cultivo de tejidos | 8 |
| 1.6.2. Transformación genética en girasol | 9 |
| 1.6.3. Selección de brotes transgénicos | 10 |
| 1.7. Incidencia de las enfermedades fúngicas en girasol | 11 |
| 1.7.1. Enfoques clásicos para el control de enfermedades fúngicas | 12 |
| 1.7.2. Protección ante el ataque de patógenos fúngicos por métodos biotecnológicos | 12 |
| 1.8. Promotores en plantas | 15 |
| 1.8.1. Descripción y tipo de promotores. | 15 |
| 1.8.1.1. Promotores constitutivos | 16 |
| 1.8.1.2. Promotores inducibles | 16 |
| 1.8.1.3. Promotores tejido específicos | 16 |
| 2. Hipótesis y objetivos | 18 |
| 2.1. Hipótesis | 18 |
| 2.2. Objetivo general | 18 |
| 2.3. Objetivos particulares | 18 |
| 3. Materiales y métodos | 19 |
| 3.1. Construcciones utilizadas | 19 |
| 3.1.1. Construcción GUS-intrón | 19 |
| | iv |

| | |
|--|----|
| 3.1.2. Construcciones con genes antifúngicos | 19 |
| 3.1.3. Construcciones para el análisis de promotores | 20 |
| 3.2. Cepas bacterianas | 20 |
| 3.3. Material vegetal empleado | 20 |
| 3.4. Construcción de vectores para el ensayo de promotores | 21 |
| 3.4.1. Obtención de promotores por PCR | 21 |
| 3.4.1.1 PCR CaMV35S- Ω TMV | 21 |
| 3.4.1.2. PCR rbcS1 | 22 |
| 3.4.1.3. PCR PPC | 22 |
| 3.4.1.4. PCR nos | 22 |
| 3.4.1.5. PCR 2X35S | 23 |
| 3.4.2. Electroforesis y purificación de los productos de PCR | 23 |
| 3.4.3. Ligación de los productos de PCR | 23 |
| 3.4.4. Obtención y transformación de competentes de <i>E. coli</i> DH5 α | 23 |
| 3.4.5. Obtención de ADN plasmídico | 24 |
| 3.4.6. Verificación de la orientación del inserto y de la secuencia clonada | 24 |
| 3.4.7. Recombinación en el vector Gateway pKGWFS7,0 | 25 |
| 3.5. Obtención de competentes y transformación de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> | 27 |
| 3.6. Agroinfección de girasol | 28 |
| 3.6.1. Desinfección del explanto inicial | 28 |
| 3.6.2. Germinación | 28 |
| 3.6.3. Cultivo bacteriano | 28 |
| 3.6.4. Corte y agroinfección | 29 |
| 3.6.5. Cocultivo | 29 |
| 3.6.6. Regeneración | 29 |
| 3.6.7. Pasaje al área de rusticación | 30 |
| 3.6.8. Rediseño de estrategias para la selección con el antibiótico kanamicina | 31 |
| 3.6.9. Análisis de la expresión de distintos promotores | 31 |
| 3.6.10. Obtención de la T1 | 32 |
| 3.7. Agroinfección de lechuga | 32 |
| 3.7.1. Desinfección del explanto inicial | 32 |
| 3.7.2. Germinación | 33 |
| 3.7.3. Cultivo bacteriano | 33 |
| 3.7.4. Corte | 33 |
| 3.7.5. Agroinfección y cocultivo | 33 |
| 3.7.6. Regeneración y selección | 33 |
| 3.7.7. Enraizamiento | 34 |

| | |
|---|-----------|
| 3.7.8. Pasaje a invernáculo y recolección de la T1 | 34 |
| 3.8. Agroinfiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i> y puesta a punto de la agroinfiltración de girasol | 34 |
| 3.8.1. Método de agroinfiltración | 35 |
| 3.8.2. Análisis de la expresión | 35 |
| 3.9. Detección histoquímica de GUS | 35 |
| 3.10. Cuantificación fluorométrica de MUG | 36 |
| 3.10.1. Extracción de proteínas | 36 |
| 3.10.2. Cuantificación fluorométrica de MUG | 36 |
| 3.11. Detección de transgenes mediante PCR | 37 |
| 3.11.1 Extracción de ADN genómico | 37 |
| 3.11.2. PCRs | 37 |
| 3.11.2.1. PCR actina | 38 |
| 3.11.2.2. PCR nptII | 38 |
| 3.11.2.3. PCR ch5B | 38 |
| 3.11.2.4. PCR GUS | 39 |
| 3.11.2.5. PCR nos | 39 |
| 3.12. Southern blot | 40 |
| 3.12.1. Extracción de ADN genómico | 40 |
| 3.12.2. Digestión enzimática de ADN | 40 |
| 3.12.3. Separación de los fragmentos de restricción por electroforesis | 41 |
| 3.12.4. Tratamiento del gel previo a la transferencia | 41 |
| 3.12.5. Transferencia del ADN a la membrana de nylon (Southern blot) | 41 |
| 3.12.6. Preparación de las sondas | 41 |
| 3.12.7. Hibridación y detección | 42 |
| 3.13. Medios de Cultivo | 43 |
| 3.13.1. Cultivos Bacterianos | 43 |
| 3.13.2. Cultivos Vegetales | 43 |
| 3.14. Soluciones | 44 |
| 3.14.1. Extracción de ADN plasmídico | 44 |
| 3.14.2. Detección histoquímica de GUS | 45 |
| 3.14.3. Cuantificación fluorométrica de MUG | 45 |
| 3.14.4. Extracción de ADN genómico | 45 |
| 3.14.5. Southern blot | 45 |
| 4. Resultados | 46 |
| 4.1. Rediseño de estrategias para la selección de plantas regenerantes transgénicas resistentes al antibiótico kanamicina | 46 |

| | |
|---|------------|
| 4.2. Agroinfección con genes antifúngicos | 47 |
| 4.3. Análisis de la expresión regulada por el promotor CaMV35S en girasol y lechuga | 49 |
| 4.3.1. Adaptación del protocolo de transformación de lechuga y análisis de la expresión de la construcción GUS-intrón | 50 |
| 4.4. Análisis de la expresión de distintos promotores | 53 |
| 4.4.1. Agroinfiltración de <i>Nicotiana benthamiana</i> con las construcciones conteniendo los distintos promotores | 55 |
| 4.4.2. Puesta a punto de la técnica de agroinfiltración en girasol | 56 |
| 4.4.3. Agroinfiltración de girasol con las distintas construcciones | 59 |
| 4.4.4. Análisis de la expresión transitoria dada por los diferentes promotores estudiados en girasol | 61 |
| 4.5. Transformación estable de girasol utilizando el vector Gateway pKGWFS7,0 con el promotor CaMV35S | 65 |
| 4.6. Transformación estable de girasol utilizando el vector Gateway pKGWFS7,0 con el promotor <i>rbcS1</i> | 66 |
| 4.6.1. Análisis de la T0 | 68 |
| 4.6.1.1. Detección histoquímica de GUS | 68 |
| 4.6.1.2. Detección de transgenes mediante PCR | 68 |
| 4.6.2. Análisis de la T1 | 69 |
| 4.6.2.1. Detección de transgenes mediante PCR | 69 |
| 4.6.2.2. Southern blot | 70 |
| 4.6.2.3. Detección histoquímica de GUS | 70 |
| 5. Discusión | 72 |
| 5.1. Optimización de la selección con el antibiótico kanamicina | 72 |
| 5.2. Transformación con genes antifúngicos | 74 |
| 5.3. Análisis de la expresión regulada por el promotor CaMV35S | 76 |
| 5.4. Establecimiento de una nueva estrategia | 78 |
| 5.5. Puesta a punto de la agroinfiltración en girasol | 78 |
| 5.6. Análisis de la transformación transitoria de girasol con distintos promotores | 80 |
| 5.7. Análisis de la transformación estable de girasol utilizando el promotor <i>rbcS1</i> | 82 |
| 5.8. Efecto en trans del promotor CaMV35S sobre la construcción nos-nptII | 83 |
| 5.9. Consideraciones finales | 84 |
| 6. Conclusiones | 85 |
| Bibliografía | 87 |
| Trabajos derivados de esta tesis | 100 |

Abreviaturas

ADN: ácido desoxirribonucleico

ADN-T: ADN de transferencia

ANA: ácido 1-naftalenacético

ANOVA: analysis of variance (análisis de varianza)

ap24: gen de una osmotina de *Nicotiana tabacum*

ARNasa A: ribonucleasa A

BAP: 6-bencilaminopurina

BSA: bovine serum albumin (seroalbúmina bovina)

CaMV35S: Cauliflower Mosaic Virus 35S (promotor 35S del virus del mosaico del coliflor)

°C: grados Celsius

ch5B: gen de quitinasa de *Phaseolus vulgaris*

CIGB: Centro de Investigaciones Genéticas y Biotecnológicas de Cuba

cm, m, μm , mm, nm: centímetros, metros, micrómetros, milímetros, nanómetros

CONICET: Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas

CTAB: Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide (bromuro de cetiltrimetilamonio)

dNTP: deoxinucleótido trifosfato

DO: densidad óptica

EDTA: Sal disódica del ácido etilen diamino tetraacético

EEA: Estación experimental agropecuaria

etc.: etcétera

EUA: Estados Unidos de América

g, kg, μg , mg, ng: gramos, kilogramos, microgramos, miligramos, nanogramos

g: fuerza de gravedad.

GA₃: ácido giberélico

GFP: green fluorescent protein (proteína verde fluorescente)

gln2: gen de glucanasa de *Nicotiana tabacum*

GUS: gen de la enzima β -glucuronidasa

h: horas

ha: hectáreas

Hz: hertz

INTA: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria.

J: joules

kan: antibiótico kanamicina

kb: kilobases

L, μ L, mL: litros, microlitros, mililitros

LB: Luria Bertani

M, μ M, mM: molar, micromolar, milimolar

MES: 4-morpholineethanesulfonic acid (ácido 4-morfolinoetanosulfónico)

μ F: microfaradios

min: minutos

MMA: Medio mínimo A

MPa: megapascales

MS: medio Murashige Skoog

MS1/2: medio MS con la mitad de la concentración de sales

MUG: 4-metilumbeliferil- β -D-glucurónido

n^o: número

nos: promotor de la nopalina sintasa

nptII: gen de la neomicina fosfotransferasa II

Ω : ohms

Ω TMV: enhancer Ω del TMV

ON: overnight

p: valor p o probabilidad de rechazar incorrectamente la hipótesis nula en una prueba estadística.

pb: pares de bases

PCR: polymerase chain reaction (reacción en cadena de la polimerasa)

PPC: pea plastocyanin (plastocianina de arveja)

PPM: Plant Preservative Mixture, nombre comercial de la mezcla de 5-cloro-2-metil-3(2H)-isotiazolona y 2-metil-3(2H)-isotiazolona.

PR: proteína de resistencia

psi: pounds per square inch (libras por pulgada cuadrada)

PVP: polivinilpirrolidona

RA: medio de enraizamiento

rbcS1: subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de crisantemo

Re: medio de regeneración

RIP: ribosome inactivation protein (proteína de inactivación del ribosoma)

rpm: revoluciones por minuto

s: segundos

SDS: sodium dodecyl sulfate (dodecilsulfato sódico)

SSC: saline-sodium citrate (citrato de sodio salino)

ssp: subespecie

SuMV: Sunflower Mosaic Virus (virus del mosaico del girasol).

TAE: Tris-acetato EDTA

Taq DNA polimerasa: ADN polimerasa de *Thermus aquaticus*

TE: Tris EDTA

TEV: Tobacco Etch Virus

TMV: Tobacco Mosaic Virus (virus del mosaico de tabaco)

U: unidad, unidades

UV: ultravioleta

V: volts

X-Gluc: ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico

2X35S o e35S: promotor con una duplicación del enhancer del promotor CaMV35S

Introducción

1. Introducción

1.1. Familia Asteraceae

La familia Asteraceae (Compositae) es la más grande y diversificada dentro de las Angiospermas (Heywood, 1978; Funk y col., 2005) e incluye al 10 % de todas las especies con flor conocidas. Las plantas dentro de esta familia se caracterizan por la presencia de numerosas inflorescencias agrupadas que presentan el aspecto de una única flor “compuesta”. Está dividida en tres subfamilias mayores y una subfamilia menor, siendo la lechuga, el girasol y el cártamo los representantes agrónomicamente importantes de las subfamilias mayores. Otra característica destacable es que presentan una gran biodiversidad abarcando los ambientes más extremos del planeta y no solo en las zonas comprendidas entre los trópicos, como ocurre en el resto de las Angiospermas. Con excepción de la Antártida, se encuentran representantes de esta familia en todos los ambientes y continentes (Funk y col., 2005).

Tabla 1. Especies asteráceas con importancia económica

| Nombre común | Género y especie | Importancia económica |
|----------------------|---|-------------------------------|
| Lechuga | <i>Lactuca sativa</i> L. | Alimento |
| Girasol | <i>Helianthus annuus</i> L. | Aceite, alimento y ornamental |
| Cártamo | <i>Carthamus tinctorius</i> L. | Aceite, alimento y ornamental |
| Endibia | <i>Cichorium endivia</i> L. | Alimento |
| Achicoria | <i>Cichorium intybus</i> L. | Alimento |
| Alcaucil | <i>Cynara scolymus</i> L. | Alimento |
| Topinambur | <i>Helianthus tuberosus</i> L. | Alimento |
| Yerba dulce o Stevia | <i>Stevia rebaudiana</i> | Alimento |
| Caléndula | <i>Calendula officinalis</i> L. | Aceite, hierba y ornamental |
| Guayule | <i>Parthenium argentatum</i> L. | Látex hipoalergénico |
| Piretro | <i>Chrysanthemum cinerariifolium</i> L. | Pesticida y ornamental |
| Echinacea | <i>Echinacea</i> spp. | Medicinal y ornamental |
| Gerberas | <i>Gerbera</i> spp. | Ornamental |
| Copetes | <i>Tagetes</i> spp. | Ornamental |
| Cosmos | <i>Cosmos</i> spp. | Ornamental |
| Crisantemos | <i>Chrysanthemum</i> spp. | Ornamental |
| Zinnias | <i>Zinnia</i> spp. | Ornamental |
| Margarita | <i>Bellis perennis</i> L. | Ornamental y hierba |
| Artemisias | <i>Artemisia</i> spp. | Ornamental y hierba |
| Estragón | <i>Artemisia dracunculoides</i> L. | Hierba |
| Manzanilla | <i>Anthemis nobilis</i> L. | Hierba |
| Diente de León | <i>Taraxacum officinale</i> L. | Alimento y maleza |
| Senecio | <i>Senecio</i> spp. | Maleza |

Más de 40 especies económicamente importantes han sido domesticadas dentro de esta familia (ejemplos de estas especies se detallan en la tabla 1) (Kesseli y Michelmore, 1997). Estas incluyen cultivos alimenticios (lechuga, achicoria, topinambur), aceiteros (girasol,

cártamo), medicinales (Echinacea, manzanilla) y muchos ornamentales (crisantemo, dalia, zinnia y copete) como también muchos cultivos semidomesticados.

Por todas las características descriptas en esta familia, se realizó un importante número de investigaciones en sistemática y evolución. Por el contrario, esta familia se encuentra relegada con respecto a otras en lo que se refiere a la caracterización molecular y a la utilización o explotación de nuevas tecnologías (Kesseli y Michelmore, 1997).

1.2. Girasol

1.2.1. Especie

El girasol, *Helianthus annuus* L., comprende 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.

Su centro de origen es América del Norte, y su antecesor silvestre es una especie diploide ($2n = 2x = 34$) perteneciente a la subtribu *Helianthinae*, subfamilia *Asteroideae* y familia *Asteraceae* (Seiler, 1997), siendo el centro de diversidad de dicha especie también América del Norte.

Es una especie alógama y autoincompatible, cuya domesticación ha permitido la autocompatibilidad y un aumento en el tamaño y en el vigor de la semilla. Esto hace que el girasol cultivado tenga varias características que facilitan el desarrollo de germoplasma autopolinizable, favoreciendo los programas de mejoramiento como el desarrollo de híbridos. El girasol cultivado puede ser cruzado sin dificultad, tiene una alta producción de semillas (aproximadamente 1.000 semillas/planta) y un tiempo generacional corto de 70 a 100 días.

El girasol es sinónimo de aceite en primer lugar y de proteína en segundo lugar. Su aceite ha sido por años de tipo "linoleico", sin embargo por razones vinculadas al cuidado de la salud y a la demanda de características especiales para usos industriales, se impulsó el desarrollo del girasol medio oleico y alto oleico.

1.2.2. El girasol en Argentina

Las primeras referencias sobre el girasol en la República Argentina se remontan al siglo XIX, cuando los colonos de origen hebreo afincados en las provincias de Entre Ríos, Santa Fe y

Buenos Aires realizaron las primeras introducciones de semilla para su propio consumo. A partir del año 1900 su difusión como cultivo, comenzó en forma casi simultánea, en la Colonia Mauricio, partido de Carlos Casares, en el oeste de la provincia de Buenos Aires y en Basavilbaso, provincia de Entre Ríos, por agricultores inmigrantes.

En la República Argentina, el cultivo se extiende entre los 24 y 38 grados de longitud sur, abarcando una amplia gama de ambientes, que involucra a una extensa región donde el girasol constituye una alternativa importante para los productores, como puede observarse en los mapas de la figura 1.

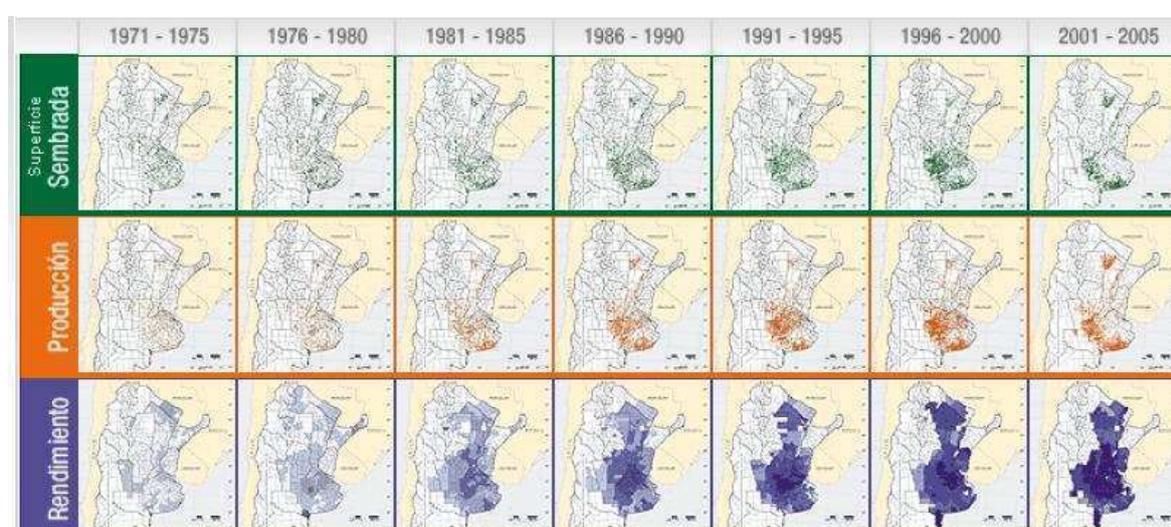


Figura 1: Mapas de la República Argentina donde se representan, de arriba hacia abajo, la superficie sembrada, la producción y el rendimiento del cultivo de girasol entre los años 1971-2005. (Fuente: La Argentina en mapas, CONICET)

1.2.3. Importancia económica

1.2.3.1. Mercado internacional

La producción mundial de girasol (que oscila en torno a las 27/30 millones de toneladas) tiene cuatro principales protagonistas: la Federación Rusa, que habitualmente aporta unas 6,5 millones de toneladas, la Unión Europea, con 4,8 a 6,5 millones, Ucrania, con 4,2 a 5,3 millones de toneladas, y el único país relevante en el hemisferio sur, la Argentina, con 3,5 a 4,5 millones de toneladas.

El principal producto de la molienda de girasol, y que contribuye casi exclusivamente a la formación de su precio, es el aceite. El resto, fundamentalmente harina de proteína vegetal, se vende como insumo forrajero para la producción de carnes y leche.

En el mercado mundial de aceites, el de girasol es el cuarto en orden de importancia. En las campañas que van desde los años 2003/2004 a 2007/2008 (consideradas para el Hemisferio Norte), el aceite de girasol participó con 8/9 % de la oferta mundial. Así, este producto compite en el segmento de aceites de mejor calidad junto con el de canola.

Usualmente la Argentina es el primer exportador mundial de aceite y harina de girasol. En la campaña 2007/2008, nuestro país vendió 1,45 millones de toneladas de aceite (41,4 % del total de la producción). Junto a sus otros dos competidores (Ucrania con el 33,4 % y la Federación Rusa con el 12 %) suman el 87 % de la oferta total. Las campañas 2008/2009 y 2009/2010 no se tuvieron en cuenta debido a la sequía sufrida en la Argentina, por lo que los datos no son representativos.

Algo similar ha ocurrido en las ventas de harina de girasol en las que nuestro país ha aportado el 37,7 % al mercado mundial con 1,33 millones de toneladas. Ucrania, con el 33,5 % y la Federación Rusa, con el 18 %, son también nuestros principales competidores en este subproducto.

El mercado de exportación de la semilla (1,5 millones de toneladas) no está tan concentrado como el de los subproductos. La Argentina aporta menos de 200.000 toneladas, que representan la mitad de la oferta del principal exportador que es la Unión Europea (integrada hoy por 27 naciones).

1.2.3.2. La producción de girasol en la Argentina

Si se estudian las campañas que van desde la de 1998/1999 hasta la de 2007/2008, pueden distinguirse dos etapas muy claras (sin considerar las últimas dos campañas como se aclaró en el ítem anterior):

- a) Hasta la campaña 1999/2000;
- b) las ocho campañas restantes.

En la primera etapa, hubo un fuerte entusiasmo por el cultivo, que se reflejó en un récord de 4,24 millones de hectáreas y una producción de 7,1 millones de toneladas en la campaña 1998/1999. El rinde fue muy bueno en la comparación histórica (1.762 kg/ha). En la campaña siguiente, se produjeron más de 6 millones de toneladas. Ambas ofertas fueron volcadas a un mercado mundial fuertemente debilitado en materia de precios, a raíz de la irrupción de la oferta del aceite de palma (cultivo perenne, muy significativo en Asia, cuya producción entró al mercado masivamente hacia fines de la década de los '90). Por esta razón, se vieron precios inusitadamente bajos para los aceites, lo que condujo a la etapa siguiente.

b) Esta etapa se inicia con una abrupta caída del área de siembra en nuestro país como consecuencia del quebranto económico inducido por los magros precios internacionales. La superficie cayó 45 % en 2000-01 y la producción apenas llegó a 3,18 millones de toneladas. Desde entonces, ha habido una recuperación gradual en el área sembrada, que alcanzó las 2,7 millones de hectáreas en 2007/2008 (36,6 % más que el valor piso), con una producción que creció 41,9 %, hasta las 4,51 millones de toneladas.

La traslación del cultivo hacia zonas con mayor riesgo agroecológico y tierras de menor calidad y aptitud se observa claramente en los mapas de superficie sembrada y de producción (en color verde y naranja, respectivamente) de la figura 1. Como contraparte, se incorporaron importantes cambios tecnológicos que produjeron rendimientos cada vez mejores (indicados en la figura 1 en color violeta), evitando así que los rendimientos a nivel país no hayan experimentado bajas significativas. En la campaña 2007/2008 se obtuvieron 1.710 kg/ha a nivel país, mientras que en los últimos ocho años, el rango osciló entre 1.502 kg/ha y 1.904 kg/ha.

La participación de las distintas provincias en el área sembrada indica que la reasignación de tierras ha sido por demás significativa, tal como se mencionó en párrafos anteriores y se desprende del mapa de superficie sembrada (figura 1, color verde), comparando los períodos 1986/90 y 2001/05. En la provincia de Buenos Aires, entre 2000/01 y 2006/07, el área ha aumentado un 23 %. La segunda provincia en importancia a comienzos de la década del '00 fue Córdoba, que ha visto reducida la superficie en un 68 %, mientras que La Pampa, tercera provincia productora, la ha incrementado en un 30,5 %. El Chaco y Santa Fe fueron las que mayor aporte han hecho al crecimiento de la superficie de siembra. La primera ha pasado de 140.000 a 352.000 hectáreas (152 % de aumento) y la segunda, de 117.000 a 193.000 (un 64 % más) (Asociación Argentina de Girasol, 2008).

1.3. Mejoramiento vegetal y biotecnología

La manipulación genética de las plantas es una práctica tan antigua como la propia agricultura. Desde sus comienzos, el hombre ha intentado modificar las plantas que utiliza para dotarlas de características más ventajosas. Así, han ido surgiendo primero de forma intuitiva y posteriormente con técnicas de mayor complejidad lo que se denomina mejora genética. Estas características están definidas por el genotipo, el conjunto de genes de un individuo, y por lo tanto, éste es el que se va modificando con la aplicación de estas técnicas.

En muchas ocasiones en la especie a mejorar no existe el gen que le confiera el carácter de interés, encontrándose en cambio en otras especies. En este caso se realizan cruzamientos interespecíficos, para incorporar al genoma de la especie que estamos mejorando, el gen perteneciente a otra especie que generalmente es silvestre y es considerada como donante. De este modo el número de genes transferidos entre especies ha ido aumentando con el tiempo. Sin embargo, estas técnicas de mejoramiento tradicional consumen mucho tiempo y por lo general, quedan también incorporados al genoma de la especie cultivada otros genes de poco interés agronómico provenientes de la especie donante.

Actualmente, se dispone de una tecnología que permite la introducción de genes de una forma controlada, más eficaz y rápida, que los procedimientos tradicionales de cruzamientos: la transformación genética. En este caso, el gen introducido puede pertenecer a cualquier especie, no existiendo por lo tanto la limitación de compatibilidad sexual y posibilitando la introducción de genes de bacterias, animales o plantas. En consecuencia, una planta transgénica es aquella que posee uno o varios genes introducidos por técnicas de transformación.

Existen distintos métodos para la obtención de plantas transgénicas, siendo la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y la técnica de biolística los dos más usados, aunque en todos los casos, las técnicas de transformación deben combinarse con el cultivo de tejidos (Vasil, 2008).

1.4. Cultivo de tejidos

Las células vegetales, a diferencia de lo que ocurre con las células animales, mantienen en los tejidos diferenciados la totipotencia, es decir la capacidad de regenerar plantas completas a partir de una única célula. Así, las células vegetales crecidas en condiciones asépticas, sobre medios de cultivo adicionados con reguladores del crecimiento, también llamados hormonas vegetales, pueden dividirse dando dos tipos de respuesta:

- i) una desdiferenciación celular acompañada de crecimiento tumoral, que da lugar a una masa de células denominada callo, la cual en condiciones adecuadas es capaz de generar órganos o embriones somáticos,
- ii) una respuesta morfogénica por la cual se forman directamente órganos (organogénesis) o embriones (embriones somáticos).

La primera respuesta se conoce como organogénesis o embriogénesis indirecta (mediada por un estado de callo), mientras que la segunda se considera organogénesis o embriogénesis directa. Cuando el órgano originado es un brote, el proceso se denomina caulogénesis (directa o indirecta), como ocurre en el caso de girasol.

1.5. Cultivo de tejidos y transformación en especies asteráceas

El estudio y aplicación de técnicas biotecnológicas relacionadas al cultivo *in vitro* y la transformación en especies de la familia de las asteráceas ha sido desarrollado casi exclusivamente en crisantemo y lechuga, constituyendo estas especies modelos de exploración para otras especies de la familia, como el girasol.

En el caso del crisantemo, los importantes avances que se realizaron sobre diferentes aspectos biotecnológicos, en numerosos laboratorios de investigación, no se pueden evidenciar en la industria o a nivel comercial. A diferencia de lo que ocurre con otras especies ornamentales, no se usa la micropropagación *in vitro* vía embriones somáticos o la regeneración de brotes para la producción a gran escala. Tampoco se conocen variedades generadas a partir de híbridos somáticos, ni se utiliza la criopreservación para el mantenimiento de las variedades existentes ni existen variedades transgénicas disponibles en el mercado (revisión de Visser y col., 2007).

Por el contrario, la lechuga (*Lactuca sativa*) así como varias especies relacionadas, son “amigables” al cultivo de tejido y existen sistemas de regeneración de brotes eficientes a partir de tejidos, órganos, células y protoplastos. Se obtuvieron plantas de lechuga por variación somaclonal tanto a partir de callos como de protoplastos. Este fue uno de los primeros casos publicados de obtención de una planta transgénica por electroporación de protoplastos donde se incorporó el gen de la cloranfenicol acetiltransferasa (*cat*) bajo la regulación del promotor CaMV35S (Cauliflower Mosaic Virus 35S, sigla en inglés de 35S del virus del mosaico del coliflor) (revisión de Davey y col., 2007).

Investigadores de EUA, que trabajan en distintos aspectos de la familia de las asteráceas (o compuestas) y que participan de una iniciativa internacional en curso denominada *Compositae Genome Project*, realizaron un encuentro en el año 2006, en el que participaron los grupos argentinos que trabajan en girasol, y cuyas conclusiones se escribieron en el *Meeting White Paper*. En este documento se afirma, entre otras cosas, que la transformación genética mediada por *Agrobacterium*, actualmente se realiza de forma rutinaria para lechuga pero no

ocurre lo mismo en el caso del girasol, proponiéndose esta especie vegetal como sistema modelo de transformación de la familia Asteraceae.

1.6. Cultivo de tejidos y transformación genética en girasol

1.6.1. Cultivo de tejidos

Actualmente, el mejoramiento por técnicas biotecnológicas del girasol se encuentra reducido a la utilización de marcadores, siendo uno de los pocos granos de importancia mundial, que no cuenta con variedades transgénicas en el mercado, fundamentalmente debido a la ausencia de un protocolo de transformación eficiente. Este tipo de protocolo para el mejoramiento de especies mediado por técnicas de ingeniería genética, requiere de un sistema de cultivo *in vitro* capaz de producir un número importante de individuos transformados y que sea además reproducible y confiable. Según Alibert y col. (1994) la aplicación de métodos biotecnológicos para obtener mejores variedades de girasol, se encuentra limitada principalmente por la dificultad de regenerar plantas *in vitro*, en forma eficiente y reproducible.

En los últimos 25 años, se han intentado desarrollar distintos métodos de regeneración para esta especie, por medio de organogénesis y/o embriogénesis somática. Las rutas indirectas, pasando por la formación intermedia de callo, no son recomendadas para el girasol, pues en raros casos se han logrado regenerar embriones o brotes viables (Greco y col., 1984; Paterson y Everett, 1985; Wilcox McCann y col., 1988). La regeneración mediada por organogénesis se ha obtenido a partir de meristemas apicales o ejes embrionarios (Lupi y col., 1987; Knittel y col., 1994; Molinier y col., 2002), embriones inmaduros (Power, 1987; Bronner y col., 1994; Jeannin y col., 1995), cotiledones de semillas maduras (Chraibi y col., 1991; Knittel y col., 1991; Ceriani y col., 1992; Chraibi y col., 1992; Deglene y col., 1997; Baker y col., 1999; Berrios y col., 1999a; Berrios y col., 1999b; Dhaka y Kothari, 2002; Mayor y col., 2003), hojas (Konov y col., 1998) y protoplastos (Burrus y col., 1991; Krasnyanski y Menczel, 1993), mientras que la embriogénesis somática ha sido obtenida mayoritariamente a partir de embriones cigóticos inmaduros (Finer, 1987; Freyssinet y Freyssinet, 1988; Witzrens y col., 1988; Jeannin y Hahne, 1991; Bronner y col., 1994; Jeannin y col., 1995; Sujatha y Prabakaran, 2001).

En el grupo de transformación genética de girasol perteneciente al Instituto de Biotecnología del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) Castelar, se cuenta con un protocolo de cultivo *in vitro*, reproducible y exitoso, donde particularmente se lograron óptimas condiciones en el enraizamiento y pasaje a invernáculo/rusticación (Parody, 2003). Se debe destacar que todas las publicaciones sobre girasol, que se mencionan en los párrafos precedentes, realizaron el pasaje a invernáculo únicamente por injertos, proceso extremadamente laborioso y de relativo éxito.

1.6.2. Transformación genética en girasol

En general, los protocolos de transformación genética de girasol publicados hasta la actualidad, sufren de una baja eficiencia de transformación y no poseen métodos eficientes de selección, resultando en un alto porcentaje de escapes (Bidney y col., 1992; Knittel y col., 1994; Malone-Schoneberg y col., 1994; Burrus y col., 1996). Los pasos críticos en los protocolos de transformación son la transferencia del ADN-T a la mayor cantidad posible de células y que éstas sean capaces de regenerar y dar una plántula. En el caso de girasol, la eficiencia de inducción de embriones adventicios es baja, debido a que el proceso de regeneración es directo sin pasar por una fase de callo. Por esta razón en la mayoría de los protocolos se realizan varios tratamientos a los explantos, para estimular la virulencia de los genes *vir* de *Agrobacterium*: agregado de compuestos fenólicos como la acetosiringona, herir los tejidos bombardeando con partículas desnudas (Bidney y col., 1992), con bolitas de vidrio (Grayburn y Vick, 1995), macerándolos con enzimas (Alibert y col., 1999), aplicando sonicación (Weber y col., 2003) e incluso deshidratando los explantos antes del cocultivo (Hewezi y col., 2002). Sin embargo, en todos los casos la eficiencia permanece baja o directamente no se detecta la actividad del gen reportero de la β -glucuronidasa en los brotes recuperados. Burrus y col. (1996) observaron que las células transformadas muchas veces no eran las que regeneraban y que los brotes transgénicos correspondían a eventos afortunados donde la célula que regeneraba había sido transformada.

La regeneración es frecuentemente de origen multicelular, por lo que las plantas que se obtienen suelen ser quimeras, pudiendo la región transformada producir o no descendencia (Schrammeijer y col., 1990). Para aumentar el nivel de regeneración de los explantos, se ha realizado cotransformación con el gen *ipt* (isopentenil transferasa) involucrado en la síntesis de citoquininas (Molinier y col., 2002) que promueven la división celular.

Debido a los problemas descritos en el párrafo anterior, existen numerosos trabajos que tratan de transformar otro tipo de explantos no meristemáticos, como por ejemplo, los hipocótilos (Müller y col., 2001). Sin embargo las eficiencias continúan siendo bajas y se producen escapes.

El protocolo más utilizado en la bibliografía, sigue básicamente el esquema descrito por Molinier y col. (1996) que, en rasgos generales consta de las siguientes etapas:

1. Imbibición de semillas maduras.
2. Escisión de embriones.
3. Cocultivo con *Agrobacterium*.
4. Inducción de brotes.
5. Recuperación de brotes transformados.
6. Selección en kanamicina.
7. Elongación de los brotes.
8. Injerto, pasaje a invernáculo y aclimatación.

1.6.3. Selección de brotes transgénicos

Durante la regeneración de las plantas transformadas, se debe evitar que prosperen aquellas células o tejidos no transformados, ya que las eficiencias de transformación rondan valores muy bajos, entre 0,01 y 5 %. Por esta razón, se introduce junto con el gen de interés un gen al que se denomina de selección, que proporciona a la célula transformada la posibilidad de sobrevivir y regenerar en presencia del agente selectivo, que suele ser un antibiótico (kanamicina, gentamicina, etc.) o un herbicida (higromicina, glufosinato, etc.), mientras que las células no transformadas mueren o son incapaces de prosperar. Así, la correcta elección de un gen de selección determina la posibilidad o no de éxito en la producción de plantas transgénicas.

Esto es muy importante en el caso del girasol ya que la regeneración *in vitro* de las plántulas (T0) es vía organogénesis, produciendo quimeras.

Durante los años 2003 al 2005, se realizó un trabajo exhaustivo para establecer el marcador selectivo adecuado. Para esto se trabajó con dos agentes selectivos: el herbicida glufosinato de amonio y el antibiótico kanamicina. A pesar de los numerosos ensayos realizados utilizando el herbicida glufosinato de amonio, en distintos momentos y distintas concentraciones, no se logró encontrar un criterio que permitiera su utilización como agente selectivo. En lo referente a la utilización del antibiótico kanamicina, se obtuvo una eficiencia del 0,7 % (nº de brotes

enraizados/nº de brotes tratados para agroinfección totales, al final del período de cultivo de tejido) donde la selección se realiza por la formación de raíces in vitro en presencia del antibiótico, y la presencia del transgén es confirmada por técnicas de biología molecular. Asimismo, se demostró que la coloración de los tejidos no puede ser utilizada como criterio de selección, ya que plántulas no transformadas presentan hojas completamente verdes y de aspecto saludable en presencia del antibiótico. Estos resultados fueron el producto del desarrollo de una tesis de licenciatura (Radonic, 2005) y fueron plasmados en una publicación en una revista internacional con referato (Radonic y col., 2006). Hasta el momento de la escritura de esta tesis doctoral no se obtuvieron escapes a este criterio de selección.

1.7. Incidencia de las enfermedades fúngicas en girasol

Se describen al menos treinta enfermedades que afectan al girasol salvaje o cultivado, causadas por varios hongos, bacterias y virus, pero solamente algunas son de importancia como causantes de pérdidas en la producción (Bradley y col., 2007). Estas pérdidas tuvieron un récord en los años '90 estimado en 642 millones de dólares en todo el mundo (Hesley, 1999). En la Argentina las enfermedades de mayor repercusión económica son provocadas por hongos, aunque en la región pampeana se registran tres enfermedades virales y otras causadas por dos bacterias fitopatógenas, cuyas incidencias difieren en las campañas girasoleras.

Entre las enfermedades producidas por hongos, la producida por *Verticillium dahliae* (verticilosis u hoja abigarrada) provoca el secado anticipado y posible quebrado del tallo. Es la enfermedad más importante y ocurre en áreas donde el girasol se cultiva por varios años consecutivos usando cultivares susceptibles y fundamentalmente debido a la presencia e incremento de las estructuras del parásito en el suelo. Otro hongo que provoca secado anticipado es *Macrophomina phaseolina* (podredumbre carbonosa de la base del tallo), cuya severidad se incrementa en lotes con deficiencia hídrica, insuficientes en fertilidad y piso arado. La roya negra (*Puccinia helianthi*), es uno de los parásitos obligados que afecta lotes de girasol confitero y lotes de siembra tardía de girasol aceitero. Para controlarlo se utilizan fungicidas de la familia de los triazoles. Dentro de los oomicetes están presentes la roya blanca (*Albugo tragopogonis*) que provoca dos tipos de síntomas, agalla en las hojas por el ciclo asexual y necrosis en la inserción de los pecíolos por el estadio sexual. Otro oomicete que produce importantes ataques en el cultivo es el Mildiu (downy mildew, *Plasmopara*

halstedii), cuyas oosporas en el suelo generan infecciones primarias que se manejan con fungicida curasemilla o cultivares resistentes. Dos hongos afectan al capítulo, el más importante debido su impacto en la producción, es el de la podredumbre húmeda (*Sclerotinia sclerotiorum*), cuya acumulación de esclerocios en el suelo y el monocultivo incrementan la severidad en el área. El otro patógeno del capítulo, del género *Rhizopus*, provoca problemas de cosecha en lotes con daños por granizo y tiempo muy húmedo a la madurez. Los géneros *Septoria*, *Alternaria* y *Phoma* provocan manchas en hojas, tallos y pecíolos, e integran el complejo de peste negra que conduce al secado anticipado (Pérez Fernández, 2002).

1.7.1. Enfoques clásicos para el control de enfermedades fúngicas

El control de enfermedades fúngicas se realiza mediante el empleo de fungistáticos químicos, que funcionan sólo como "protectores" y no como "curativos". Esta es una técnica extremadamente costosa, que además puede conducir a resultados catastróficos desde el punto de vista ecológico poniendo en serio riesgo la salud de los operarios que realizan las tareas. Por otra parte, el control químico resulta en ocasiones ineficaz debido a la ocurrencia de lluvias no previstas y a la aparición del fenómeno de fungoresistencia, lo que demanda aplicaciones adicionales y cambios constantes del tipo de fungicida a aplicar (Vigliola, 1986). De ahí que la obtención de variedades resistentes constituye la vía más eficiente y económica de protección fitosanitaria de los cultivos.

1.7.2. Protección ante el ataque de patógenos fúngicos por métodos biotecnológicos

La estrategia de expresar genes de resistencia a patógenos por medio de la ingeniería genética, en los cultivares de aceptación comercial de diversas especies, ha resultado muy efectiva y deseable. En casos experimentales se lograron altos niveles de resistencia a patógenos bacterianos y fúngicos, expresando los genes de resistencia *pto* y *xa21* en tomate y arroz, respectivamente. Sin embargo, la resistencia conferida por estos genes es específica para patógenos particulares (*Pseudomonas tomatatae*, *Xanthomonas oryzae*) y en algunos casos, para un limitado grupo de patovares.

La resistencia total a un patógeno, puede proveer la oportunidad para otros hongos de emerger como patógenos de ese cultivar. Dado que las plantas están expuestas a un amplio e impredecible espectro de patógenos en la naturaleza, es ventajoso desplegar una variedad de

estrategias de defensa, del mismo modo en que las plantas han evolucionado en sus mecanismos de protección contra patógenos. En el caso de las plantas transgénicas que expresan proteínas PR (proteínas de resistencia), éstas actúan reforzando las respuestas de defensa inducibles en la planta, y además se localizan en zonas de los tejidos donde son más efectivas contra patógenos invasores, como por ejemplo, el espacio extracelular (Datta y col., 1999).

Los genes que codifican para quitinasas y β -1,3-glucanasas, fueron los primeros en ser introducidos en vegetales por ingeniería genética para defensa contra patógenos. En 1991, se reveló 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 (Brogie y col., 1991).

Desde entonces, han aparecido numerosas publicaciones de plantas transgénicas con mayores niveles de resistencia al ataque de hongos y bacterias patógenas. Estos resultados se obtuvieron mediante la expresión constitutiva o inducible de genes vegetales que codifican proteínas de defensa como quitinasa por ejemplo en trigo, mostrando resistencia a *Fusarium* (Shin y col., 2008); β -1,3-glucanasa en transgénicas de arroz que muestran resistencia a *Magnaporthe grisea* (Nishizawa y col., 2003), proteína inactivadora de ribosomas de hongos (RIP, sigla en inglés de ribosome inactivation protein), proteínas tipo taumatina (ap24), tioninas y enzimas involucradas en las síntesis de fitoalexinas, entre otras.

Se ha demostrado que existe un efecto sinérgico de estas proteínas en la generación de la resistencia. En 1994, Zhu y colaboradores informaron que la coexpresión constitutiva de los genes de β -1,3-glucanasa y de quitinasa en plantas de tabaco determina un considerable incremento de resistencia frente a infecciones de *Cercospora nicotianae*. En 1995, Jach y colaboradores desarrollaron plantas transgénicas dobles con combinaciones de los siguientes genes: una glucanasa clase II de cebada, una quitinasa clase II de cebada y una RIP clase I de cebada, observando que la presencia de dos genes aumenta el porcentaje de resistencia de plantas de tabaco frente a *Rhizoctonia solani*. En estas plantas se estableció una clara correlación entre el nivel de acumulación de las proteínas antifúngicas y el nivel de protección. Hasta este momento, la bibliografía presenta numerosos ejemplos de este abordaje, como la obtención de plantas transgénicas de arroz resistentes también a *Rhizoctonia solani* (Sridevi y col., 2008). Sin embargo, para obtener plantas con múltiples resistencias a patógenos, es necesaria la expresión coordinada de un grupo de genes. Por esto, es necesario contar con una tecnología capaz de producir plantas múltiples transgénicas de

una manera eficiente. Uno de los inconvenientes que se presentan al intentar expresar varios transgenes simultáneamente, es que los niveles de expresión de cada uno de los genes son altamente variables y dependen de varios factores, entre los que se incluyen: el número de integraciones de cada transgén (van der Hoeven y col., 1994), el sitio de integración dentro del genoma (An, 1986) y el silenciamiento génico (Finnegan y Mc Elroy, 1994).

Se han descrito varios tipos de silenciamiento génico que pueden clasificarse dentro de dos categorías; el silenciamiento transcripcional y el silenciamiento postranscripcional. El primero está asociado a la redundancia de secuencias regulatorias, mientras que el segundo se asocia con redundancia de secuencias codificantes (Vaucheret y col., 1998; Chandler y Vaucheret, 2001). Datos recientes sugieren que ambas categorías son en realidad parte de un mismo sistema ya que comparten varios de los genes necesarios para generar los efectos citados. Los eventos iniciales que disparan estos mecanismos serían los que le otorgarían las características individuales a cada una de las diferentes vías (Vaucheret y Fagard, 2001; Vazquez Rovere y col., 2002).

Se han desarrollado varias técnicas alternativas para obtener plantas transgénicas para múltiples genes, entre ellas:

1. Cotransformación utilizando 2 ó 3 cepas de *Agrobacterium tumefaciens* a la vez, conteniendo individualmente los genes a incorporar. Sus ventajas son: la baja complejidad de la realización de las construcciones (promotor-gen-terminador) y la rapidez del método para incorporar varias construcciones a la vez. Entre las desventajas, se encuentra la baja frecuencia de cotransformación y la necesidad de confirmar la presencia de cada construcción utilizada en las plantas obtenidas.
2. Retransformación de una planta transgénica (para una única construcción), con construcciones subsiguientes para agregar paulatinamente los genes de interés. Posee una alta eficiencia y la realización de la construcción es simple, al igual que la descrita anteriormente. Sin embargo, es un método extremadamente lento ya que primero se transforma, luego se caracterizan las putativas plantas transgénicas para elegir la línea candidata (la que posea la mejor expresión del transgén) para recién luego transformar con la segunda construcción.
3. Uso de vectores que permitan introducir varios genes en un solo evento de transformación. Posee varias ventajas como: producir plantas múltiples transgénicas minimizando los inconvenientes de silenciamiento por repetición de secuencias regulatorias, simpleza en la confirmación de la presencia de la construcción (ya que sólo se necesita confirmar la presencia de un solo transgén) y alta eficiencia de transformación.

Otra variable utilizada para aumentar la protección mediada por transgenes antifúngicos es la localización de las proteínas transgénicas en distintos compartimientos subcelulares. Existen trabajos donde se ha demostrado que la utilización de péptidos señales, capaces de direccionar proteínas reporteras, fusionados a transgenes antifúngicos lograron conferir mayor protección (Jach y col., 1995; Asurmendi, 2002).

1.8. Promotores en plantas

1.8.1. Descripción y tipo de promotores.

La elección y utilización de un promotor adecuado es determinante del éxito que se logre en la aplicación de técnicas de ingeniería genética para el mejoramiento vegetal. La selección del promotor dependerá, entre otros factores, del objetivo perseguido o buscado, tal como una expresión constitutiva, en un determinado momento del desarrollo o tejido específica. Los promotores afectan la expresión tanto cuantitativa como cualitativa (en distintas etapas del desarrollo y diferentes tejidos) del gen cuya expresión están regulando. En la actualidad se han aislado numerosos promotores de una gran variedad de organismos, tanto vegetales como bacterianos o virales. Los efectos de la estructura molecular y/o secuencia de los promotores en el mecanismo de regulación de la transcripción, están siendo estudiados intensivamente.

Es un hecho conocido, como ya se describió en párrafos anteriores, que el uso repetido del mismo promotor en una misma construcción, frecuentemente produce silenciamiento génico. Como las estrategias actuales buscan introducir numerosos genes de interés agronómico en un mismo evento de transformación, se puede evitar el problema del silenciamiento, utilizando diferentes promotores para regular la expresión de cada uno de los distintos genes que se desea introducir (Chandler y Vaucheret, 2001). Este aspecto constituye una razón muy poderosa, para que una rama importante de la investigación en biotecnología molecular esté orientada a la búsqueda de nuevos promotores.

Todos los promotores poseen diversas características funcionales y estructurales, y frecuentemente tienen diferentes niveles de actividad y patrones de expresión. Se cree que esto se debe a variaciones en el fondo genético del huésped y a la interacción de los promotores con factores aún no caracterizados (Miao y col., 1991; Ito y col., 2000). Es por ello que en una primera etapa, debe analizarse su accionar sobre genes reporteros en el fondo genético adecuado, antes de ser elegido para una estrategia de mejoramiento. Así, el promotor

ract1, que ha sido descrito como un promotor fuerte en arroz y otras monocotiledóneas, no es efectivo en plantas de tabaco (Kang y col., 2003), demostrando que para mejorar la eficiencia de expresión de los transgenes es vital conocer más sobre la función de cada promotor en la especie vegetal que se desea transformar.

1.8.1.1. Promotores constitutivos

Son varios los promotores bien caracterizados y estudiados que están siendo utilizados en la ingeniería genética de plantas, especialmente a nivel de investigación básica. No obstante en la actualidad, son pocos los promotores utilizados para producir plantas transgénicas en forma extensiva, siendo el más ampliamente usado el promotor constitutivo CaMV35S que generalmente confiere niveles altos de expresión génica tanto en especies dicotiledóneas (Benfey y Chua, 1990) como en monocotiledóneas (Mitsuhara y col., 1996). Sin embargo, se ha demostrado que los promotores virales podrían conferir características no deseadas, como aumentar los niveles de recombinación (Kohli y col., 1999) y silenciar los transgenes (Al-Kaff y col., 2000). Otros promotores constitutivos, que se utilizan en numerosos vectores de transformación, fueron aislados de *Agrobacterium tumefaciens*, como el promotor nos (nopalina sintasa) (Kim y col., 1993), ocs (octopina sintasa) (Kononowicz y col., 1992) y mas (manopina sintasa) (McBride y Summerfelt, 1990). Los otros promotores que dirigen altos niveles de expresión, que son también utilizados con relativa frecuencia, incluyen el promotor de la ubiquitina del maíz (Christensen y Quail, 1996), de la ubiquitina del tabaco (Plesse y col., 2001), y de la actina 1 de arroz (McElroy y col., 1990). En muchos casos los niveles de expresión alcanzados superan hasta 35 veces los que produce el promotor CaMV35S como, por ejemplo, los promotores de ubiquitina de arroz, rubq1 y rub2 (Wang y Oard, 2003).

1.8.1.2. Promotores inducibles

En muchos casos, cuando la función del transgén afecta el normal crecimiento y desarrollo de la planta, es preferible usar sistemas inducibles. Hasta el momento varios sistemas inducibles han sido publicados para plantas, pero solamente en sistemas modelo como *Arabidopsis* o tabaco. De esta manera, aparecieron sistemas inducibles por etanol (Caddick y col., 1998), por esteroides (Aoyama y Chua, 1997), por dexametasona (Ouwkerk y col., 2001) y por respuesta a distintos tipos de estrés (Hoff y col., 2001) donde se evita el problema de la toxicidad de los compuestos antes mencionados.

1.8.1.3. Promotores tejido específicos

También se han estudiado numerosos promotores que confieren la capacidad de expresión en tejidos específicos, en especial en semilla, utilizando promotores de proteínas de reserva,

como el promotor de la D hordeína de cebada (Horvath y col., 2000) o el de las gluteínas de arroz, donde se describen también diferentes secuencias conservadas, cajas y motivos que actúan en cis y confieren la capacidad de expresión en endosperma (Washida y col., 1999). En el caso de las dicotiledóneas se han analizado ampliamente los promotores de los genes de la β -conglucina de soja (Chamberland y col., 1992; Lessard y col., 1993) y la β -faseolina de la arveja (Bustos y col., 1989). En el caso específico de girasol existen promotores bien caracterizados como el de la heliantina (Jordano y col., 1989), que es la proteína mayoritaria de semilla de girasol, que confiere la expresión del gen reportero β -glucuronidasa exclusivamente en semilla en tabacos transgénicos. Más recientemente, en nuestro grupo de trabajo, se caracterizaron dos secuencias promotoras, correspondientes a una oleato desaturasa (HaFAD2-1) y una lipid transfer protein (HaAP10), que confieren la expresión exclusivamente en semillas del gen reportero GUS en plantas de *Arabidopsis thaliana* (Zavallo y col., 2010).

Hipótesis y objetivos

2. Hipótesis y objetivos

El girasol, es una especie de gran importancia económica a nivel mundial y un cultivo estratégico para nuestro país, ya que Argentina es usualmente el primer exportador mundial de derivados de esta oleaginosa.

La importancia de la investigación en transformación genética de girasol, no sólo radica en la posibilidad de obtener plantas transgénicas como producto final, sino también, en la capacidad de evaluar los genes candidatos obtenidos in silico o a partir de estudios de genómica funcional, para asistir a los programas de mejoramiento genético de girasol que se desarrollan en la Argentina.

2.1. Hipótesis

Debido a que el girasol es una especie de la familia Asteraceae, y que otras especies de la misma familia han sido transformadas genéticamente, es también posible la transformación genética con expresión transgénica, tanto transitoria como estable, de genes en girasol mediante metodologías que permitan alcanzar buenos niveles de expresión y eficiencia.

2.2. Objetivo general

Establecer las bases metodológicas de una plataforma de mejoramiento genético y de genómica funcional para la caracterización in vivo de genes de interés agronómico, mediante la transformación genética transitoria y estable de asteráceas en general, y de girasol en particular.

2.3. Objetivos particulares

- Comparar esquemas de aplicación del antibiótico kanamicina y comprobar la consistencia del criterio de selección por formación de raíces in vitro utilizando construcciones con genes antifúngicos heterólogos.
- Estudiar los niveles de expresión obtenidos con genes reporteros, bajo la regulación de distintos promotores en transformación transitoria de girasol.
- Consolidar ensayos de transformación estable de girasol, con construcciones conteniendo el promotor seleccionado a partir del punto anterior y analizar la expresión de los transgenes.

Materiales y métodos

3. Materiales y métodos

3.1. Construcciones utilizadas

3.1.1. Construcción GUS-intrón

El estudio de la regulación de la expresión en lechuga, mediada por el promotor CaMV35S (De Loose y col., 1995), se realizó utilizando el vector GUS-intrón (Vancanneyt y col., 1990). Este vector posee el gen reportero de la enzima β -glucuronidasa interrumpido por un intrón (figura 2) y el gen de resistencia a kanamicina *nptII* (neomicina fosfotransferasa II) bajo la regulación del promotor de la nopalina sintasa (*nos*) (Depicker y col., 1982).



Figura 2. Representación gráfica del vector GUS-intrón. 35S: promotor CaMV35S; GUS-intrón: gen reportero de la enzima β -glucuronidasa interrumpido por un intrón; *nptII*: gen de la neomicina fosfotransferasa II; *nos*, Nt y NpA promotor, terminador y señal de poliA de la nopalina sintasa, respectivamente; RB y LB: bordes derecho e izquierdo del ADN-T.

3.1.2. Construcciones con genes antifúngicos

La transformación con genes antifúngicos se realizó utilizando los cassettes dobles de expresión, cedidos por L. Hernández (CIGB, Cuba), pHCA35 y pHGC39 (figura 3) conteniendo los genes de quitinasa (*ch5B*) de *Phaseolus vulgaris*, y de glucanasa (*gln2*) y osmotina (*ap24*), de *Nicotiana tabacum*, bajo la regulación del promotor CaMV35S con el enhancer Ω del virus del mosaico del tabaco (TMV, sigla en inglés de tobacco mosaic virus) (Gallie y Walbot, 1992). Los mismos poseen el gen de resistencia *nptII* bajo la regulación del promotor *nos*.



Figura 3. Representación gráfica de los cassettes dobles de expresión pHCA35 y pHGC39 conteniendo los pares de genes *ap24*-*ch5B* y *ch5B*-*gln2*, respectivamente, y el cassette de expresión *nptII*. Secuencias genéticas regulatorias utilizadas: 35S: promotor CaMV35S; Ω : secuencia sintética líder de 65 pb del TMV; *nos* y Nt, promotor y terminador de la nopalina sintasa, respectivamente; Oct: terminador de la octopina sintasa; LB y RB: bordes izquierdo y derecho del ADN-T.

3.1.3. Construcciones para el análisis de promotores

Se realizaron construcciones del vector binario Gateway pKGWFS7,0 (Karimi y col., 2002), diseñado para el estudio de promotores (figura 4), con los siguientes promotores:

- CaMV35S con el enhancer Ω del TMV.
- subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bifosfato carboxilasa de crisantemo (rbcS1) (Outchkourov y col., 2003).
- plastocianina de arveja (pea plastocyanin, PPC) (Pwee y Gray, 1993).
- nos
- 2X35S (o e35S, promotor con una duplicación del enhancer del promotor CaMV35S) (Kay y col., 1987).

El vector posee resistencia a kanamicina (gen *nptII* bajo la regulación del promotor nos) para la selección en plantas y a espectinomicina para la selección en bacterias.

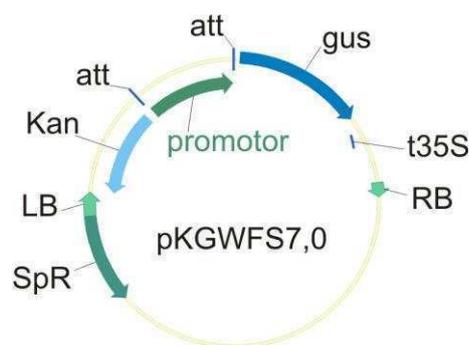


Figura 4. Representación gráfica del vector binario Gateway pKGWFS7,0. gus: gen reportero β -glucuronidasa; t35S: terminador del CaMV35S; Kan: cassette de resistencia a kanamicina; att: sitios de recombinación; promotor: sitio donde se posicionan los distintos promotores; SpR: gen de resistencia a espectinomicina; LB y RB: bordes izquierdo y derecho del ADN-T.

3.2. Cepas bacterianas

Para la multiplicación y conservación de los vectores se utilizó *Escherichia coli* cepa DH5 α (Hanahan, 1983) y para la transformación transitoria y estable de tejidos vegetales las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* siguientes: GV3101 (Holsters y col., 1980) con resistencia a rifampicina y gentamicina; LBA4404 (Hoekema y col., 1983) y EHA105 (Hood y col., 1993), ambas con resistencia a rifampicina.

3.3. Material vegetal empleado

Se utilizó el genotipo público HA89 de girasol, *Helianthus annuus* L., a partir de las semillas obtenidas y repicadas en cada campaña en la EEA-INTA Balcarce, Buenos Aires. Se

emplearon semillas maduras para la agroinfección y se obtuvieron plantas de girasol cultivadas en invernáculo en macetas con una capacidad de 8 litros con una mezcla compuesta por tierra (40 %), turba (30 %), estiércol (20 %) y perlita (10 %). Estas plantas en los estadios de desarrollo V2 y V12 (con 2 y 12 hojas verdaderas de más de 4 cm, respectivamente) (Schneiter y Miller, 1981) fueron utilizadas para la agroinfiltración y en V6-V8 (Schneiter y Miller, 1981) como pie de injerto.

Se utilizó el cultivar Grand Rapids de lechuga, *Lactuca sativa* L., provisto por el banco de germoplasma de la EEA-INTA La Consulta, Mendoza. Se emplearon semillas maduras para realizar el protocolo de agroinfección.

Se utilizaron plantas de 3 semanas de edad de *Nicotiana benthamiana* cultivadas en macetas de 1 litro de capacidad con una mezcla compuesta por tierra (50 %), turba (30 %), estiércol (10 %) y perlita (10 %) para los ensayos de agroinfiltración. Estas plantas se obtuvieron a partir de semillas multiplicadas en el Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, Buenos Aires.

Las condiciones del invernáculo fueron 18 h de luz y una temperatura entre 18 y 25°C.

3.4. Construcción de vectores para el ensayo de promotores

Para el estudio de distintos promotores en girasol se obtuvieron las construcciones de vectores realizando los pasos que se detallan a continuación.

3.4.1. Obtención de promotores por PCR

La obtención de forma completa de los promotores se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, sigla en inglés de polymerase chain reaction). Se diseñaron los oligonucleótidos iniciadores mediante la ayuda de los programas informáticos Primer3 (Rozen y Skaletsky, 2000) y/o Vector NTI 9 (Invitrogen, EUA) y fueron sintetizados por la empresa Alpha DNA, Canadá. Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador (Programmable Thermal Controller-100, M. J. Research Inc., EUA).

3.4.1.1 PCR CaMV35S- Ω TMV

Para obtener el promotor CaMV35S con el enhancer Ω del TMV, la PCR fue realizada a partir del cassette doble pHGC39 utilizado en las transformaciones con genes antifúngicos, en una mezcla de reacción conteniendo: buffer (1x, Invitrogen, EUA), Platinum Taq DNA polimerasa

(1 U, Invitrogen, EUA), 2,5 mM de MgCl₂, 0,2 mM de dNTPs y 0,1 μM de cada oligonucleótido iniciador (5' CCAATCCCACAAAAATCTGAGC 3' y 5' GTAATTGTAATGTAATTGTAATGT 3') en un volumen final de 50 μL. Se realizó un control negativo sin la adición de ADN.

Las condiciones de la reacción fueron: 5 min a 94°C, 5 ciclos de touchdown (en cada ciclo se disminuyó la temperatura de hibridación de los oligonucleótidos iniciadores 1°C) de 1 min a 94°C, 1 min a 63-58°C, 1 min a 72°C, seguido de 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C. El producto esperado fue de 1.414 pb.

3.4.1.2. PCR rbcS1

La reacción de amplificación fue realizada a partir del ImpactVector 1.1 (Plant Research International) (Outchkourov y col., 2003) en las mismas condiciones de reacción que la PCR CaMV35S-Ω TMV (ítem 3.4.1.1). Se utilizaron los oligonucleótidos iniciadores 5' CTTAGACAAACACCCCTTGTT 3' y 5' CATGGTTTCTAGATACTTAGG 3'; siendo el producto esperado de 1.008 pb.

3.4.1.3. PCR PPC

La reacción de amplificación fue realizada a partir del plásmido pksPPC (obtenido por la firma de un Material Transfer Agreement con Advanced Technologies Cambridge, Inglaterra). Se siguieron las mismas condiciones que en el ítem 3.4.1.1 utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5' TATGCAACTTACAACGTGCACT 3' y 5' TTTTCTCAAGAGTAATGAGTTTCT 3'. El producto esperado fue de 784 pb.

Las condiciones de la reacción fueron: 5 min a 94°C, 5 ciclos de touchdown de 30 s a 94°C, 30 s a 65-60°C, 30 s a 72°C, seguido de 40 ciclos de 30 s a 94°C, 30 s a 60°C, 30 s a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

3.4.1.4. PCR nos

Como templado de la PCR se usó el plásmido GUS-intrón (ítem 3.1.1, Vancanneyt y col., 1990) en las mismas condiciones que en el ítem 3.4.1.1 utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5' AGATCCGGTGCAGATTATTT 3' y 5' GATCATGAGCGGAGAATTAA 3'; siendo el producto esperado de 307 pb.

Las condiciones de la reacción fueron: 5 min a 94°C, 8 ciclos de touchdown de 1 min a 94°C, 1 min a 63-55°C, 1 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

3.4.1.5. PCR 2X35S

La reacción de amplificación fue realizada a partir del plásmido AKK1431 e35S (e35S proveniente de pMON999, Monsanto, EUA), en las mismas condiciones que en el ítem 3.4.1.1 utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5' GGTCCGATGTGAGACTTTTC 3' y 5' TCAGCTTGTCAGCGTGTCTC 3' que generan un producto de reacción de 631 pb.

Las condiciones de la reacción fueron: 5 min a 94°C, 5 ciclos de touchdown de 1 min a 94°C, 1 min a 63-58°C, 1 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 58°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

3.4.2. Electroforesis y purificación de los productos de PCR

Los productos de PCR obtenidos y el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen, EUA), fueron sembrados en un gel de agarosa (0,8 %) con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) y separados por electroforesis horizontal en buffer TAE (Tris-acetato EDTA, 1x) a 5 V/cm. La visualización se realizó por exposición del gel a fuente de luz UV de 302 nm (transiluminador Hoefer Macro Veil UV-20, Amersham Pharmacia Biotech, Reino Unido). Se realizó el corte de la banda del tamaño deseado con un escalpelo y la purificación utilizando QIAEX II Gel Extraction Kit o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante.

3.4.3. Ligación de los productos de PCR

Cada una de las secuencias fue clonada en el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen, EUA), que permite el clonado de productos de PCR, utilizando el pCR8/GW/TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, EUA) siguiendo las indicaciones del fabricante. Este vector posee resistencia a espectinomicina para la selección en bacterias.

3.4.4. Obtención y transformación de competentes de E. coli DH5α

Las células competentes de E. coli DH5α fueron obtenidas de acuerdo al protocolo descrito por Sambrook y Russell (2001) utilizando cloruro de calcio. Se mezclaron 50 µL de células competentes con 5 ng/µL de ADN. Se incubaron durante 30 min en hielo, luego a 42°C durante 90 s y se volvieron a incubar en hielo 2 min. Posteriormente, se les agregó 1 mL de medio LB líquido sin antibiótico y se incubaron durante 1 hora a 37°C con agitación. Por

último, se cultivaron en placas con medio LB con espectinomicina (100 mg/L) a 37°C durante aproximadamente 16 h (overnight, ON).

3.4.5. Obtención de ADN plasmídico

Se realizaron dos tipos de preparaciones dependiendo del posterior análisis. Para comprobar la presencia de los vectores en las colonias de bacteria, se realizaron las preparaciones descritas en Sambrook y Russell (2001) con algunas modificaciones. A partir de cada colonia bacteriana obtenida se inocularon 3 mL de medio LB líquido con espectinomicina (100 mg/L) y se cultivaron ON a 37°C con agitación. Se tomaron 2 mL y se cosecharon las células por centrifugación durante 5 min a 2.300 x g. Se resuspendieron en 100 µL de Solución I. Se agregaron 200 µL de Solución II y se mezcló suavemente por inversión, luego se agregaron 150 µL de Solución III fría, se mezcló suavemente por inversión y se dejó en hielo por 5 min. Posteriormente, se centrifugó durante 20 min a 13.400 x g a 4°C y se transfirió el sobrenadante a otro tubo. Luego se agregó 350 µL de isopropanol frío, se mezcló por inversión y se dejó por 10 min. Se centrifugó 30 min a 13.400 x g, se descartó el sobrenadante y se agregaron 300 µL de etanol 70 % frío. Se centrifugó 10 min a 13400 x g. Finalmente, se volcó el sobrenadante, se dejó secar a temperatura ambiente y luego se resuspendió con 50 µL de H₂O.

Para la verificación de la secuencia clonada por secuenciación automática y la recombinación con el vector Gateway pKGWFS7,0, se realizó la extracción del ADN plasmídico utilizando el QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

3.4.6. Verificación de la orientación del inserto y de la secuencia clonada

Dado que el vector pCR8/GW/TOPO TA (Invitrogen, EUA) utilizado no brinda un clonado direccional, fue necesario realizar digestiones con enzimas de restricción (tabla 2) que proporcionaran información sobre la orientación en la cual fue incorporado el fragmento amplificado por PCR. Esta fue la forma de verificar cuál de las colonias bacterianas obtenidas poseía el inserto en la orientación necesaria para realizar la posterior recombinación (ítem 3.4.7). La selección de las mismas fue realizada con la ayuda del programa Vector NTI 9 (Invitrogen, EUA). Las reacciones fueron realizadas en un volumen final de reacción de 20

μL conteniendo buffer 1x, 6 U de enzima y el agregado de seroalbúmina bovina (BSA, sigla en inglés de bovine serum albumin) en una concentración final de 1 mg/mL en el caso que las enzimas lo requirieran (todos los reactivos fueron de la firma New England Biolabs, EUA). Se incubaron durante 1 hora a 37°C (temperatura óptima de actividad de las enzimas).

Los productos y el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen, EUA) fueron sometidos a electroforesis horizontal en geles de agarosa (0,8 %) teñidos con bromuro de etidio (0,5 μg/mL) en buffer TAE (1x) a 5 V/cm y visualizados por exposición a una fuente de luz UV de 320 nm (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, EUA).

Tabla 2. Enzimas de restricción y fragmentos esperados en la verificación de la orientación de clonado de los fragmentos de PCR en el vector pCR8/GW/TOPO TA.

| | CaMV35S-Ω TMV | rbcS1 | PPC | nos | 2X35S |
|---------------------------|------------------|------------|-----------|------------|-----------|
| Enzimas de restricción | SacI-XbaI | EcoRV-KpnI | SacI-XbaI | SacII-XbaI | EcoRV |
| Fragmentos esperados (pb) | 3.928-308 | 3.365-460 | 2.876-725 | 2.690-434 | 3.215-233 |

En la parte superior de la tabla se especifican las construcciones a evaluar.

Para la verificación del clonado de la secuencia deseada se realizó la secuenciación utilizando los oligonucleótidos universales M13 directo (5' TGTAACGACGGCCAGT 3') y M13 reverso (5' CAGGAAACAGCTATGACC 3'). La secuenciación se realizó con el secuenciador capilar Applied Biosystems 3130xl en la Unidad de Genómica del Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, Buenos Aires.

3.4.7. Recombinación en el vector Gateway pKGWFS7,0

La obtención de un vector binario con las secuencias deseadas fue necesaria para la transformación de *A. tumefaciens* y posterior transformación de tejidos vegetales. Para esto se utilizó el vector Gateway pKGWFS7,0 (Karimi y col., 2002), vector binario diseñado para el estudio de promotores. La tecnología Gateway es un método de clonado basado en las propiedades de recombinación sitio específica del bacteriófago lambda (recombinación LR) (Landy, 1989), permitiendo mover secuencias de ADN en múltiples vectores para el análisis funcional y la expresión de proteínas (Hartley y col., 2000). La transferencia basada en la recombinación LR de los promotores ocurre en el vector pKGWFS7,0, río arriba del gen reportero de la β-glucuronidasa.

El vector pKGWFS7,0 posee el gen *ccdB* (Bernard y Couturier, 1992), que permite la selección negativa del mismo en *E. coli* DH5 α luego de la recombinación y transformación. Cuando ocurre la recombinación entre el vector pCR8/GW/TOPO TA y el vector pKGWFS7,0, el gen es reemplazado por el fragmento de interés.

Debido a que tanto el vector pCR8/GW/TOPO TA como el vector pKGWFS7,0 poseen la resistencia al antibiótico espectinomicina, previo a la realización de la recombinación LR, fue necesario realizar la linealización del vector pCR8/GW/TOPO TA con una enzima de restricción. De este modo las colonias obtenidas serían producto de la transformación con el vector resultante de la recombinación LR. Las reacciones fueron realizadas en un volumen de reacción final de 30 μ L conteniendo buffer (1x), 6 U de enzima (se utilizó XbaI para la construcción conteniendo CaMV35S- Ω TMV y XhoI para las restantes) y el agregado de BSA en una concentración final de 1 mg/mL (todos los reactivos fueron de la firma New England Biolabs, EUA). Se incubaron durante 2 h a 37°C (temperatura óptima de actividad de las enzimas) y posteriormente fueron inactivadas a 65°C durante 20 min.

Se realizó la recombinación utilizando 2 μ L de la enzima clonasa LR II (Invitrogen, EUA) en un volumen final de 8 μ L incubando ON a 25°C, luego se agregó 1 μ L de proteinasa K y se incubó durante 10 min a 37°C. Se transformó *E. coli* DH5 α (como se indica en el ítem 3.4.4) y se colocaron en placas de medio LB con espectinomicina (100 mg/L) a 37°C ON. Las colonias resultantes fueron cultivadas en medio LB líquido con espectinomicina (100 mg/L) a 37°C con agitación ON, se realizó la extracción de ADN plasmídico utilizando QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. La verificación de la recombinación se realizó mediante digestiones con enzimas de restricción seleccionadas (tabla 3) con la ayuda del programa Vector NTI 9 (Invitrogen, EUA). Las condiciones de reacción fueron las mismas que las dadas en el ítem 3.4.6.

Tabla 3. Enzimas de restricción y fragmentos esperados en la verificación de la recombinación con el vector pKGWFS7,0.

| | CaMV35S- Ω TMV | <i>rbcS1</i> | PPC | nos | 2X35S |
|----------------------------------|-----------------------|--------------|--------------|----------------|-------------------------|
| Enzimas de restricción | XhoI-NcoI | EcoRI | HindIII-NcoI | SacII | EcoRV |
| Fragmentos esperados (pb) | 9.822-2.664 | 11.054-1.027 | 8.829-3.027 | 10.780-359-240 | 9.468-1.290-566-231-148 |

En la parte superior de la tabla se especifican las construcciones a evaluar.

Los productos y el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen, EUA) fueron sometidos a electroforesis horizontal en las mismas condiciones descritas en 3.4.6.

3.5. Obtención de competentes y transformación de *Agrobacterium tumefaciens*

Una vez obtenidos los vectores binarios, se procedió a la transformación de las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404, GV3101 y EHA105 para la transformación de tejidos vegetales.

Se obtuvieron células competentes realizando, a partir de una colonia aislada, un cultivo durante 48 h a 28°C en 3 mL de medio LB líquido con rifampicina (100 mg/L) y gentamicina (40 mg/L) para la cepa GV3101 y rifampicina (100 mg/L) para las cepas LBA4404 y EHA105. Luego se inocularon 100 mL de medio LB líquido con los antibióticos correspondientes a cada cepa con 1 mL del cultivo anterior, se dejó crecer a 28°C a 200 rpm (shaker C25KC, New Brunswick, EUA) hasta alcanzar una densidad óptica entre 0,5 y 0,7 medida a 600 nm (DO_{600} , DU-65 Spectrophotometer, Beckman Instruments, EUA). Posteriormente se enfriaron en hielo, se centrifugaron durante 10 min a 3.220 x g a 4°C y se descartó el sobrenadante. Se resuspendieron en glicerol 10 % frío en sucesivos lavados con 100, 50, 2 y 2 mL. Finalmente se resuspendieron en un volumen final de 1 mL de glicerol 10 %, se fraccionaron en alícuotas de 50 μ L y se guardaron a -80°C hasta su utilización.

La transformación mediante electroporación se realizó de acuerdo a Wen-Jun y Forde (1989) con modificaciones. Cincuenta microlitros de células competentes fueron descongeladas en hielo, se les agregó de 2 a 10 ng de ADN y se transfirieron a una cubeta de electroporación de 0,1 cm (Bio-Rad Laboratories, EUA) enfriada previamente. Se les aplicó un pulso eléctrico de 2,5 V con una capacitancia de 25 μ F y una resistencia de 200 Ω (electroporador Gene Pulser, Bio-Rad Laboratories, EUA). Inmediatamente después se agregó 1 mL de medio LB líquido frío. Se recolectó el volumen y se incubó en agitación a 28°C durante 3-4 h.

Finalmente la selección de las colonias transformadas se realizó en placas de medio LB con rifampicina (100 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L) para las cepas LBA4404 y EHA105, y rifampicina (100 mg/L), gentamicina (40 mg/L) y espectinomicina 100 (mg/L) para la cepa GV3101, durante 48 h a 28°C.

3.6. Agroinfección de girasol

Para estudiar la expresión transitoria en los explantos blanco de transformación y la expresión estable en girasol, se realizaron ensayos de agroinfección siguiendo los pasos que se detallan a continuación.

El trabajo se realizó asépticamente en un gabinete con flujo laminar horizontal (Nuairé, EUA).

3.6.1. Desinfección del explanto inicial

Los aquenios se colocaron en la solución Plant Preservative Mixture (PPM, Plant Cell Technology Inc., EUA) 20 mL/L con $MgCl_2$ 0,05 mg/mL en oscuridad con agitación constante durante 24 h.

3.6.2. Germinación

A los aquenios desinfectados y sin enjuagar, se les retiró el pericarpio con instrumental adecuado. Luego se germinaron en medio MS1/2 en oscuridad durante 24 h.

3.6.3. Cultivo bacteriano

La cepa utilizada fue EHA105 (Hood y col., 1993) tal como se determinó para la transformación de girasol (Zavallo, 2006). El cultivo se realizó en placas de medio mínimo A (MMA) con rifampicina (100 mg/L) y kanamicina (50 mg/L) para las construcciones con genes antifúngicos, y con rifampicina (100 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L) para las construcciones con los distintos promotores. Los cultivos se incubaron a 28°C durante 48 h.

El día de la agroinfección se inició un cultivo líquido, a partir del total de las bacterias desarrolladas en las placas de MMA, en medio AIM con acetosiringona (58,8 mg/L) a 28°C con agitación suave (60 rpm, shaker C25KC, New Brunswick, EUA) hasta una DO_{660} de 0,2-0,5 (DU-65 Spectrophotometer, Beckman Instruments, EUA).

3.6.4. Corte y agroinfección

Inmediatamente previo a la agroinfección a las semillas germinadas, se les realizó un heat shock a 45°C durante 15 min. Luego se pasaron a una placa de Petri con 15 mL del cultivo de bacterias en medio AIM con acetosiringona. Se les quitó el ápice radicular, se cortaron longitudinalmente separando los cotiledones, obteniéndose así 2 hemiembriones, cada uno con un cotiledón completo. Posteriormente al corte se infiltraron en bomba de vacío por 10 min a una presión de 20-25 psi y se incubaron durante 1-2 h agitando ocasionalmente en forma manual, en penumbra y a temperatura ambiente.

En los ensayos de control se realizó el corte en medio AIM con acetosiringona sin bacterias.

3.6.5. Cocultivo

Los hemiembriones se dejaron secar sobre papel de filtro estéril por 5 minutos y se transfirieron, con la cara adaxial hacia arriba, a placas de Petri con medio de cocultivo. Las condiciones de cultivo fueron 22°C en oscuridad durante 48-96 h.

3.6.6. Regeneración

Los medios de cultivo utilizados para la regeneración están basados en la formulación de Murashige y Skoog (1962), con modificaciones. En cada uno de los repiques se varió la concentración hormonal, tal como se determinó para el cultivo in vitro de girasol (Parody, 2003).

Los explantos se transfirieron a placas de Petri con medio Re1, donde se mantuvieron por 10-14 días. A partir de este estadio todos los cultivos se cultivaron a 22-24°C de temperatura, y con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad 5000 lux).

Posteriormente los explantos fueron transferidos a medio de cultivo Re2. Dependiendo del tamaño del brote se transfirieron a placas de Petri de 25 mm de altura o a tubos de cultivo, por un período de 7 a 10 días.

El siguiente pasaje fue a tubos con medio Re3, por un período de 7 a 10 días. En este punto se descartaron los restos de cotiledones del explanto original.

En el último pasaje por medio de regeneración (Re4), los cultivos se mantuvieron por un espacio de 10 a 14 días en los tubos de cultivo.

Finalmente los brotes fueron transferidos a medio de enraizamiento (RA). Si durante un período de 18 a 20 días de cultivo no se formaban raíces, se realizaba un nuevo pasaje en este mismo medio.

3.6.7. Pasaje al área de rusticación

Cuando las plántulas mostraron un desarrollo radicular adecuado, se llevaron al invernáculo en sus recipientes in vitro, para una preaclimatación a las condiciones de temperatura y fotoperiodo de dicha área (18-22°C y 16 h luz, respectivamente). Luego de 3 a 7 días, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 8 litros de capacidad con una mezcla compuesta por 40 % de tierra estéril, 30 % de turba, 20 % de estiércol y 10 % de perlita.

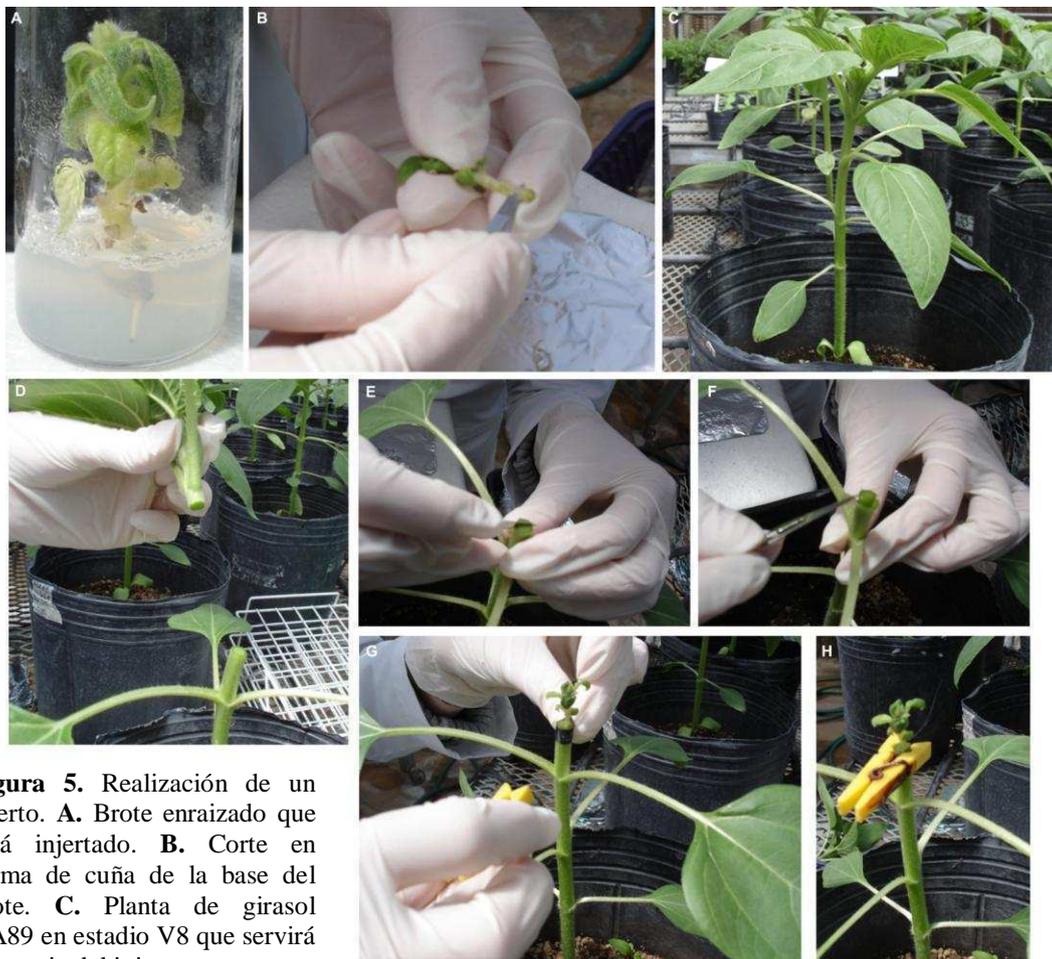


Figura 5. Realización de un injerto. **A.** Brote enraizado que será injertado. **B.** Corte en forma de cuña de la base del brote. **C.** Planta de girasol HA89 en estadio V8 que servirá como pie del injerto.

D. Corte horizontal. **E y F.** Corte longitudinal hasta una profundidad equivalente a la longitud de la cuña. **G y H.** Sujeción del brote con una cinta y con un broche pequeño.

Aquellas plantas cuyo desarrollo radicular no era suficiente para el pasaje a maceta, fueron injertadas en pies de girasol del genotipo público HA89, en el estadio de desarrollo V6-V8. El

injerto se realizó utilizando un pie que tuviera un diámetro similar al de la plántula (figura 5, A y C). Para ello, se realizó en el extremo inferior de la plántula un corte en bisel, y en el lado opuesto un corte superficial para formar una cuña (figura 5, B). Luego se realizó un corte longitudinal al pie, previamente cortado horizontalmente, hasta una profundidad equivalente a la longitud de la cuña (figura 5, D-F). Finalmente se introdujo la plántula, se la sostuvo con una cinta de tela y un broche pequeño (figura 5, G y H), tapándose la maceta con una bolsa de nylon para mantener la humedad. La cinta se retiró a los 15-20 días, tiempo suficiente para que se produzca la unión vegetativa.

Posteriormente, se recolectó material para realizar el análisis por PCR, y en algunos casos para detección histoquímica de la actividad de la enzima β -glucuronidasa (GUS).

Los capítulos florales fueron cubiertos con bolsas de tela y se recolectaron los aquenios obtenidos.

3.6.8. Rediseño de estrategias para la selección con el antibiótico kanamicina

Para el rediseño de la estrategia para la selección con el antibiótico kanamicina (kan) se probaron tres esquemas de selección distintos, utilizando como vector de transformación de los explantos el vector pHGC39.

Esquema 1: Re1 kan 1 mg/L; Re2 kan 10 mg/L; Re3, Re4 y RA kan 50 mg/L.

Esquema 2: Re1 kan 1 mg/L; Re2 kan 10 mg/L; Re3, Re4 y RA kan 25 mg/L.

Esquema 3: Re1 kan 1 mg/L; Re2 kan 10 mg/L; Re3 y Re4 25 mg/L y RA kan 50 mg/L.

Aquellos brotes que enraizaron en medio RA en presencia de kanamicina fueron transferidos al invernáculo para su rusticación.

El porcentaje de eficiencia se calculó utilizando la siguiente fórmula:

$$(\text{n}^\circ \text{ de brotes enraizados} / \text{n}^\circ \text{ total de brotes en medio de enraizamiento}) \times 100$$

El esquema que resultó ser el más adecuado fue el utilizado para todos los ensayos de transformación.

3.6.9. Análisis de la expresión de distintos promotores

Para el análisis de distintos promotores, los explantos transformados fueron analizados luego del cocultivo (actividad por transformación transitoria) en oscuridad (ítem 3.6.5) por detección histoquímica de GUS y de forma individual por cuantificación fluorométrica de la

actividad de la enzima β -glucuronidasa (MUG). Adicionalmente, se comparó la actividad de los promotores *rbcS1* y PPC luego del cocultivo en oscuridad o en luz (fotoperiodo de 16/8 h 5000 lux).

3.6.10. Obtención de la T1

Los aquenios recolectados fueron sembrados en arena estéril humedecida con una solución de ácido giberélico (GA_3 , 5 mg/L), cubiertos con una bolsa de nylon y mantenidos a 4°C. Luego de una semana fueron transferidos a una cámara a 22-24°C de temperatura y con un fotoperiodo de 16/8 h (luz/oscuridad 5000 lux). Una vez surgidos los cotiledones fueron transferidos al invernáculo para su adaptación y posterior pasaje a maceta de 8 litros de capacidad con una mezcla de tierra estéril (40 %), turba (30 %), estiércol (20 %) y perlita (10 %).

3.7. Agroinfección de lechuga

Para el estudio de la expresión estable del gen reportero de la β -glucuronidasa con el promotor CaMV35S, se realizaron ensayos de agroinfección de lechuga. La agroinfección se realizó utilizando el protocolo de Curtis y col. (1994a) descrito detalladamente en Davey y col. (2002) con modificaciones.

Se trabajó asépticamente en gabinete con flujo laminar horizontal (Nuair, EUA).

3.7.1. Desinfección del explanto inicial

La desinfección de las semillas se realizó por sucesivos lavados. Primero con agua estéril, luego con alcohol 70 % durante 10 s, seguido de dos enjuagues con agua estéril, y con lavandina (20 %) durante 15 min y luego se las enjuagó por lo menos 7 veces con agua estéril. Finalmente se colocaron en una solución PPM (20 mL/L) con $MgCl_2$ (0,05 mg/mL) a 4°C en oscuridad ON.

3.7.2. Germinación

Las semillas se colocaron en placas de Petri con medio MS1/2 durante 48 h en penumbra y a 23°C en cámara de cría (Versatile environmental test chamber, Sanyo Electric Co, Japón). Posteriormente se modificaron las condiciones a 16 h de luz.

3.7.3. Cultivo bacteriano

La cepa utilizada fue LBA4404 transformada con el plásmido GUS-intrón. El cultivo se realizó en placas de medio MMA con rifampicina (100 mg/L) y kanamicina (50 mg/L) a 28°C durante 48 h. El día de corte se inició un cultivo en medio MMA líquido a partir del total de las bacterias desarrolladas en placa a 28°C con agitación (shaker C25KC, New Brunswick, EUA) hasta una DO₆₆₀ de 0,2-0,5 (DU-65 Spectrophotometer, Beckman Instruments, EUA).

3.7.4. Corte

Cuando los cotiledones estuvieron bien expandidos (10 días aproximadamente), se cortaron separándolos y realizándoles pequeños pinchazos. Luego se los colocó con la cara abaxial herida hacia abajo en placas de medio UM sólido por 24 h.

3.7.5. Agroinfección y cocultivo

Los explantos se transfirieron a placas de Petri con UM líquido con acetosiringona (58,8 mg/L) y una dilución 1/20 de las agrobacterias. Se realizó agitación manual muy suave por 10 min, se dejaron secar sobre papel de filtro estéril y se transfirieron a placas con medio UM sólido con acetosiringona (58,8 mg/L). Se colocaron en penumbra en cámara de cría a 23°C durante 48 h.

3.7.6. Regeneración y selección

Luego del cocultivo los explantos se transfirieron a placas de Petri con medio SIM. A los 7-10 días se transfirieron a placas con medio de regeneración de lechuga con kanamicina (50 mg/L). Se repitieron los pasajes en placa cada 10/14 días, hasta que se formaron brotes y luego se transfirieron a frascos de vidrio. Este proceso requirió aproximadamente 6 a 7 meses.

3.7.7. Enraizamiento

Cuando los brotes presentaron un tamaño adecuado se los separó del callo y se transfirieron a medio de enraizamiento (MS con ácido 1-naftalenacético, ANA, 0,1 mg/L)

3.7.8. Pasaje a invernáculo y recolección de la T1

Aquellos brotes que mostraron un desarrollo radicular adecuado, se llevaron en sus recipientes in vitro al invernáculo para una preaclimatación a las condiciones de temperatura y fotoperiodo de dicha área (ídem a lo descrito en el ítem 3.6.7). Luego de 3-7 días, las plántulas fueron trasplantadas a macetas de 350 mL con una mezcla comercial conteniendo turba, perlita y vermiculita (Fafard Mix N°2, Conrad Fafard, EUA). Las flores fueron cubiertas con bolsas de papel y se recolectaron las semillas obtenidas.

3.8. Agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana* y puesta a punto de la agroinfiltración de girasol

Para la agroinfiltración de *N. benthamiana* y de girasol, se cultivó *A. tumefaciens* en 3 mL de medio LB líquido con rifampicina (100 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L) para las cepas EHA105 y LBA4404, y rifampicina (100 mg/L), gentamicina (40 mg/L) y espectinomicina (100 mg/L) para la cepa GV3101; a 28°C, 200 rpm (shaker C25KC, New Brunswick, EUA) por 24 h.

Luego, con 1 mL del cultivo primario se inocularon 10 mL de medio LB líquido con antibióticos y acetosiringona (4 mg/L) y se cultivaron a 28°C, 200 rpm por 24 h.

Las bacterias fueron precipitadas a 1.800 x g por 30 min y resuspendidas en una solución 10 mM de MgCl₂, 10 mM de MES (ácido 4-morfolinoetanosulfónico) y 20 mg/L de acetosiringona en el volumen necesario para lograr una DO₆₀₀ de 0,7-1 (DU-65 Spectrophotometer, Beckman Instruments, EUA). Los cultivos se dejaron en reposo por 2-3 h previo a la agroinfiltración.

3.8.1. Método de agroinfiltración

Las agroinfiltraciones fueron realizadas como describe Schöb y col. (1997) con modificaciones (protocolo de agroinfiltración utilizado rutinariamente en el Instituto de Biotecnología, INTA Castelar, Buenos Aires, Bazzini y col., 2007). Este procedimiento consiste en la introducción de la suspensión bacteriana, por la aplicación de una presión suave y continua sobre la cara abaxial de la lámina de la hoja, con una jeringa sin aguja conteniendo la suspensión. Luego de la agroinfiltración las plantas fueron mantenidas en el invernáculo.

3.8.2. Análisis de la expresión

Para determinar el tiempo más adecuado de análisis por detección histoquímica de GUS en girasol se agroinfiltraron las hojas pertenecientes al mismo par. Las mismas fueron analizadas a los 3 y 7 días de realizada la agroinfiltración. En el caso de *N. benthamiana* el análisis se realizó a los 3 días. En ambos casos, se cortaron las hojas agroinfiltradas en el momento de realizar el análisis.

El análisis por cuantificación fluorométrica de MUG se realizó a los 3 días de realizada la agroinfiltración. Para el mismo se cortaron dos discos de cada zona agroinfiltrada utilizando la tapa de un tubo tipo Eppendorf de 1,5 mL de capacidad como sacabocado.

Una vez puesto a punto el protocolo de agroinfiltración en girasol, se compararon las actividades de los promotores realizando la infiltración de hojas del mismo par para realizar el análisis mediante GUS y MUG. Adicionalmente, se comparó la actividad de los promotores *rbcS1* y *PPC* en luz y oscuridad. Para lograr oscuridad se cubrió la planta con una bolsa de nylon negra.

3.9. Detección histoquímica de GUS

La determinación de la tinción histoquímica de GUS fue realizada de acuerdo a Jefferson y col. (1987).

Los tejidos a analizar fueron sumergidos en solución de revelado, se les aplicó vacío a una presión de 20-25 psi durante 10 min y se los incubó con agitación a 37°C en oscuridad durante 24 h. Luego, se les realizó un primer lavado con etanol 70 % y fueron fijados y clarificados por sucesivos lavados con etanol 96 %. Se usó como control positivo una hoja proveniente de

una planta de papa (*Solanum tuberosum*) transformada con el gen de la enzima β -glucuronidasa.

Las imágenes fueron adquiridas con cámara fotográfica (Cyber-shot DSC-P93, Sony, Japón o EasyShare Z1275, Kodak, EUA) o mediante escaneado (ImageScanner, Amersham Biosciences, Reino Unido).

3.10. Cuantificación fluorométrica de MUG

3.10.1. Extracción de proteínas

La extracción de proteínas se realizó mediante la disrupción en forma mecánica con el equipo TissueLyser (QIAGEN, Alemania) realizando 2 ciclos de 2 minutos a 20 Hz con 2 bolitas de tungsteno (3 mm) por tubo de 1,5 mL de capacidad conteniendo el tejido con 300 μ L de buffer de extracción de MUG. Luego, se centrifugaron durante 30 min a 15.700 x g a 4°C y el sobrenadante fue transferido a un tubo nuevo.

3.10.2. Cuantificación fluorométrica de MUG

Para la cuantificación fluorométrica de MUG se realizó el método descrito por Jefferson y col. (1987) con la solución de reacción de MUG. Para lo que se utilizaron 10 μ g de proteína total de cada muestra, cuantificados mediante el método de Bradford (1976) a 600 nm utilizando un espectrofotómetro (Titertek Multiskan Plus, Labsystems, Finlandia) y una curva estándar con BSA.

La cuantificación fluorométrica fue realizada mediante mediciones automáticas de la actividad enzimática en placas de 96 pocillos empleando un espectrofluorómetro SpectraMax GEMINI EM (Molecular Devices Corporation, EUA). Los datos fueron analizados estadísticamente utilizando el programa Prism 5.03 (GraphPad Software, EUA).

3.11. Detección de transgenes mediante PCR

3.11.1 Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico para la detección de los transgenes mediante la reacción de PCR se realizó según el protocolo descrito por Saghai-Marooof y col. (1984). Se colocó el tejido machacado en mortero con nitrógeno líquido en tubos de 1,5 mL de capacidad. Luego se agregaron 0,8 mL de buffer CTAB a 65°C mezclando varias veces por inversión y se incubó 60-90 min a 65°C con agitación suave. Luego de enfriarse 5 min a temperatura ambiente, se agregaron 0,4 mL de cloroformo:octanol (24:1) mezclando suavemente 5-10 min. Se centrifugó 10 min a 1.500 x g y se transfirió la fase acuosa superior a un tubo nuevo. Este paso se realizó dos veces. Posteriormente, se agregaron 0,6 mL de isopropanol para precipitar el ADN mezclando suavemente por inversión, se centrifugó 10 min a 9.300 x g y se descartó el sobrenadante. Luego, se agregaron 0,4 mL de solución de lavado N°1 dejándolo 20 min, se centrifugó 10 min a 9.300 x g y se descartó el sobrenadante. El ADN fue lavado rápidamente en 0,4 mL de solución de lavado N°2, se centrifugó 10 min a 9.300 x g y se descartó el sobrenadante.

Se dejó secar el ADN y, luego, se lo dejó resuspendiendo en agua a 4°C ON. Posteriormente, el ADN fue tratado con ARNasa A (0,05 mg/mL) durante 60 min a 37°C.

Se evaluó la calidad del ADN obtenido realizando una electroforesis horizontal, de la misma forma que la descrita en 3.4.6.

Se evaluó la concentración de ADN obtenida midiendo la absorbancia a 260 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., EUA). La calidad del ADN fue dada por las relaciones 260/280 y 260/230.

3.11.2. PCRs

Las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PTC-100 (Programmable Thermal Controller, M. J. Research, EUA). Los productos de PCR obtenidos y el marcador de peso molecular (1 kb Plus DNA ladder, Invitrogen, EUA), fueron sembrados en un gel de agarosa (0,8 %) con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), separados por electroforesis horizontal en buffer TAE (1x) a 5 V/cm y visualizados por exposición a una fuente de luz UV de 320 nm (Gel Doc XR, Bio-Rad Laboratories, EUA).

3.11.2.1. PCR actina

La amplificación del gen de copia única actina se realizó como control de integridad del ADN y como control de ausencia de inhibidores para la polimerasa en la reacción de PCR. La reacción de PCR fue realizada en una mezcla de reacción conteniendo buffer Green GoTaq (1x, Promega, EUA), Taq DNA polimerasa (1 U, Invitrogen, EUA), 0,2 mM de dNTPs y 0,1 μ M de cada oligonucleótido iniciador (5' GAAGGTGCTGAGTGATGCAA 3' y 5' GGAGCAGAGAGATTCCGTTTG 3') en un volumen final de 50 μ L utilizando como templado entre 40 y 60 ng de ADN. El producto esperado fue de aproximadamente 400 pb.

Las condiciones de la reacción fueron 2 min a 94°C, 5 ciclos de touchdown de 30 s a 94°C, 1 min a 60-56°C, 1 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

Se realizaron 2 controles negativos, uno sin la adición de ADN y otro con la adición de ADN plasmídico que carece de la secuencia blanco para la amplificación de actina. Como control positivo se utilizó ADN extraído de una planta de girasol crecida a campo.

3.11.2.2. PCR nptII

Se evaluó la presencia del transgén por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos que amplifican una región interna correspondiente al gen nptII. La reacción de amplificación fue realizada en una mezcla de reacción con las mismas condiciones que las detalladas para la PCR actina (ítem 3.11.2.1) utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5' CAGACAATCGGCTGCTCTGAT 3' y 5' TGCGATGTTTCGCTTGGTGGT 3' que generan un producto esperado de 343 pb.

Las condiciones de la reacción fueron 10 min a 94°C, 40 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

Se realizaron 2 controles negativos, uno sin la adición de ADN y otro con la adición de ADN de una planta no transformada, y un control positivo utilizando ADN del plásmido utilizado para la transformación.

3.11.2.3. PCR ch5B

Se verificó la presencia del transgén por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos de secuencias internas del promotor CaMV35S y del gen ch5B de quitinasa. La reacción de amplificación fue realizada en una mezcla de reacción con las mismas condiciones detalladas para la PCR actina (ítem 3.11.2.1) utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5' CGCACAATCCCACTATCCTT 3' y 5' GAGGGCGCTGAGATCAGTAG 3' siendo el producto esperado de aproximadamente 400 pb.

Las condiciones de la reacción fueron 2 min a 94°C, 8 ciclos de touchdown de 1 min a 94°C, 1 min a 58-50°C, 1 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 1 min a 94°C, 1 min a 50°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

Se realizaron 2 controles negativos, uno sin la adición de ADN y otro con la adición de ADN de una planta no transformada, mientras que para el control positivo se utilizó ADN del plásmido usado para la transformación.

3.11.2.4. PCR GUS

La detección del transgén por PCR fue realizada utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos que amplifican una región interna correspondiente al gen de la enzima β -glucuronidasa. La reacción de amplificación fue llevada a cabo en una mezcla de reacción conteniendo buffer Green GoTaq (1x, Promega, EUA), Taq DNA polimerasa (1 U, Invitrogen, EUA), 0,5 mM de MgCl₂, una concentración de 0,2 mM de dNTPs y 0,1 μ M de cada oligonucleótido iniciador (5' CCCTTACGCTGAAGAGATGC 3' y 5' GTTCATGCCAGTCCAGCGTT 3') en un volumen final de 50 μ L. El producto esperado fue de 781 pb.

Para algunas muestras fue necesario utilizar buffer (1x, Invitrogen, EUA), Platinum Taq DNA polimerasa (1 U, Invitrogen, EUA), 2,5 mM de MgCl₂ con la misma concentración de dNTPs y oligonucleótidos iniciadores.

Las condiciones de la reacción fueron 2 min a 94°C, 5 ciclos de touchdown de 30 s a 94°C, 1 min a 60-56°C, 1 min a 72°C, seguido de 30 ciclos de 30 s a 94°C, 1 min a 55°C, 1 min a 72°C y una última etapa de 10 min a 72°C.

Se realizaron 2 controles negativos, uno sin la adición de ADN y otro con la adición de ADN de una planta no transformada y, un control positivo utilizando ADN del plásmido utilizado para la transformación.

3.11.2.5. PCR nos

Se chequeó la presencia del transgén por PCR utilizando oligonucleótidos iniciadores específicos que amplifican el promotor nos que regula la expresión del gen nptII en las construcciones del vector pKGWFS7,0. La reacción de amplificación fue realizada utilizando los oligonucleótidos iniciadores 5' GCCTCGATCGAGTTGAGAGTGA 3' y 5' CGGGTACCGAGCTCGAATTA 3' siendo el producto esperado de 310 pb. Se utilizó una mezcla de reacción con las mismas condiciones que la PCR GUS (ítem 3.11.2.4) siendo también necesario para algunas muestras utilizar la mezcla de reacción con Platinum Taq DNA polimerasa.

3.12. Southern blot

3.12.1. Extracción de ADN genómico

La extracción de ADN genómico para la detección de los transgenes mediante Southern blot se realizó según el protocolo descrito por Saghai-Marroof y col. (1984) y según se describe en el ítem 3.11.1 con variación en los volúmenes de las soluciones. Se utilizaron 9 mL de buffer CTAB, 4,5 mL de cloroformo:octanol (24:1), 6 mL de isopropanol, 4 mL de solución de lavado N°1 y 2 mL de solución de lavado N°2.

Adicionalmente, luego de la precipitación con isopropanol y previo a los lavados con las soluciones N°1 y N°2 se resuspendió el ADN en 1 mL de TE a 4°C ON. Se agregó 1 mL de fenol equilibrado, se mezcló suavemente, se centrifugó 20 min a 1.500 x g y se transfirió la fase acuosa superior a un tubo nuevo. Luego, se agregó 1 mL de cloroformo:octanol, se mezcló suavemente por inversión, se centrifugó 15 min a 1.500 x g y se transfirió la fase acuosa superior a un tubo nuevo. Se precipitó el ADN en 100 µL de acetato de sodio 3 M pH 5,2 y 3 mL de etanol absoluto a -20°C ON. Luego, se centrifugó 15 min a 9.500 x g y se descartó el sobrenadante. Posteriormente se realizaron los lavados, se dejó secar el ADN y se lo dejó resuspendiendo en TE a 4°C ON.

Se evaluó la concentración de ADN obtenida midiendo la absorbancia a 260 nm (NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer, NanoDrop Technologies Inc., EUA). La calidad del ADN fue dada por las relaciones 260/280 y 260/230.

3.12.2. Digestión enzimática de ADN

Se digirieron 20 µg de ADN por muestra a 37°C ON, con 60 U de la enzima de restricción NcoI (New England Biolabs, EUA) en un volumen final de 50 µL, para hibridar luego con la sonda gus993-1390. El ADN fue tratado con ARNasa A (0,05 mg/mL) al mismo tiempo de la restricción. Luego, se precipitó la digestión a -20°C ON por el agregado de acetato de sodio a una concentración final de 0,3 M y de 3 volúmenes de etanol absoluto. Finalmente, se resuspendió en 20 µL de H₂O.

3.12.3. Separación de los fragmentos de restricción por electroforesis

La separación de los fragmentos de restricción se realizó mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa (0,8 %) en buffer TAE (1x), con bromuro de etidio (0,5 µg/mL), a 1 V/cm, durante aproximadamente 16 horas. El marcador de peso molecular que se utilizó fue 1 kb Plus DNA ladder (Invitrogen, EUA). Como referencia de separación adecuada de los fragmentos de restricción se utilizó la distancia de corrida de la banda correspondiente al azul de bromofenol presente en el buffer de siembra, considerando una separación adecuada cuando la misma alcanza los 12 cm desde el punto de siembra.

3.12.4. Tratamiento del gel previo a la transferencia

Se colocó el gel en un contenedor plástico cubriéndolo con HCl 0,125 M durante 10 min. Luego, se enjuagó con agua bidestilada, se realizó una incubación de 30 min en solución de desnaturalización con agitación suave y se enjuagó nuevamente en agua bidestilada. Finalmente se realizó una incubación con solución neutralizante de 30 min con agitación suave.

3.12.5. Transferencia del ADN a la membrana de nylon (Southern blot)

Los fragmentos de ADN separados en el gel de agarosa se transfirieron a una membrana de nylon, Hybond N+ (Amersham Biosciences, Reino Unido), por transferencia por capilaridad utilizándose como buffer SSC 10x pH 7. Posteriormente se fijó el ADN a la membrana por exposición a una fuente de luz UV con una energía de 0,012 J/cm².

3.12.6. Preparación de las sondas

La sonda gus993-1390 (figura 6) corresponde al fragmento de 398 pb correspondientes a los nucleótidos 993 a 1390 de la secuencia del gen reportero GUS.

Para obtener esta sonda se realizó una reacción de PCR utilizando como templado ADN del vector pKGWFS7,0 con el promotor rbcS1. La reacción fue llevada a cabo en una mezcla de reacción conteniendo buffer (1x, Invitrogen, EUA), Platinum Taq DNA polimerasa (1 U, Invitrogen, EUA), 2,5 mM de MgCl₂, una concentración de 0,2 mM de dNTPs y 0,1 µM de cada oligonucleótido iniciador (5' CCCTTACGCTGAAGAGATGC 3' y 5' GGCACAGCACATCAAAGAGA 3') en un volumen final de 50 µL. La reacción se llevó a

cabo en un termociclador modelo PTC-100 (Programmable Thermal Controller, M.J. Research, EUA) con las condiciones de la reacción indicadas en el ítem 3.11.2.4.

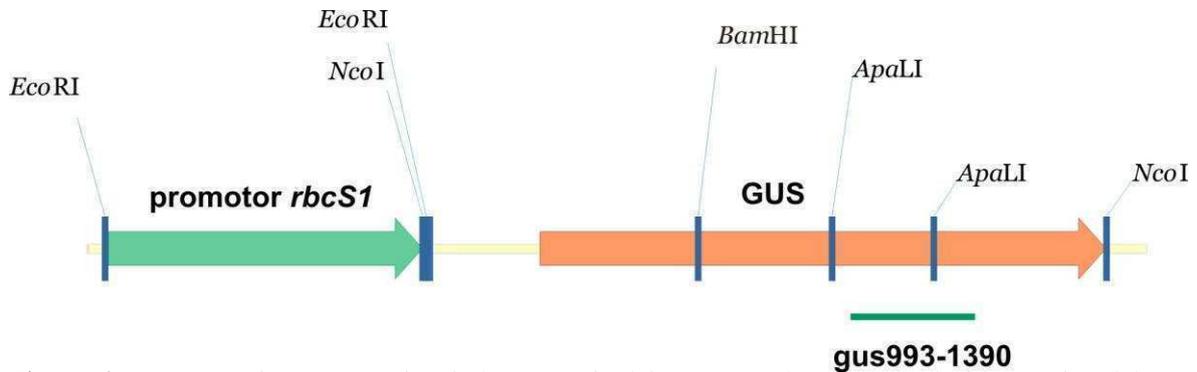


Figura 6. Representación esquemática de la secuencia del promotor *rbcS1* regulando la expresión del gen reportero *GUS*. Se indican los sitios de corte de la enzima *EcoRI* y los de otras enzimas de restricción. Se indica con una línea el fragmento a partir del cual se obtuvo la sonda *gus993-1390*.

Diez microlitros del producto de PCR se sometieron a electroforesis horizontal en agarosa (0,8 %) en buffer TAE (1x) para verificar la reacción. Luego, a partir de los 40 μ L restantes, se purificó la banda de interés con GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit (GE Healthcare, Reino Unido) según las especificaciones del fabricante. Finalmente, 20 ng del ADN purificado se marcaron utilizando [α - 32 P] dCTP y Prime-a-Gene Labeling System (Promega, EUA) según las instrucciones del fabricante.

3.12.7. Hibridación y detección

Las membranas se colocaron en botellas de hibridación (Biometra, Alemania) y se prehibridaron e hibridaron en horno con rotación constante (Thermo Scientific, EUA) con 10 mL de ULTRAhyb Ultrasensitive Hybridization Buffer (Ambion, EUA).

La prehibridación se realizó a 42°C durante 4 h, mientras que la hibridación con la sonda, marcada con [α - 32 P] y desnaturalizada con 40 μ L de NaOH 0,5 M, fue durante 18 h a la misma temperatura. Transcurrido el tiempo establecido, se realizaron dos lavados con agitación a 42°C con SSC (2x), SDS (0,1%), de 5 min cada uno; seguidos de otro también en agitación con SSC (0,1x), SDS (0,1%), a 42°C de 10 min.

Las membranas se expusieron en una placa Imaging Plate en un cassette Fujifilm BAS (Fujifilm, Japón) durante 3 días. Luego, la placa fue escaneada utilizando el equipo Typhoon Trio Variable Mode Imager (Amersham Biosciences, Reino Unido).

3.13. Medios de Cultivo

Las sales, drogas, antibióticos y medios de cultivo utilizados fueron de las firmas Sigma Aldrich y PhytoTechnology Labs, EUA, excepto las especificadas en el texto.

Los medios de cultivo fueron autoclavados durante 20 min a 1,5 MPa. Las soluciones de antibióticos o de drogas termolábiles fueron esterilizadas por filtración en filtros de 0,2 µm (Millipore, Inglaterra).

3.13.1. Cultivos Bacterianos

LB (Luria Bertani): Extracto de levadura 5 g/L; Bactotripton (DIFCO, EUA) 10 g/L; NaCl 10 g/L. pH 7. Para medio sólido: Agar Tipo A 15 g/L.

Medio Mínimo A: KH_2PO_4 10,5 g/L; K_2HPO_4 4,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L; Citrato de sodio dihidrato 0,5 g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0,2 g/L; Glucosa 2 g/L. pH 7. Para medio sólido: Agar Tipo A 10 g/L.

AIM: K_2HPO_4 10,5 g/L; KH_2PO_4 4,5 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g/L; Citrato de sodio dihidrato 5 mg/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 4,06 µg/L; Glucosa 2 g/L; Glicerol 5 mL/L. pH 6,5-7. Conservación en oscuridad.

3.13.2. Cultivos Vegetales

MS (Murashige Skoog) 1/2: MS Sales 2,15 g/L; Sacarosa 10 g/L; Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7.

MS Vitaminas: Glicina 2 mg/L; Mioinositol 100 mg/L; Ácido nicotínico 0,5 mg/L; Piridoxina HCl 0,5 mg/L; Tiamina HCl 0,1 mg/L.

Cocultivo: MS Sales 4,3 g/L; MS Vitaminas 2 mL/L; KNO_3 3,1 g/L; Mioinositol 200 mg/L; Caseína 500 mg/L; Sacarosa 30 g/L; Glucosa 10 g/L; buffer MES (ácido 4-Morfolinoetanosulfónico) pH 5,7 0,5 g/L; Agar Tipo A 8 g/L. Adiciones luego de la esterilización por autoclavado: BAP (6-bencilaminopurina) 0,5 mg/L; ANA (ácido 1-naftalenacético) 0,2 mg/L; Acetosiringona 20 mg/L.

Re Base (Medio de Regeneración): MS Sales 4,3 g/L; MS Vitaminas 2 mL/L; KNO_3 3,1 g/L; Mioinositol 200 mg/L; Sacarosa 30 mg/L; Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7.

Para obtener cada uno de los medios de regeneración se adiciona al medio Re Base, luego de la esterilización por autoclavado; lo siguiente:

Re1: Timentina 0,3 g/L; BAP 0,2 mg/L; ANA 0,01 mg/L; AgNO₃ 0,82 µg/L.

Re2: Timentina 0,3 g/L; BAP 0,2 mg/L; AgNO₃ 0,82 µg/L.

Re3: Timentina 0,3 g/L; BAP 0,1 mg/L; AgNO₃ 0,82 µg/L.

Re4: Timentina 0,3 g/L; AgNO₃ 0,82 µg/L

RA (Medio de enraizamiento): MS sales 2,1 mg/L; Tiamina HCl 5 µg/L; Mioinositol 50 mg/L; Sacarosa 10 g/L; Ancimidol 0,5 mg/L; Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7. Adiciones luego de la esterilización por autoclavado: Timentina 0,3 g/L; ANA 0,1 g/L.

UM Vitaminas: Glicina 2 mg/L; Mioinositol 100 mg/L; Ácido nicotínico 5 mg/L; Piridoxina HCl 10 mg/L; Tiamina HCl 10 mg/L.

UM: MS Sales 4,3 g/L; UM Vitaminas 10 mL/L; Hidrolizado de caseína o triptona 2 g/L; Sacarosa 30 g/L; Para medio sólido: Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7. Adiciones luego de la esterilización por autoclavado: ácido 2,4-diclorofenoxiacético 2 mg/L; Kinetina 0,25 mg/L.

Medio de regeneración de lechuga: MS Sales 4,3 g/L; MS Vitaminas 2 mL/L; Sacarosa 30 mg/L; Agar Tipo A 8 g/L. pH 5,7. Adiciones luego de la esterilización por autoclavado: BAP 0,5 mg/L; ANA 0,04 mg/L; Timentina 250 mg/L; Kanamicina 50 mg/L.

SIM: MS sales 4,3 g/L; MS vitaminas 2 mL/L; Sacarosa 30 g/L; Agar Tipo A: 8 g/L; Tiamina HCl 1 mg/L; trans-zeatina 2 mg/L; Timentina 250 mg/L.

3.14. Soluciones

TAE (Tris-Acetato EDTA) 1x: Tris-acetato 40 mM; EDTA 1 mM pH 8.

TE (Tris EDTA): Tris-Cl pH 7,5 100 mM; EDTA 10 mM pH 8.

3.14.1. Extracción de ADN plasmídico

Solución I: Glucosa 50 mM; Tris HCl 25 mM pH 8; EDTA 10 mM pH 8

Solución II: NaOH 0,2 M; SDS 1 %

Solución III: Acetato de potasio 3 M; Ácido acético (Merck, Alemania) 5 M

3.14.2. Detección histoquímica de GUS

Buffer fosfato 0,1 M pH 7: NaH_2PO_4 57,7 mM; Na_2HPO_4 42,3 mM

Solución de revelado: Buffer fosfato pH 7 200 mL/L; EDTA sal sódica pH 8 10 mM; Tritón X-100 0,1 %; Ferrocianuro de potasio 5 mM; Ferrocianato de Potasio 5 mM; X-Gluc (ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónico) 1 g/L en dimetilformamida (J. T. Baker, Holanda).

3.14.3. Cuantificación fluorométrica de MUG

Buffer de extracción de MUG: Buffer fosfato pH 7 50 mM; Mercaptoetanol 10 mM; EDTA sal sódica pH 8 10 mM; N-laurilsarcosina 0,1 %; Tritón X-100 0,1 %.

Buffer de reacción de MUG: MUG (4-metilumbeliferil- β -D-glucuronido) 3,75 mg/mL en buffer de extracción de MUG.

3.14.4. Extracción de ADN genómico

Buffer CTAB: Tris pH 7,5 100 mM; Tris pH 7,5 700 mM; EDTA sal sódica pH 8 50 mM; CTAB (Cetyl Trimethyl Ammonium Bromide, bromuro de cetiltrimetilamonio) 1 %; Mercaptoetanol 140 mM; PVP (polivinilpirrolidona) 1 %.

Solución de lavado N°1: Etanol absoluto (Merck, Alemania) 76 %; Acetato de sodio 0,2 M.

Solución de lavado N°2: Etanol absoluto (Merck) 76 %; Acetato de amonio 10 mM.

3.14.5. Southern blot

Solución de desnaturalización: NaOH 0,5 M; NaCl 1,5 M.

Solución neutralizante: Tris 1 M; NaCl 1,5 M. pH 7,5.

SSC 20x: Citrato de sodio tribásico 0,3 M; NaCl 3 M. pH 7.

Resultados

4. Resultados

4.1. Rediseño de estrategias para la selección de plantas regenerantes transgénicas resistentes al antibiótico kanamicina

Previamente, se determinó que el criterio más efectivo para la selección de plantas regenerantes transgénicas resistentes al antibiótico kanamicina era la formación de raíces *in vitro* (Radonic, 2005). Con este criterio se obtuvo una eficiencia del 0,7 %, determinada como el porcentaje del número de brotes enraizados sobre el total de brotes agroinfectados en medio de enraizamiento. Asimismo, se estableció que la selección por el aspecto o coloración de las plántulas no era posible, ya que numerosos brotes no transformados, incluyendo los controles, presentaban coloración verde sin zonas decoloradas o cloróticas.

Con la finalidad de optimizar este protocolo y aumentar la eficiencia de selección, se probaron 3 esquemas distintos de aplicación del antibiótico (ítem 3.6.8), en los cuales se aumentó gradualmente su concentración.

Este trabajo se realizó utilizando el vector de transformación pHGC39, portador de los genes antifúngicos glucanasa y quitinasa, mientras que el trabajo mencionado anteriormente había sido realizado con la construcción GUS-intrón (ítem 3.1.1, figura 2).

Con el primer esquema de selección (kan 1, 10 y 50 mg/L) se obtuvieron 3 brotes enraizados, los cuales dieron un resultado positivo mediante el análisis para la detección de *nptII* o *ch5B* por PCR (ítems 3.11.2.2 y 3.11.2.3), resultando en una eficiencia de 1,26 % (3 brotes positivos sobre un total de 238 brotes tratados para agroinfección). Con el segundo (kan 1, 10, 25 mg/L) y tercer esquema (1, 10, 25 y 50 mg/L) se obtuvieron 2 y 3 brotes enraizados (de un total de 55 y 38 brotes respectivamente) los que dieron un resultado negativo en el análisis por PCR. Estos resultados indicarían que es necesaria la selección con kanamicina en una concentración de 50 mg/L utilizada a partir del tercer medio de regeneración (Re3) para evitar la obtención de escapes.

De esta forma, quedó establecido como más adecuado, el primer esquema de aplicación gradual del antibiótico.

4.2. Agroinfección con genes antifúngicos

Para obtener plantas de girasol que expresen genes antifúngicos se realizó la agroinfección utilizando las construcciones pHCA35, portadora de los genes de quitinasa y una osmotina, y pHGC39, portadora de los genes de glucanasa y quitinasa (ítem 3.1.2, figura 3). Para la selección se usó el esquema de aplicación del antibiótico kanamicina establecido en el punto anterior.

Con la construcción pHCA35 se realizaron 7 ensayos con los que se obtuvieron un total de 452 brotes de los cuales ninguno produjo raíz. En cambio, con la construcción pHGC39 se obtuvieron 30 brotes con raíz, de un total de 2.326 brotes agroinfectados, que a su vez dieron un resultado positivo en el análisis por PCR. La eficiencia con esta construcción fue de 1,29 %.

Los brotes control sin agroinfectar (557) nunca formaron raíces en presencia del antibiótico kanamicina, por lo que el esquema de aplicación gradual del antibiótico determinado en el ítem 4.1 resultó igual de eficiente que el esquema previamente establecido.

El aspecto de las raíces de los brotes agroinfectados fue muy diferente al de las que produjeron brotes sin transformar en un medio sin selección. Mientras que los controles en un medio sin antibiótico formaron una raíz principal con numerosas raíces secundarias (figura 7, A), en presencia de kanamicina aquellas plántulas que enraizaron presentaron una raíz principal sin formación de raíces secundarias y de longitud variable, que no superó los 3 cm (figura 7, B, C y D).

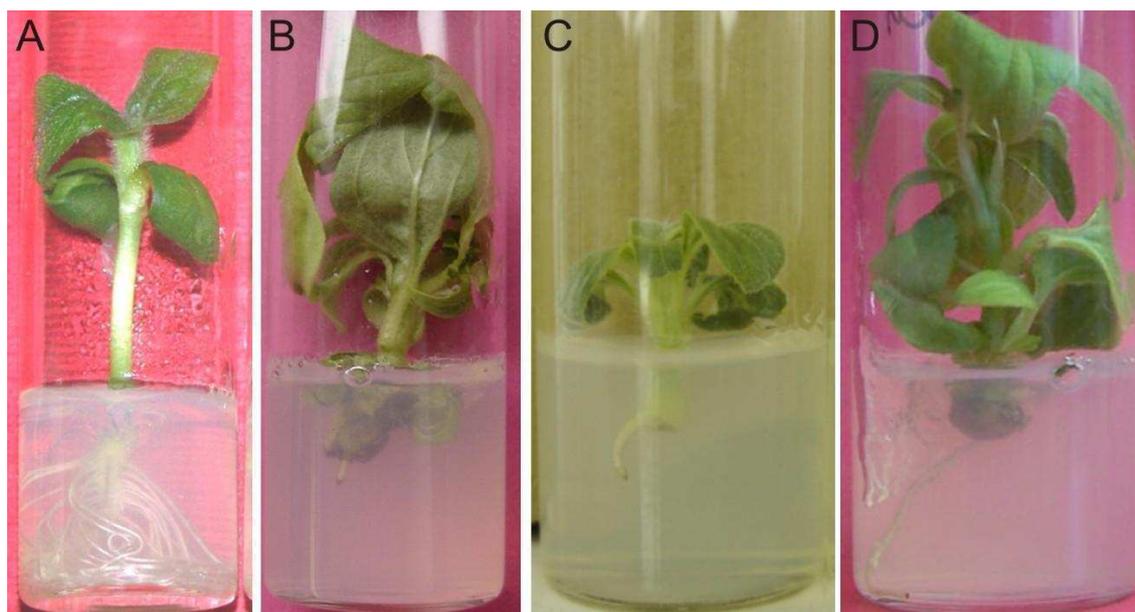


Figura 7. Brotes de girasol in vitro. **A** Brote control enraizado en medio sin kanamicina, el cual presenta una raíz principal con numerosas raíces secundarias. **B, C y D** Brotes agroinfectados con los genes antifúngicos enraizados en medio con kanamicina presentando sólo una raíz principal pequeña.

Una vez finalizado el período de cultivo *in vitro*, las plántulas fueron transferidas al invernáculo. El pasaje se realizó mediante injerto (figura 8, A y C) o a tierra (figura 8, B) dependiendo del tamaño de la raíz y del aspecto de cada brote. En ambos casos los brotes tuvieron un desarrollo moderado, alcanzando mayoritariamente alturas de 15 a 30 cm, aunque muy pocas una altura de no más de 1 m. Por otra parte, en algunos casos se observó la pérdida de la dominancia apical (figura 8, C). Todas las plantas obtenidas produjeron capítulos florales pequeños, los cuales produjeron en su mayoría achenios vacíos.

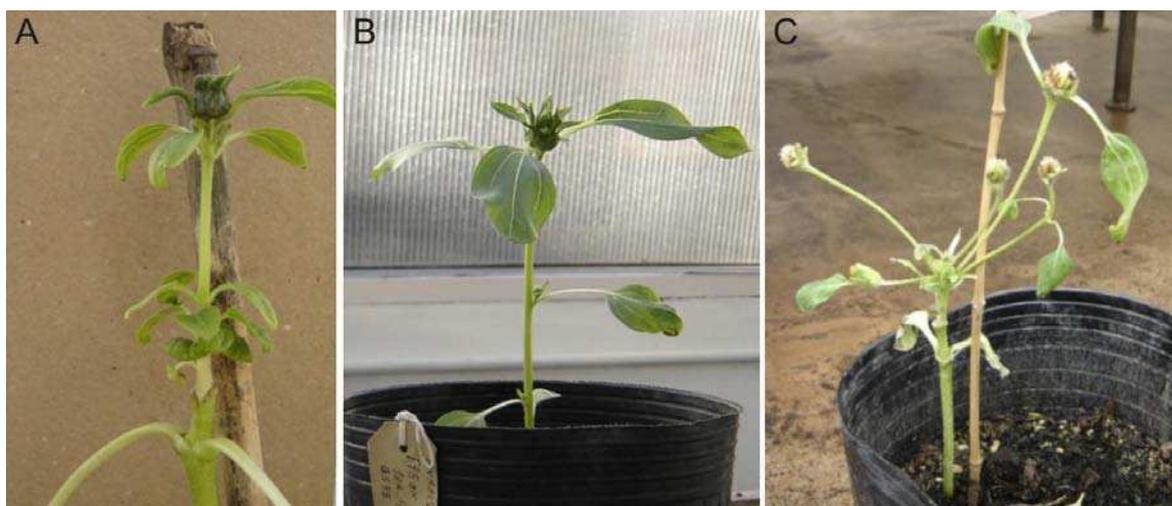


Figura 8. Brotes de girasol transferidos al invernáculo. Brotes injertado (A) y transferido directamente a tierra (B) ambos con un solo capítulo pequeño. Brote injertado sin dominancia apical que presenta numerosos capítulos pequeños (C).

En forma paralela, dentro de las actividades del grupo de trabajo, se transformó con un vector que expresa los genes antifúngicos de una glucanasa, una quitinasa, una osmotina (ap24) y de una proteína inhibidora de ribosomas (RIP) que se traducen como una sola poliproteína bajo la regulación del promotor CaMV35S- Ω TMV. Cada gen se encuentra precedido por la secuencia de reconocimiento de la proteasa NIa del Tobacco Etch Virus (TEV), la cual se expresa dentro de la poliproteína y tiene capacidad de autoclivarse. Este vector poseía también el gen de resistencia a nptII, bajo la regulación del promotor nos.

Se realizaron ensayos de transformación utilizando el esquema de selección establecido en Radonic (2005), aplicando kanamicina 50 mg/L en los medios Re3, Re4 y RA, donde ninguno de los 422 brotes control fue capaz de enraizar. Los 1.524 brotes obtenidos de los explantos tratados para la transformación con este vector presentaron aspecto de hiperhidricidad, con áreas necróticas, crecimiento anormal al final del cultivo de tejidos y, probablemente asociado con este comportamiento *in vitro*, ninguno enraizó en el medio de selección conteniendo kanamicina.

4.3. Análisis de la expresión regulada por el promotor CaMV35S en girasol y lechuga

Durante la puesta a punto del protocolo de selección en kanamicina (Radonic, 2005) se realizó el análisis de la expresión de la enzima β -glucuronidasa regulada por el promotor CaMV35S mediante detección histoquímica de GUS en las hojas de la descendencia (T1) de los brotes obtenidos en la transformación con la construcción GUS-intrón (figura 2). En este análisis se observó que la expresión de la enzima reportera era muy baja, siendo necesaria la incubación con el sustrato por un período de 60 h, en lugar de las 24 h realizadas usualmente, y el uso de lupa (20x) para la visualización de la tinción. La misma se observó solamente en los tricomas de la nervadura principal en la cara abaxial de hojas jóvenes (figura 9).

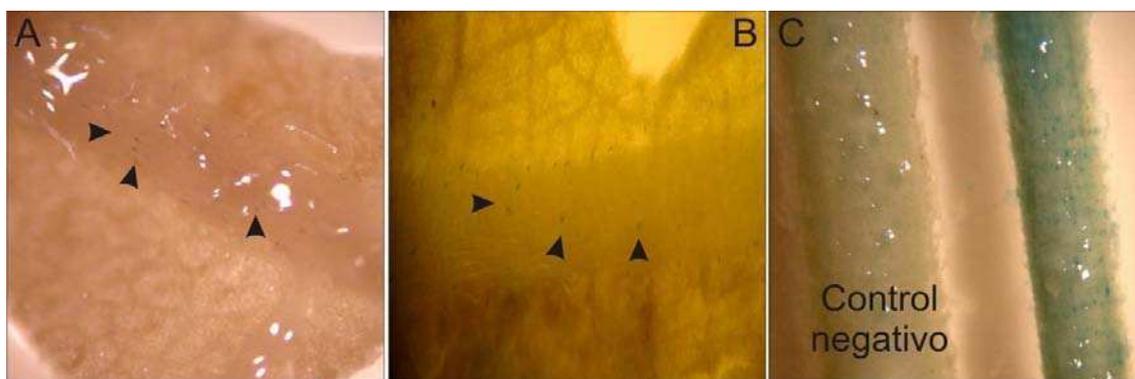


Figura 9. Patrón de actividad de la enzima β -glucuronidasa obtenido por tinción histoquímica de GUS. Hojas pertenecientes a plantas T1 con la construcción CaMV35S GUS-Intrón realizando la incubación en solución de revelado por 24 h (A, B) y por 60 h (C). La tinción se observa solamente en los tricomas de la cara abaxial de la hoja (señalados con flechas en A y B).

Por otra parte, dentro del grupo de trabajo también se realizó el mismo abordaje para lograr la puesta a punto de la selección con el herbicida glufosinato de amonio. En este caso, se utilizó un vector conteniendo la misma construcción para el gen reportero de la enzima β -glucuronidasa bajo la regulación del promotor CaMV35S pero con el gen de selección bar, en lugar del gen nptII, bajo la regulación del promotor nos. Cuando se analizaron los resultados obtenidos luego de la tinción histoquímica se pudo comprobar que en todos los casos el patrón de tinción fue similar al observado en el caso mencionado en el párrafo anterior (figura 10). Estos resultados, observados en 6 eventos de transformación diferentes, con 2 vectores de estructura idéntica, con excepción del gen de selección (bar o nptII), muestran un patrón consistente de expresión.

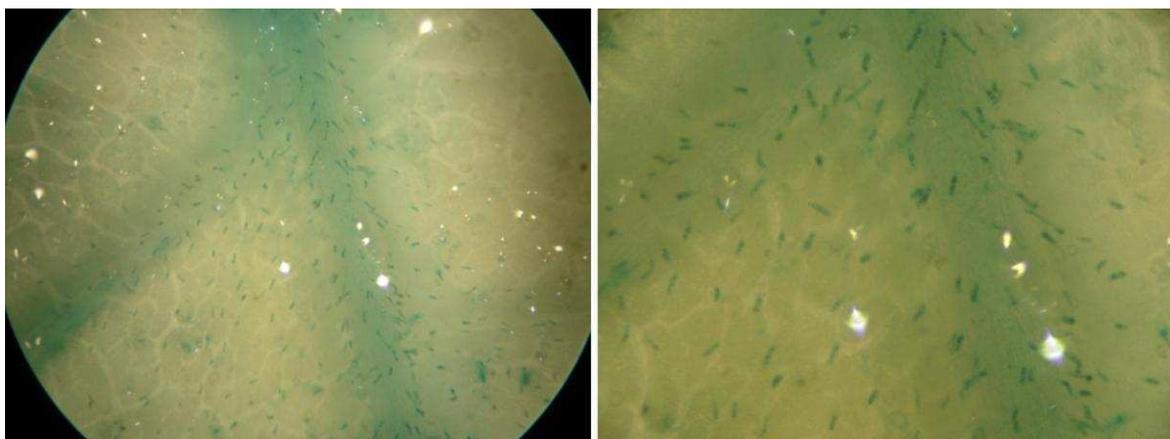


Figura 10. Patrón de actividad de la enzima β -glucuronidasa obtenido por tinción histoquímica de GUS. Hojas pertenecientes a plantas T1 obtenidas por selección con glufosinato de amonio. La tinción se observa en los tricomas de la cara abaxial de la hoja.

A partir de las T1 obtenidas, tanto de los ensayos de transformación de girasol por selección con kanamicina como con glufosinato de amonio, fue posible obtener la siguiente generación (T2). En el análisis de estas plantas T2 por detección histoquímica de GUS no se detectó tinción, por lo que se realizó la comprobación de la presencia de los transgenes mediante el análisis por PCR. De este modo, se observó la ausencia de amplificación, demostrando la ausencia de los transgenes. Este efecto de pérdida de los transgenes se encuentra descrito como inestabilidad de los transgenes.

Por lo expuesto anteriormente, no se prosiguió con la transformación y el análisis de plantas de girasol con las construcciones antifúngicas. Para hacer posible un futuro análisis de dichas construcciones, determinamos la necesidad de reemplazar al promotor CaMV35S.

4.3.1. Adaptación del protocolo de transformación de lechuga y análisis de la expresión de la construcción GUS-intrón

Con la finalidad de analizar si el patrón de tinción restringido a los tricomas se debía a un problema o característica intrínseca de la construcción utilizada para la transformación, se procedió a realizar ensayos de transformación estable de lechuga, con la construcción GUS intrón (ítem 3.1.1).

Para ello se adaptó el protocolo de transformación de Curtis y col. (1994a).

Las modificaciones introducidas al protocolo fueron las siguientes:

- 1) Utilización del cultivar Grand Rapids.
- 2) En la desinfección se adicionó un pasaje final en una solución de PPM a 4°C en oscuridad por una noche. Este pasaje disminuyó la contaminación al germinar las

semillas. El tratamiento con frío logró que se hiciera uniforme el momento de brotado de las plántulas.

- 3) Para aumentar la eficiencia de transformación, en la agroinfección y cocultivo se realizó el agregado de acetosiringona al medio UM, tanto líquido como sólido.
- 4) En la regeneración se incluyó un primer pasaje por 7 a 10 días en un medio conteniendo tiamina y trans-zeatina, sin agente selectivo (SIM). Este pasaje sin agente selectivo evitó la aparición de zonas necróticas, que se tradujo en una mayor tasa de regeneración a partir de los explantos, también favorecida por la utilización de trans-zeatina como regulador relacionado con la activa división celular.

En los sucesivos pasajes por el medio de regeneración de lechuga se reemplazó el antibiótico cefotaxima por timentina, mejorando la respuesta en general de los callos y el número de brotes obtenidos.

- 5) Se incluyó un paso de enraizamiento, escindiendo de los callos aquellos brotes que se desarrollaron en plántulas de 1 a 2 cm durante la regeneración, transfiriéndolos a medio MS con el agregado de la hormona ANA.

El protocolo final de transformación genética de lechuga se encuentra detallado en el ítem 3.7 de materiales y métodos.

Las plántulas de lechuga obtenidas a partir de los callos capaces de regenerar y enraizar en presencia del antibiótico, se llevaron al invernáculo para su desarrollo completo. En estas plantas la expresión del gen reportero GUS regulada por el promotor CaMV35S fue constitutiva, como se muestra en la figura 11, observándose la tinción a simple vista en todo el sistema vascular, mientras que con ayuda de lupa, se detectó la expresión en los estomas y el mesófilo de las hojas.

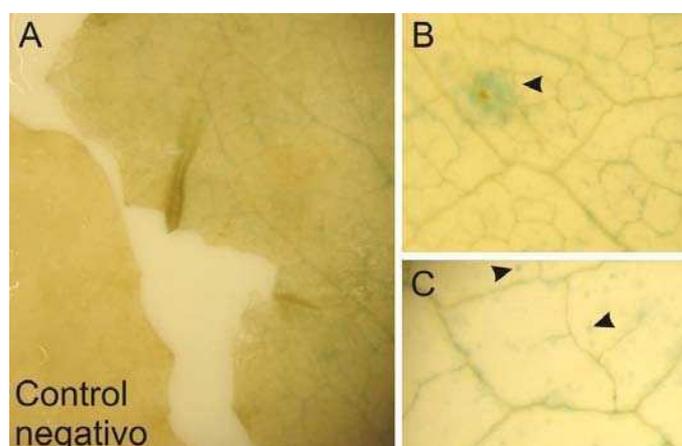


Figura 11. Determinación histoquímica de GUS para hojas de lechuga transformadas con la construcción CaMV35S GUS-intrón. **A** Hoja no transformada (izq, control negativo), hoja transformada (der). **B** Detalle de hoja donde se observa señalado por una flecha parte del mesófilo que presenta tinción. **C** Detalle de hoja donde se observan señalados con flechas algunos de los estomas que presentan tinción.

De esta forma se mostró que el vector es completamente funcional y que la expresión del gen reportero en lechuga tenía las características propias de un gen regulado por el promotor constitutivo CaMV35S.

4.4. Análisis de la expresión de distintos promotores

Debido a los resultados expuestos en el ítem 4.3, así como a los datos bibliográficos relacionados con la utilización del promotor CaMV35S en varias especies, y en particular, en especies de la misma familia que el girasol (inestabilidad de los transgenes en lechuga y niveles de actividad no detectables en crisantemo) se vio la necesidad de realizar un cambio de los promotores utilizados en la transformación de girasol.

Con esta finalidad se seleccionaron los siguientes promotores para realizar 5 construcciones con el vector binario Gateway pKGWFS7,0:

- CaMV35S con el enhancer Ω del TMV: este promotor se utilizó por estar presente en las construcciones con genes antifúngicos utilizadas en este trabajo de tesis y en las publicaciones de transformación de girasol, y para poder realizar su comparación con los demás promotores teniendo el mismo fondo genético del vector Gateway pKGWFS7,0.
- 2X35S: se seleccionó por ser uno de los más usados en transformación.
- rbcS1: este promotor fue seleccionado porque en la transformación genética de crisantemo presentaba actividad, a diferencia de lo que ocurría con el CaMV35S, cuyos niveles de actividad no eran detectables (Outchkourov y col., 2003).
- nos: el análisis de este promotor se realizó por ser muy utilizado, especialmente, en la regulación de la expresión del gen de resistencia al agente selectivo. En nuestro caso, fue utilizado para regular la expresión de los genes nptII o bar, en todas las construcciones utilizadas.
- PPC: promotor utilizado con éxito en la transformación de lechuga, dado que otorga estabilidad a los transgenes (McCabe y col., 1999), a diferencia de lo que ocurre con el promotor CaMV35S.

Para la obtención de los distintos promotores se realizaron reacciones de amplificación por PCR con oligonucleótidos iniciadores específicos a partir de distintos vectores (ítem 3.4.1). Posteriormente, para la purificación de los productos de PCR se realizó una electroforesis, y se utilizó QIAEX II Gel Extraction Kit o QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN, Alemania) siguiendo las indicaciones del fabricante. Se muestra como ejemplo la electroforesis realizada para el producto de la amplificación del promotor nos (figura 12).

Una vez obtenida la secuencia de cada promotor, se realizó la ligación en el vector pCR8/GW/TOPO TA y se realizó la verificación de la orientación en la cual se produjo la

ligación. Para ello, se realizó una digestión con enzimas de restricción seleccionadas de tal forma que proporcionaran esta información (ítem 3.4.6, Tabla 2); como ejemplo se muestra la electroforesis realizada para visualizar los productos de la digestión con las enzimas de restricción *SacI* y *XbaI* de la ligación del vector pCR8/GW/TOPO TA con el fragmento conteniendo el promotor CaMV35S- Ω TMV (figura 13).

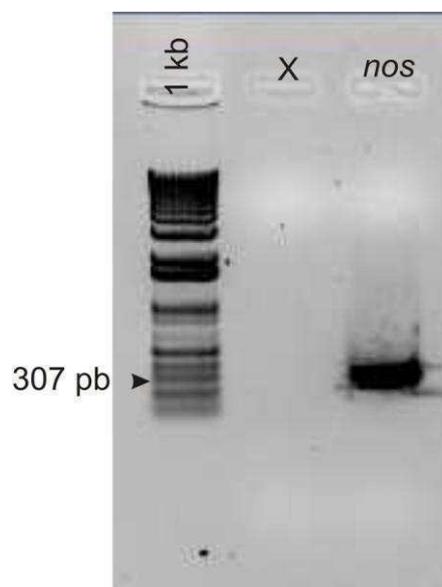


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) en buffer TAE (1x) a 5 V/cm del producto de amplificación de la PCR nos a partir de la cual se realizó la purificación del promotor. 1 kb: 1 kb Plus DNA ladder; X: calle vacía.

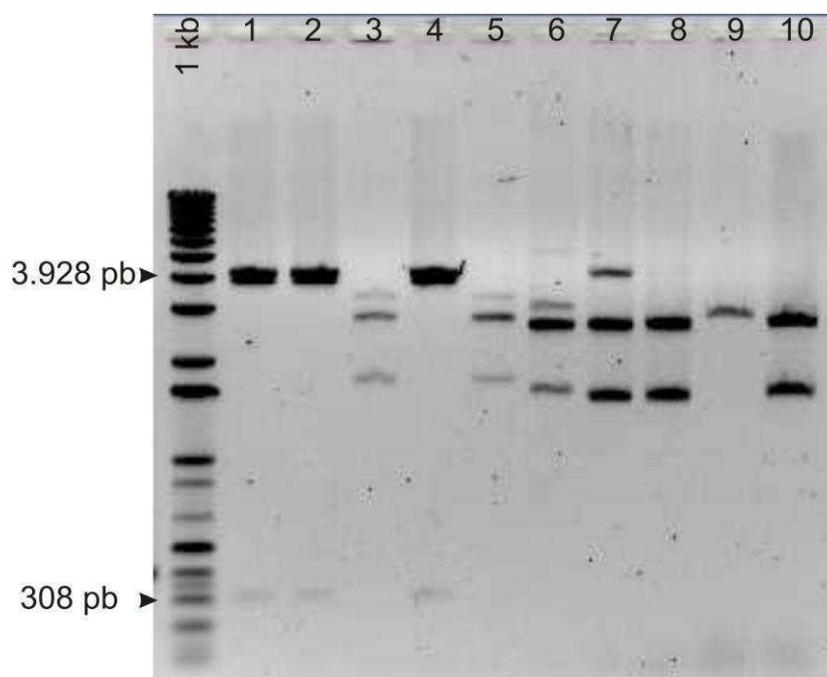


Figura 13. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) con bromuro de etidio (0,5 μ g/mL) en buffer TAE (1x) a 5 V/cm del producto de la digestión con las enzimas *SacI* y *XbaI* para verificar la orientación de las ligaciones obtenidas del fragmento del promotor CaMV35S- Ω TMV con el vector pCR8/GW/TOPO TA. Los fragmentos esperados de 3.928 y 308 pb se encuentran señalados. Las ligaciones 1, 2 y 4 son orientadas, las restantes se encuentran invertidas o no se produjo ligación. 1 kb: 1 kb Plus DNA ladder.

Luego, se realizó la recombinación del vector pCR8/GW/TOPO TA conteniendo el promotor orientado con el vector binario pKGWFS7,0. Esta recombinación se verificó mediante la digestión con enzimas de restricción (ítem 3.4.7, Tabla 3); como ejemplo, se exhibe la digestión realizada con las enzimas de restricción HindIII y NcoI para la verificación de la recombinación del vector pCR8/GW/TOPO TA conteniendo el promotor PPC y el vector pKGWFS7,0 (figura 14).

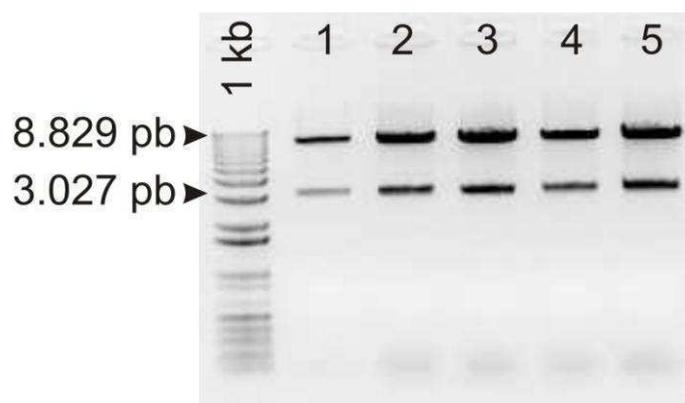


Figura 14. Electroforesis en gel de agarosa (0,8 %) con bromuro de etidio (0,5 µg/mL) en buffer TAE (1x) a 5 V/cm del producto de la digestión con las enzimas HindIII y NcoI para verificar la recombinación del vector pKGWFS7,0 con el vector pCR8/GW/TOPO TA llevando el promotor PPC. Los fragmentos esperados de 8.829 y 3.027 pb se encuentran señalados. Todas las muestras analizadas presentaron la recombinación esperada. 1 kb: 1 kb Plus DNA ladder.

Para su posterior utilización en distintas técnicas de transformación, las cinco construcciones obtenidas fueron introducidas mediante electroporación en *Agrobacterium tumefaciens* de 3 cepas diferentes: GV3101, LBA4404 y EHA105.

4.4.1. Agroinfiltración de *Nicotiana benthamiana* con las construcciones conteniendo los distintos promotores

Para verificar la funcionalidad de las construcciones obtenidas del vector pKGWFS7,0 conteniendo los promotores CaMV35S- Ω TMV, 2X35S, nos, rbcS1 y PPC dirigiendo la expresión del gen de la β -glucuronidasa se realizó la agroinfiltración de plantas de *Nicotiana benthamiana* de 3 semanas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* cepa GV3101. En la figura 15, se muestra el análisis por detección histoquímica de GUS de las hojas agroinfiltradas con una misma construcción en distintas posiciones, observándose que todas las construcciones resultaron funcionales en *Nicotiana benthamiana*.

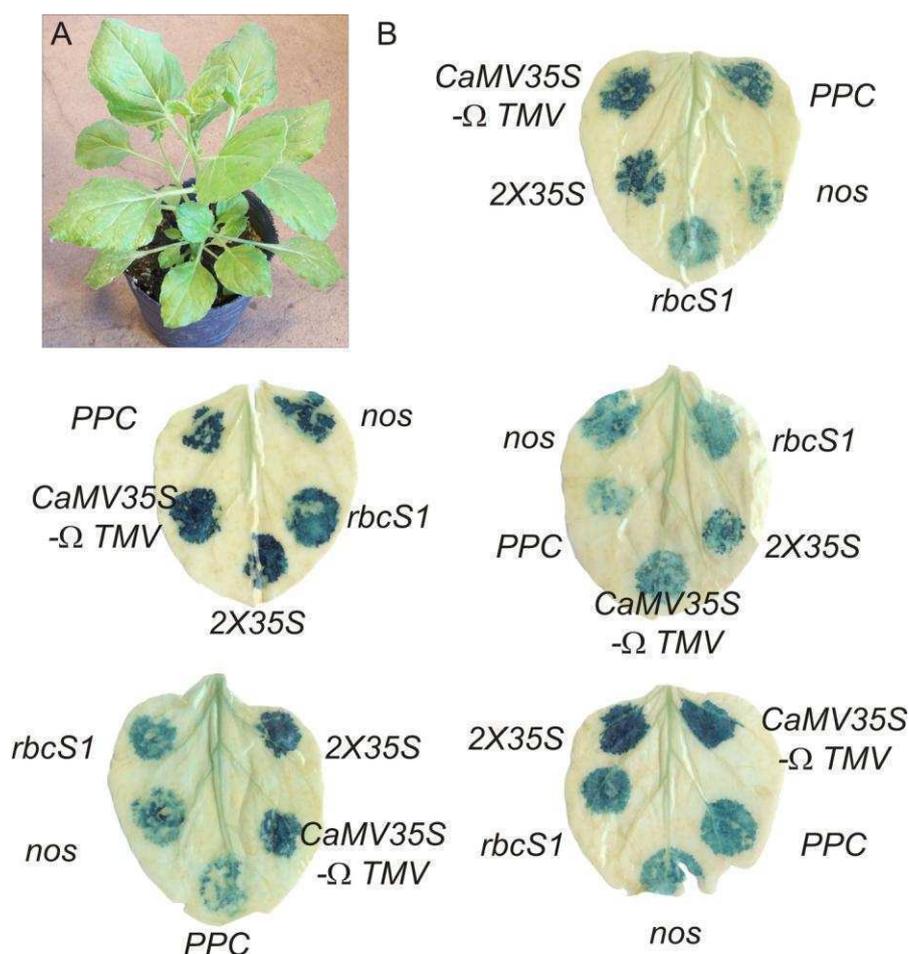


Figura 15. Detección histoquímica de la proteína reportera dirigida por los distintos promotores en ensayos de agroinfiltración en hojas de *Nicotiana benthamiana*. **A** Planta de *N. benthamiana* de 3 semanas utilizada para la agroinfiltración. **B** Hojas agroinfiltradas con la cepa GV3101 transformada con las construcciones del vector pKGWFS7,0 con los promotores CaMV35S-Ω TMV, 2X35S, nos, rbcS1 y PPC dirigiendo la expresión de la enzima β-glucuronidasa.

4.4.2. Puesta a punto de la técnica de agroinfiltración en girasol

La puesta a punto de la técnica de agroinfiltración en plantas de girasol fue realizada para analizar la funcionalidad y actividad de los promotores evitando el uso de un sistema heterólogo. Este estudio se realizó con la construcción del vector pKGWFS7,0 conteniendo el promotor rbcS1.

Para evaluar la influencia del estadio de desarrollo en la agroinfiltración, se compararon los estadios V2 y V12 (figura 16). Para ello, se agroinfiltraron las hojas pertenecientes al único par de hojas de la planta V2 y del sexto par de hojas (par superior) de las plantas V12. La suspensión bacteriana se esparció dentro de las hojas de plantas en el estadio de desarrollo V2, ya que la epidermis era más blanda. En contraste, la epidermis de las hojas de las plantas

V12 era más gruesa y rígida, por lo que presentaron mayor resistencia a la infiltración, siendo necesario incrementar la presión ejercida con la jeringa, resultando en un tejido más dañado.

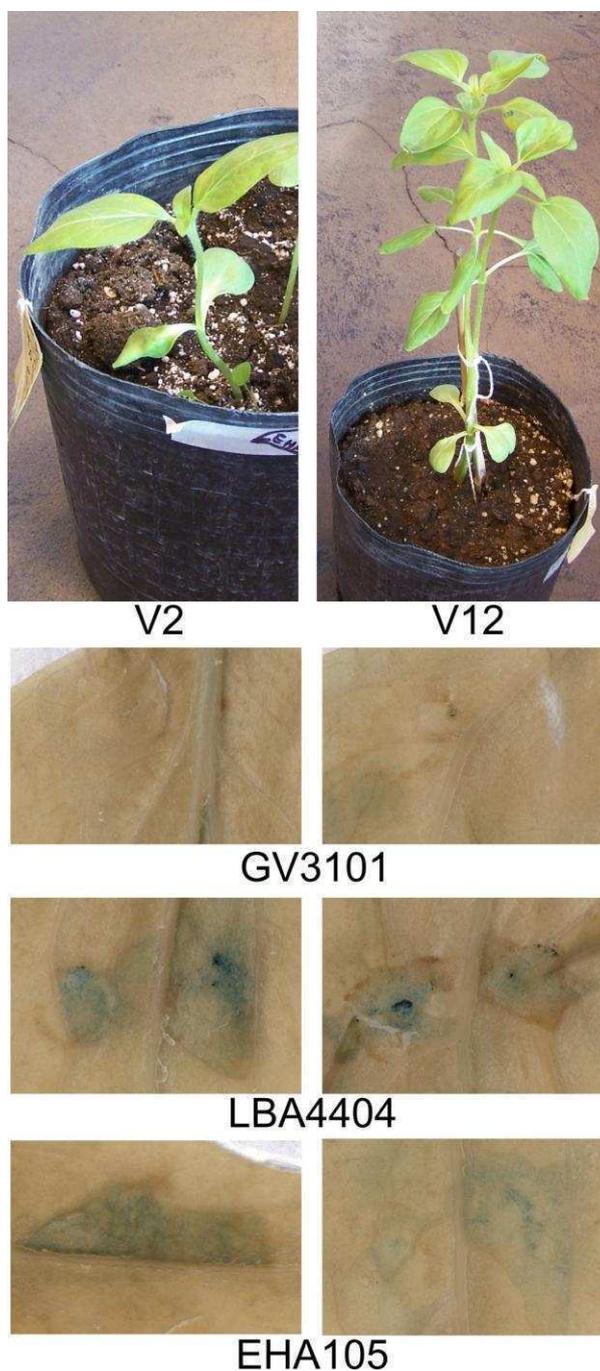


Figura 16. Detección histoquímica de GUS de plantas de girasol de los estadios de desarrollo V2 y V12 agroinfiltradas. Izq. Girasol V2 agroinfiltrado con las tres cepas de *Agrobacterium tumefaciens*. Debajo: detalle de la agroinfiltración con las cepas GV3101, LBA4404 y EHA105. Se observan áreas de tinción mayores al presentar menor resistencia la hoja y una mayor tinción en la cepa EHA105. Der. Girasol V12 agroinfiltrado con las tres cepas. Debajo: detalle de la agroinfiltración con las cepas GV3101, LBA4404 y EHA105. Se observa el daño producido al presentar mayor resistencia la hoja a la agroinfiltración.

Con el fin de establecer el tiempo de análisis mediante detección histoquímica de GUS, se evaluó la intensidad de la tinción a los 3 y 7 días después de la agroinfiltración. Se observó que la intensidad de la tinción era mayor cuando la detección era realizada a los 3 días (figura 16) y casi nula a los 7 días de la agroinfiltración (no mostrado).

Se utilizó *Agrobacterium tumefaciens* de las cepas GV3101, LBA4404 y EHA105 para determinar la más adecuada. En un primer análisis por detección histoquímica de GUS, se observó que mientras las cepas GV3101 y LBA4404 presentaban áreas de tinción localizadas casi exclusivamente en la zona de la herida provocada durante el procedimiento de agroinfiltración, la cepa EHA105 penetró fácilmente, más allá de la zona de contacto de la hoja con la jeringa, resultando en un área de infiltración más grande (figura 16).

Adicionalmente, se comparó la actividad enzimática por cuantificación fluorométrica de MUG, obtenida con cada cepa en plantas V2 a los 3 días de realizada la agroinfiltración (figura 17). Para este análisis se tomaron dos discos de la zona agroinfiltrada con cada cepa, y se determinó que la cepa EHA105 presentaba actividad significativamente diferente a la de las cepas GV3101 y LBA4404 (ANOVA Tukey, $p < 0,05$).

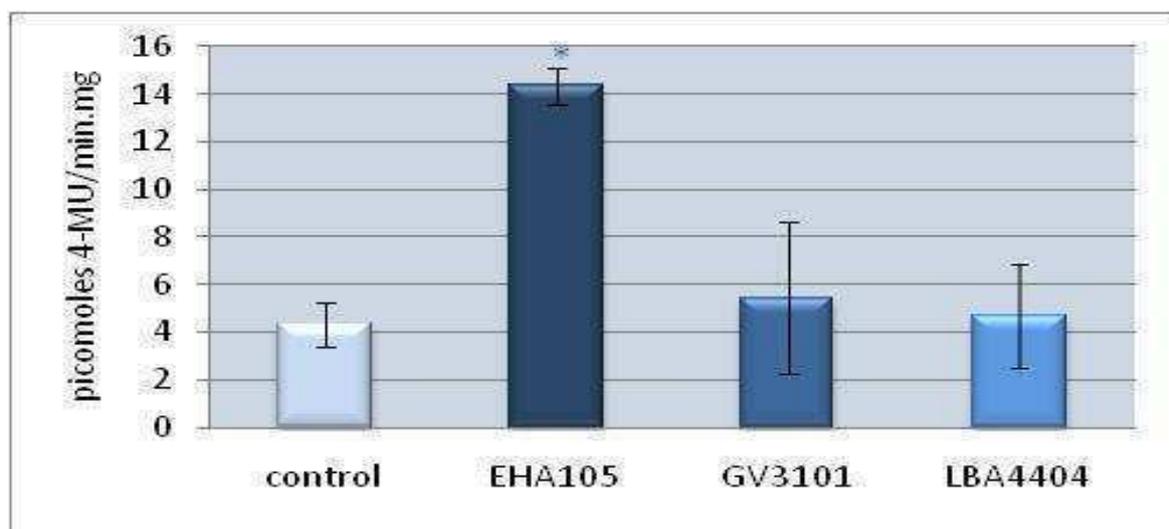


Figura 17. Determinación fluorométrica de la actividad de la enzima β -glucuronidasa para las cepas EHA105, GV3101 y LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* con la construcción pKGWFS7,0 con el promotor rbcS1. * $p < 0,05$ (ANOVA Tukey).

Por otra parte, se observó que las suspensiones de *Agrobacterium tumefaciens* se esparcieron por la lámina de la hoja, pero fueron delimitadas por las nervaduras prominentes del girasol, por lo que las regiones agroinfiltradas nunca se vieron de forma circular como en las plantas de *Nicotiana benthamiana* (figura 18).

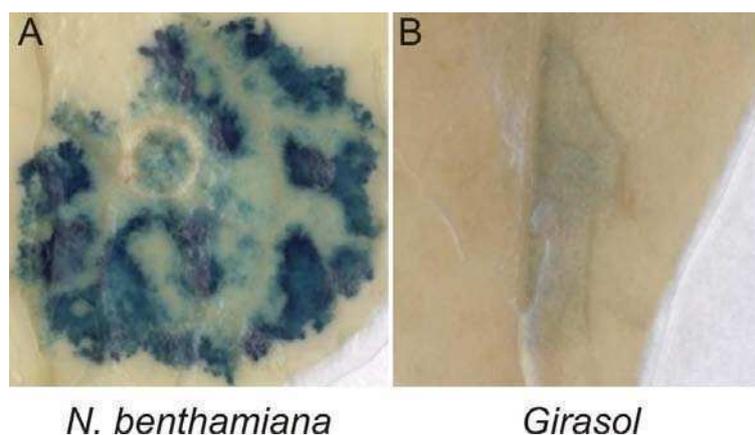


Figura 18. Comparación de las formas de las regiones agroinfiltradas entre *N. benthamiana* y girasol. El girasol (B) muestra un área de infiltración limitada por las nervaduras prominentes, mientras que en *Nicotiana benthamiana* (A) se observa un área circular rodeando el sitio de agroinfiltración.

De esta forma se establecieron como condiciones más adecuadas para la agroinfiltración en plantas de girasol, la utilización de plantas en el estadio de desarrollo V2, la utilización de la cepa EHA105 y la realización de la detección histoquímica de GUS a los 3 días post agroinfiltración.

4.4.3. Agroinfiltración de girasol con las distintas construcciones

Una vez puesta a punto la técnica de agroinfiltración en plantas de girasol, la misma fue realizada utilizando todas las construcciones del vector pKGWFS7,0 conteniendo los distintos promotores. La detección histoquímica de GUS de las hojas agroinfiltradas demostró que todos los promotores eran funcionales en girasol (figura 19), pero no se pudo establecer una diferencia en la expresión mediante un análisis cualitativo.

El análisis cuantitativo de la agroinfiltración se realizó mediante determinación fluorométrica de MUG, cortando dos discos de la zona agroinfiltrada. El análisis estadístico resultante de la comparación de la actividad del mismo promotor en distintas posiciones no reveló diferencias significativas (figura 20). En cambio, la comparación de la actividad de los distintos promotores agroinfiltrados en una misma posición, mostró que sólo el promotor 2X35S presenta diferencias significativas con el control (tejido no agroinfiltrado) y los promotores *rbcS1*, *nos* y *PPC* y ninguna diferencia con *CaMV35S* cuando la agroinfiltración era realizada en la base de la hoja (ANOVA Tukey $p < 0,01$).

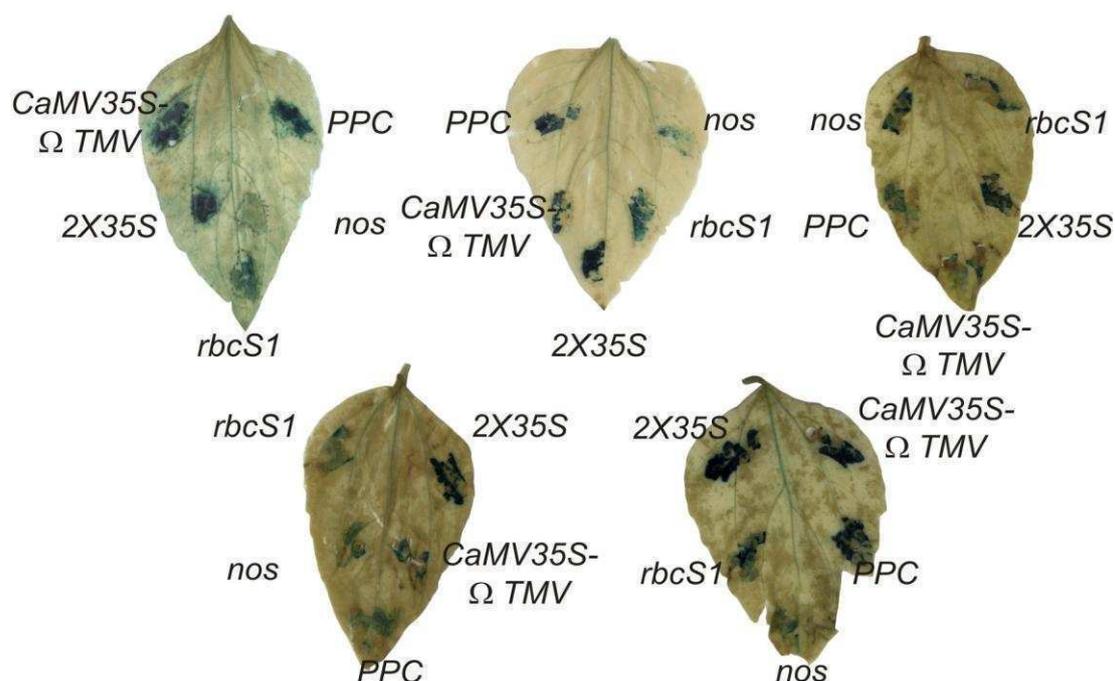


Figura 19. Detección histoquímica de GUS en hojas de girasol agroinfiltradas con la cepa EHA105 transformada con el vector pKGWFS7,0 conteniendo los promotores CaMV35S- Ω TMV, 2X35S, nos, rbcS1 y PPC. Se observa la funcionalidad de todos los promotores en las hojas de girasol.

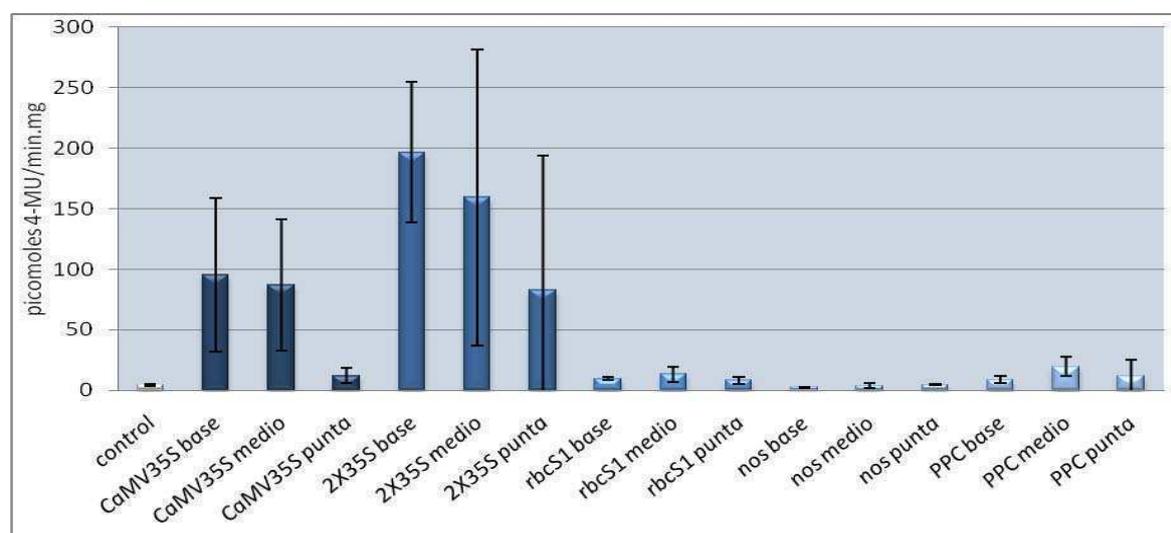


Figura 20. Cuantificación fluorométrica de MUG de las zonas agroinfiltradas con los promotores CaMV35S- Ω TMV (CaMV35S), 2X35S, rbcS1, nos y PPC en 3 posiciones dentro de la hoja de girasol (base, medio y punta). (n=4). $p < 0,05$ (ANOVA Tukey).

Dado que está descrito que los promotores rbcS1 y PPC son inducibles por luz, se analizó si existía una diferencia en su actividad ante la ausencia o presencia de ésta. En el análisis por detección histoquímica de GUS (figura 21) no se observó una diferencia en la tinción para ambos promotores en las dos condiciones.



Figura 21. Detección histoquímica de GUS en hojas de girasol agroinfiltradas con la cepa EHA105 transformada con el vector pKGWFS7,0 conteniendo los promotores *rbcS1* y PPC manteniendo las plantas en luz u oscuridad durante 3 días.

En el análisis estadístico de la cuantificación fluorométrica de MUG, tampoco hubo diferencias significativas en la expresión dada por los promotores (figuras 22), en ambas condiciones (ANOVA Tukey, $p < 0,05$).

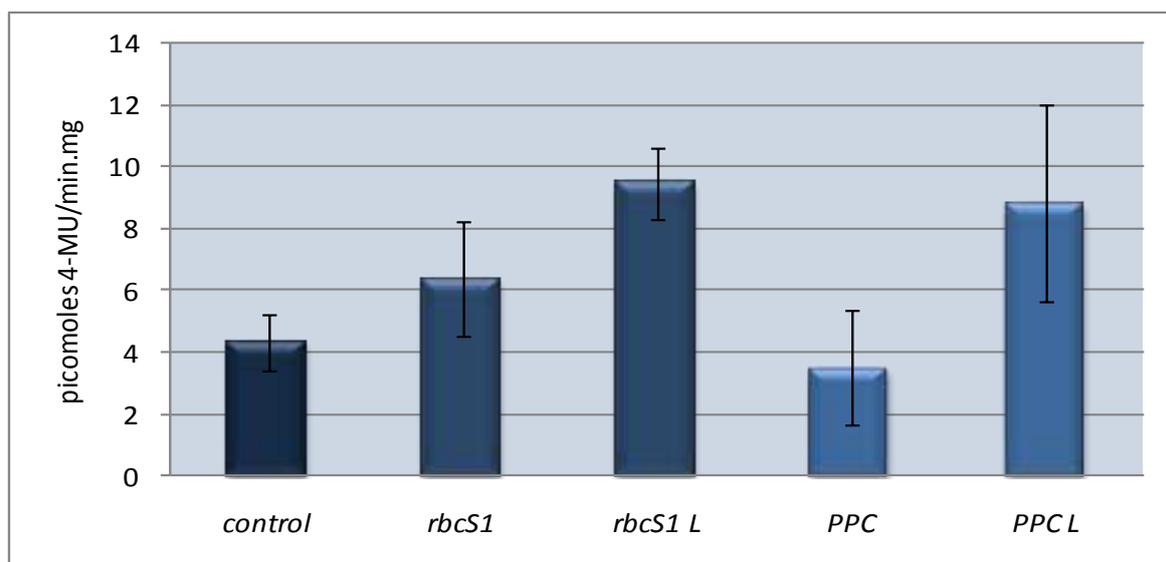


Figura 22. Cuantificación fluorométrica de MUG de las zonas agroinfiltradas con los promotores *rbcS1* y PPC manteniendo las plantas en oscuridad o luz (L) durante 3 días ($n=2$). No se encontraron diferencias significativas, $p < 0,05$ (ANOVA Tukey).

4.4.4. Análisis de la expresión transitoria dada por los diferentes promotores estudiados en girasol

La expresión transitoria de los distintos promotores en los explantos utilizados para la agroinfección de girasol, se evaluó por detección histoquímica de GUS y por cuantificación fluorométrica de MUG.

La detección histoquímica de GUS (figura 23) se realizó a los 4 días de realizada la agroinfección de girasol, luego del cocultivo, cuando aún se conserva el aspecto y la forma del explanto inicial. En una comparación cualitativa, se observó que la expresión de la β -glucuronidasa regulada por los promotores CaMV35S- Ω TMV, 2X35S y *rbcS1* se manifestaba con una tinción de intensidad similar, siendo fuerte y abarcando pequeñas regiones, mientras que en la expresión regulada por *nos* la tinción era débil con presencia de pocos puntos dispersos. En el caso de la expresión regulada por PPC la tinción era nula, no observándose ni un solo punto. Debe aclararse que el color azul presente en puntos o áreas corresponde a la actividad específica de la enzima, mientras que el color celeste presente en algunos cotiledones corresponde a una actividad inespecífica.

Se observó que las áreas de tinción para los promotores CaMV35S- Ω TMV y 2X35S se encontraban dispersas por todo el cotiledón mientras que la expresión regulada por el promotor *rbcS1* se encontraba mayoritariamente en la zona del hemiembrión, zona meristemática a partir de la cual se regeneran los brotes.

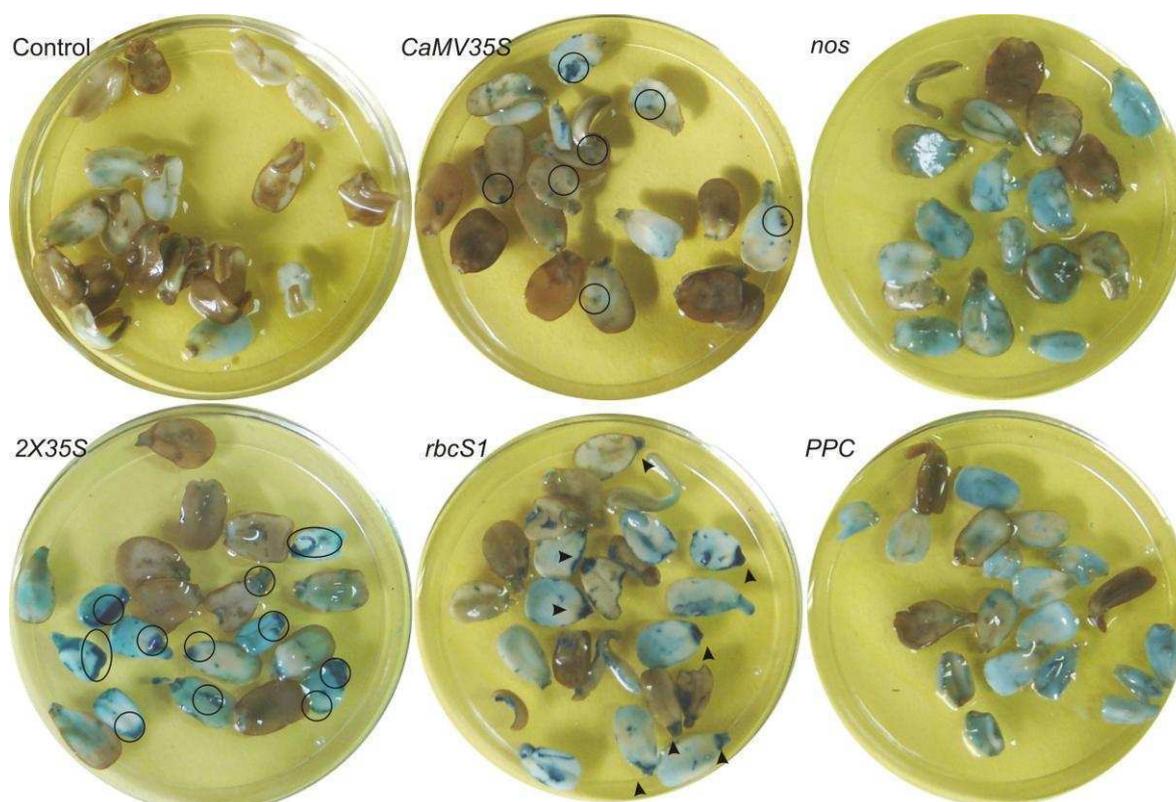


Figura 23. Detección histoquímica de GUS en la transformación transitoria de girasol con los promotores CaMV35S- Ω TMV (CaMV35S), *nos*, 2X35S, *rbcS1* y PPC. Los puntos y áreas azules corresponden a una actividad específica, el color celeste corresponde a una tinción inespecífica. Se señalan con flechas las áreas con actividad en *rbcS1*, concentradas en las zonas meristemáticas, y con círculos las áreas con actividad en CaMV35S y 2X35S, dispersas en todo el cotiledón.

El análisis estadístico mediante Kruskal-Wallis con comparación múltiple de Dunn, de la cuantificación fluorométrica de MUG (figura 24) demostró que sólo los promotores *rbcS1* y *2X35S* presentaron actividades con diferencias significativas con respecto al control ($p < 0,001$). Del mismo modo el promotor PPC presentó una actividad casi nula, significativamente diferente a la del promotor *rbcS1* ($p < 0,001$) y a la del *2X35S* ($p < 0,05$). Estos resultados confirman que el color celeste presente en algunos cotiledones (figura 23) corresponde a una actividad inespecífica. Adicionalmente, el promotor *rbcS1* presentó diferencias significativas ($p < 0,05$) con el promotor CaMV35S y nos.

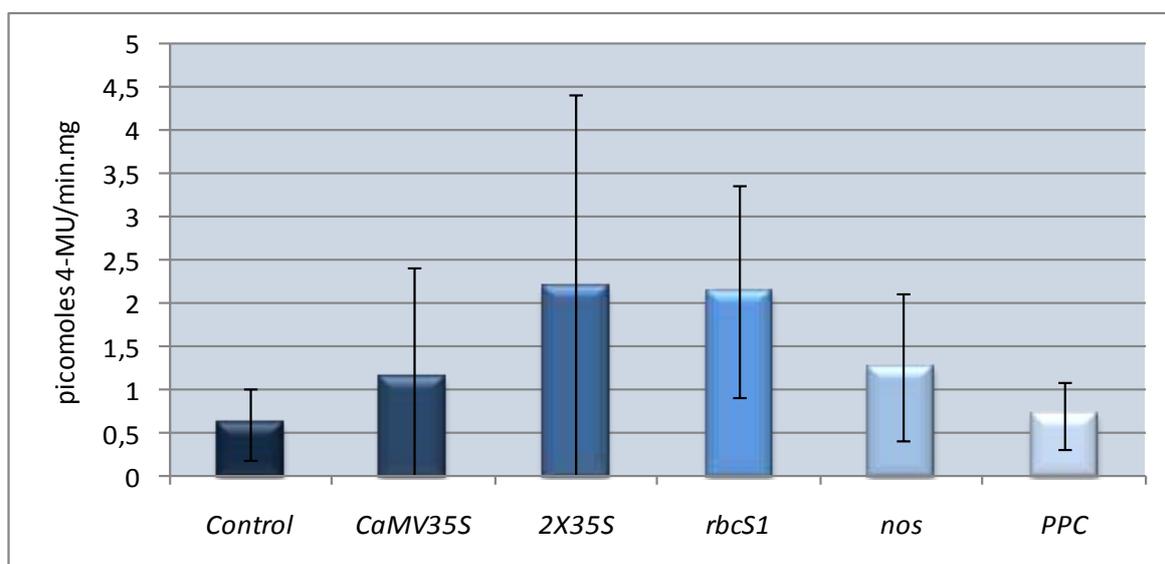


Figura 24. Determinación fluorométrica de la actividad de la enzima β -glucuronidasa para los promotores CaMV35S- Ω *TMV*, *2X35S*, *rbcS1*, *nos* y PPC ($n=24$).

La comparación de la actividad de los promotores *rbcS1* y PPC en ausencia o presencia de luz se realizó por detección histoquímica de GUS (figura 25) observándose para el promotor *rbcS1* una tinción similar en ambas condiciones. La tinción dada por el promotor PPC fue casi nula en la oscuridad, tal como se observó en la figura 23, y no se advirtió ninguna modificación en la expresión, por la permanencia de los explantos bajo luz (figura 25).

El análisis estadístico de la cuantificación fluorométrica no mostró diferencias significativas para un mismo promotor en ambas condiciones (figura 26) y sólo el promotor *rbcS1* tuvo una diferencia significativa respecto del control (ANOVA Tukey, $p < 0,01$).

De esta manera se concluyó que, de los promotores estudiados, el promotor más adecuado a utilizar en la transformación estable de girasol era el promotor *rbcS1*, ya que presentaba una actividad con niveles similares a los obtenidos con el promotor CaMV35S pero mayoritariamente localizada en la zona de regeneración de los explantos. También se

determinó que no debía modificarse el protocolo utilizado por el grupo de trabajo, que realiza el cocultivo con *Agrobacterium tumefaciens* en oscuridad, ya que se comprobó que éste no es un factor que influye en forma significativa en la actividad del promotor.

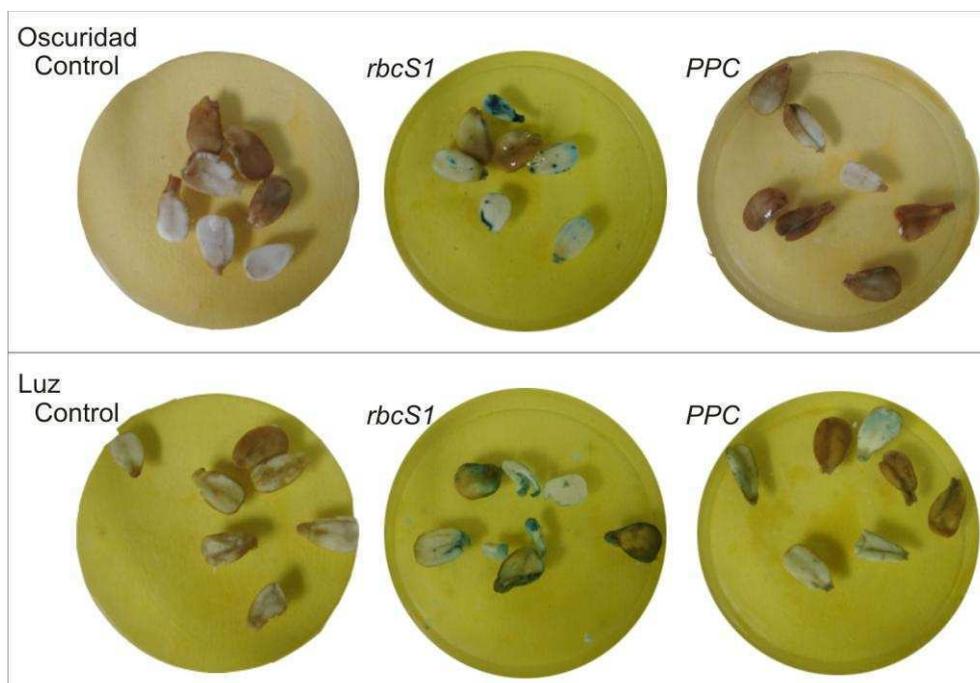


Figura 25. Detección histoquímica de GUS de la expresión transitoria en cotiledones de girasol transformados con los promotores *rbcS1* y PPC realizando el cocultivo en oscuridad (panel superior) y luz (panel inferior). No se observan diferencias en la intensidad de la tinción en la comparación de ambas condiciones.

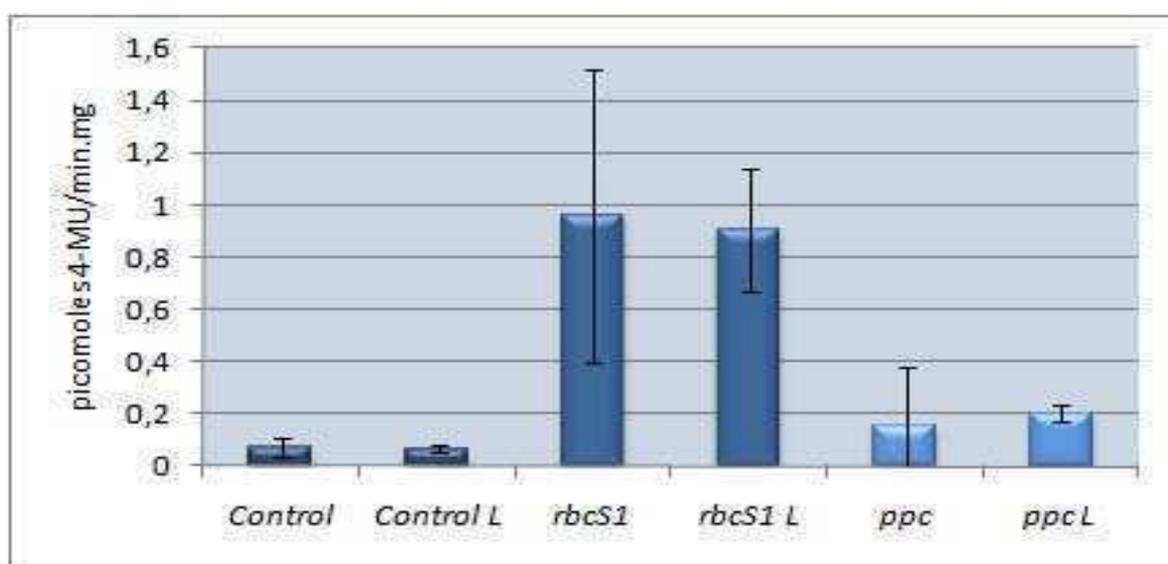


Figura 26. Determinación fluorométrica de la actividad de la enzima β -glucuronidasa para los promotores *rbcS1* y PPC, en oscuridad y en luz (L). No se observan diferencias significativas ($p < 0,05$) en la comparación de un mismo promotor en ambas condiciones ($n=12$). (ANOVA Tukey)

4.5. Transformación estable de girasol utilizando el vector Gateway pKGWFS7,0 con el promotor CaMV35S

Con el fin de obtener brotes transgénicos con el mismo fondo genético del vector Gateway pKGWFS7,0 para realizar la comparación de los promotores se realizaron ensayos de transformación estable siguiendo el protocolo ya descrito para girasol, seleccionando con el antibiótico kanamicina, con el esquema determinado en esta tesis (ítem 4.1) y utilizando el vector pKGWFS7,0 conteniendo el promotor CaMV35S- Ω TMV.

De un total de 314 brotes agroinfectados con esta construcción, se obtuvieron 7 brotes enraizados dando una eficiencia de transformación de 2,23 %. Los 30 brotes control no produjeron raíces.

El aspecto de los brotes y de las raíces (figura 27) fue similar al de los brotes obtenidos con otras construcciones conteniendo al promotor CaMV35S. Los brotes presentaron coloración variable, desde color verde intenso saludable a color verde amarillento afectado en su mayoría. Las raíces estaban sólo compuestas por una raíz principal, sin raíces secundarias, de no más de 3 cm de longitud, por lo que en el pasaje a invernáculo debieron ser injertados. Adicionalmente, algunos de ellos mostraron la pérdida de la dominancia apical (figura 27, C) Ninguno de los brotes injertados prosperó, por lo cual no fue posible obtener su descendencia y continuar con su análisis.

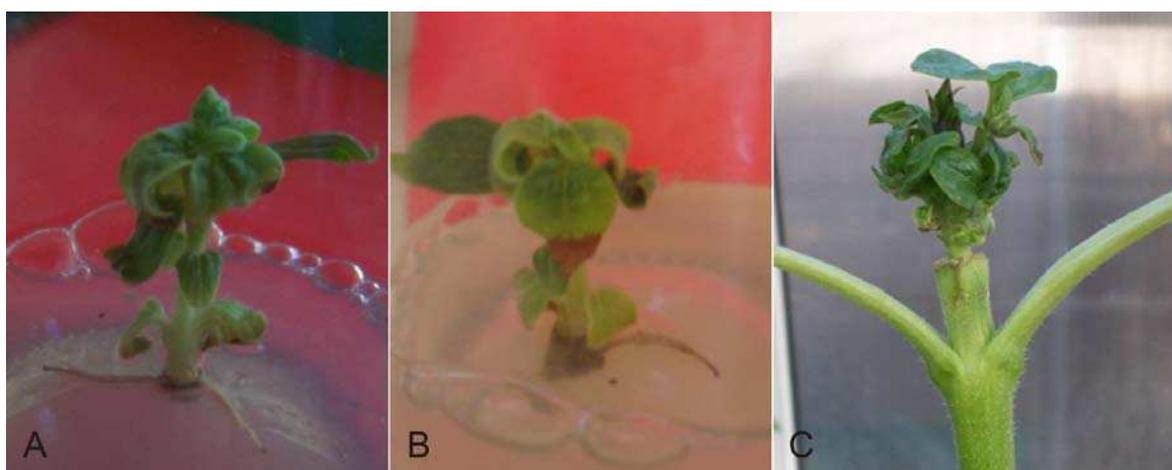


Figura 27. Brotes agroinfectados con la construcción pKGWFS7,0 conteniendo el promotor CaMV35S- Ω TMV, los mismos presentan raíces pequeñas (A y B) por lo que debieron ser injertados (C), y mostraron, en algunos casos la pérdida de la dominancia apical.

4.6. Transformación estable de girasol utilizando el vector Gateway pKGWFS7,0 con el promotor rbcS1

Se realizaron 30 ensayos de transformación, tal como se describió en el ítem anterior 4.5, utilizando el vector pKGWFS7,0 conteniendo el promotor rbcS1.

De un total de 2.480 brotes se obtuvieron 183 brotes enraizados en el medio de enraizamiento. Mayormente los brotes presentaron un aspecto y coloración saludable, salvo por algunos pocos con aspecto y coloración afectada.

La mayoría de los brotes enraizados presentaron raíces similares a las de los controles en medio sin selección (figura 7, A), con una raíz principal y abundantes raíces secundarias, los cuales fueron transferidos directamente a tierra, mientras que un menor número de brotes enraizados presentaron una raíz principal de menor tamaño, con una, dos o ninguna raíz secundaria, que fueron injertados. Ejemplos de ambos tipos de raíces se muestran en la figura 28 B.

Ninguno de los 413 brotes control sin agroinfectar fueron capaces de desarrollar raíces en el medio con kanamicina y muchos de ellos presentaron coloración normal (figura 28 A), confirmando lo observado anteriormente sobre la imposibilidad de seleccionar transformantes mediante este criterio.



Figura 28. Brotes control sin agroinfectar en medio con kanamicina, los mismos no presentan raíz (A) y brotes enraizados agroinfectados con la construcción conteniendo el promotor rbcS1 (B).

En condiciones ex vitro las plantas obtenidas, tanto por transferencia directa a tierra como por injerto, presentaron gran porte, con plantas de hasta 2,5 m de altura. Los capítulos florales fueron de mayor tamaño (figura 29) que los obtenidos con las construcciones conteniendo el promotor CaMV35S.

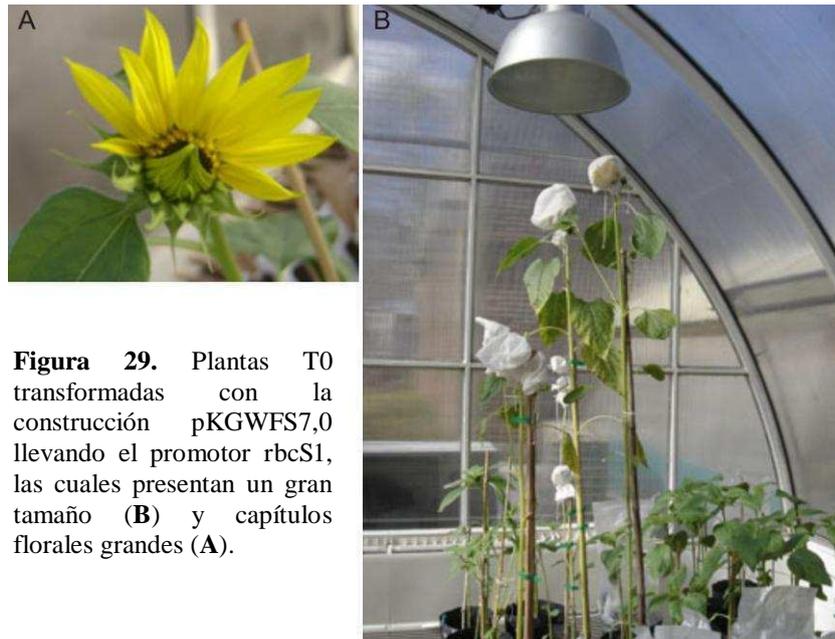


Figura 29. Plantas T0 transformadas con la construcción pKGWFS7,0 llevando el promotor *rbcS1*, las cuales presentan un gran tamaño (**B**) y capítulos florales grandes (**A**).

En concordancia con el mayor tamaño de capítulo floral, se observó un aumento del número de achenios, con valores desde 2 a 294 achenios por capítulo, y también del tamaño de los mismos. Estos datos se reflejan en la figura 30.

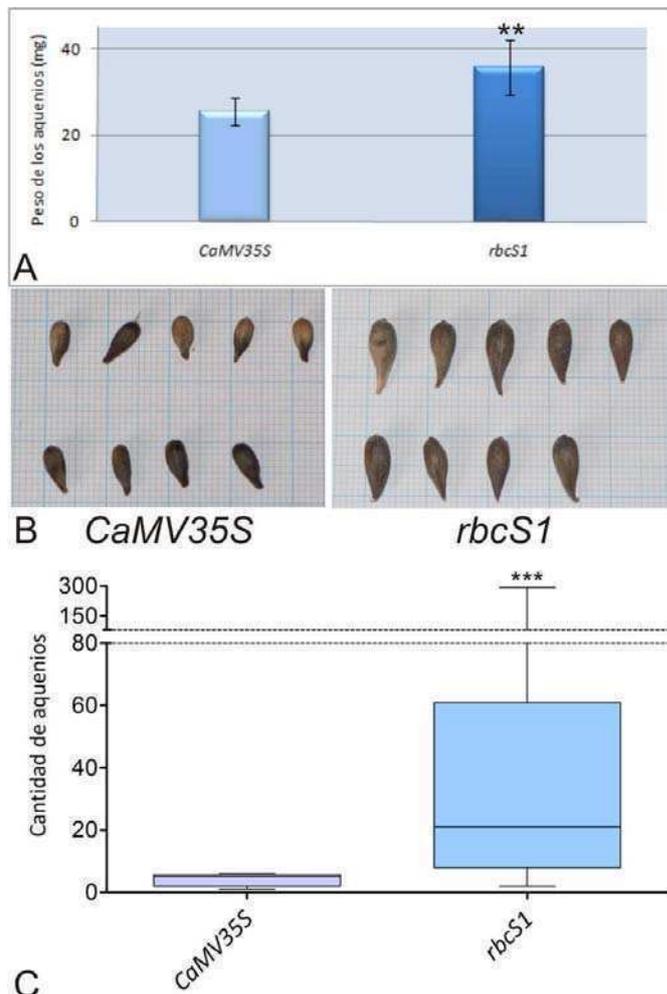


Figura 30. Comparación de los achenios obtenidos con una construcción conteniendo el promotor CaMV35S- Ω *TMV* y la construcción pKGWFS7,0 con el promotor *rbcS1*. **A** Peso de los achenios en mg ** $p < 0,01$ (test t). **B** Tamaño de los achenios, se observa que el tamaño de los achenios CaMV35S no supera un cm. **C** Cantidad de achenios por capítulo. *** $p < 0,001$ (test t con corrección de Welch para varianzas diferentes).

4.6.1. Análisis de la T0

4.6.1.1. Detección histoquímica de GUS

El análisis de la expresión dada por el promotor *rbcS1* por detección histoquímica de GUS, mostró una tinción intensa típica de un promotor constitutivo en algunos de los brotes T0 obtenidos (figura 31). Anteriormente, este tipo de análisis no había resultado positivo con ninguna de las construcciones conteniendo el promotor CaMV35S.

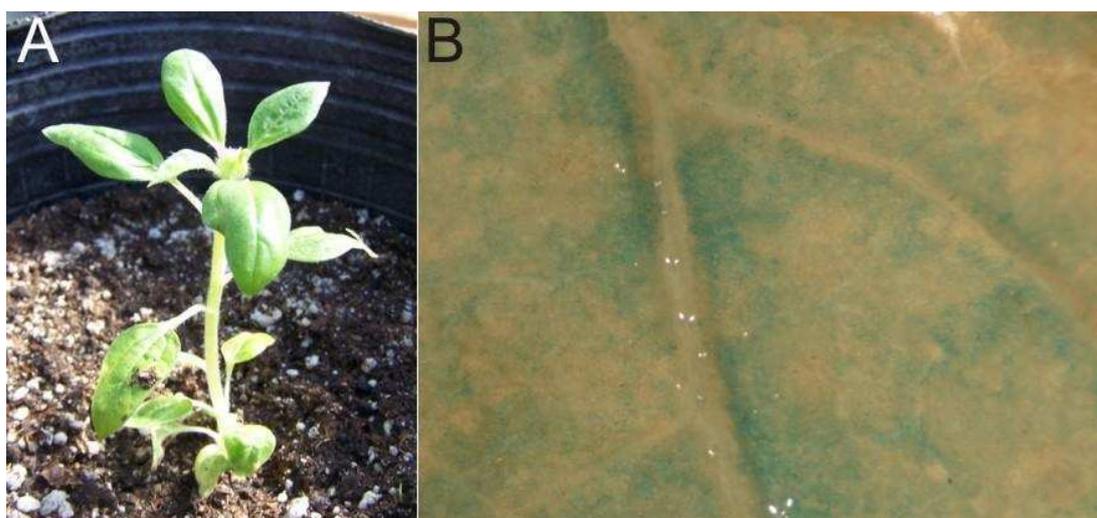


Figura 31. Brote enraizado obtenido por transformación con el vector pKGWFS7,0 con el promotor *rbcS1* transferido a maceta (A). Detección histoquímica de GUS de la expresión regulada por el promotor *rbcS1* en una hoja perteneciente a un brote enraizado donde se observa una tinción intensa típica de un promotor constitutivo (B).

4.6.1.2. Detección de transgenes mediante PCR

Se comenzó el análisis de la T0 realizando PCR para la detección de un fragmento del gen de actina, como control de integridad del ADN y como control de ausencia de inhibidores para la polimerasa. Se muestra un ejemplo en la figura 32 donde en todas las muestras analizadas se obtuvo amplificación y no hubo inhibiciones.

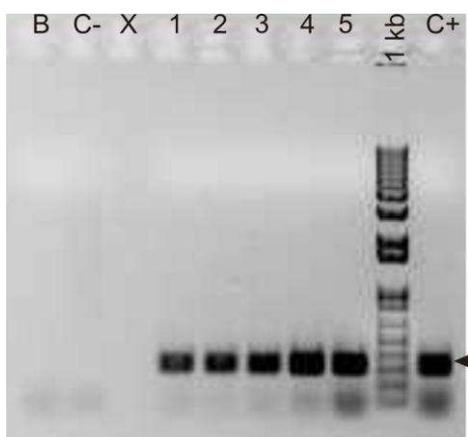


Figura 32. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de una PCR de actina. La banda esperada se encuentra señalada con una flecha. Calles 1-5: ADN de plantas T0. B: Control negativo sin la adición de ADN. C-: Control negativo con la adición de ADN que no debiera ser amplificado. C+: Control positivo de ADN de una planta de girasol crecida a campo. 1 kb: 1 kb Plus DNA ladder. X: calle vacía.

La determinación de la presencia de los transgenes se realizó mediante las PCR para la detección de fragmentos de amplificación de GUS y nos (ítems 3.11.2.4 y 3.11.2.5, respectivamente). De los 183 brotes enraizados, 175 resultaron positivos (ejemplo de PCR nos, figura 33). Estos resultados manifiestan una eficiencia de transformación con el promotor *rbcS1* de 7,06 % y un porcentaje de escapes de 4,37 %, calculado como el porcentaje de brotes enraizados negativos por PCR sobre el total de brotes enraizados.

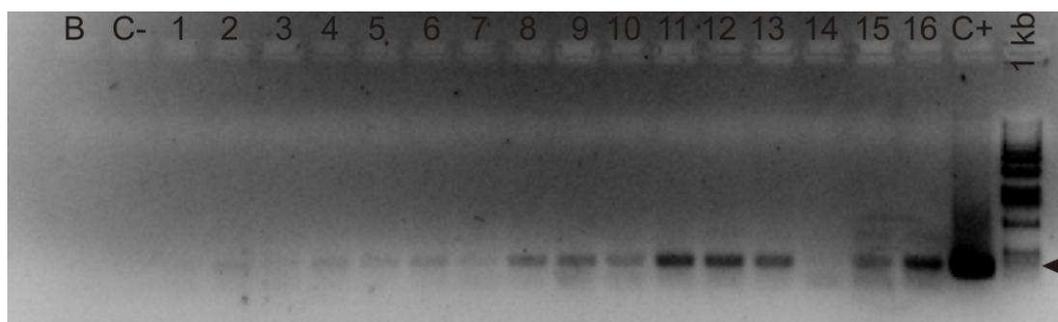


Figura 33. Electroforesis en gel de agarosa del producto de amplificación de una PCR nos. La banda esperada se encuentra señalada con una flecha. Calles 1-16: ADN de plantas T0. B: Control negativo sin la adición de ADN. C-: Control negativo con la adición de ADN que no debiera ser amplificado. C+: Control positivo de ADN del vector de transformación. 1 kb: 1 kb Plus DNA ladder.

4.6.2. Análisis de la T1

Se germinaron en arena 67 semillas, pertenecientes a la T1 de 11 plantas T0, tal como se describe en el ítem 3.6.10 de materiales y métodos. El pasaje a maceta fue exitoso para 65 de las 67 plantas, mientras que las 2 restantes no prosperaron más allá de la expansión de los cotiledones.

4.6.2.1. Detección de transgenes mediante PCR

Se tomaron muestras de las hojas de las plantas obtenidas y fueron analizadas por PCR GUS y/o nos. Las 67 plantas dieron un resultado positivo (ejemplo de PCR GUS, figura 34).

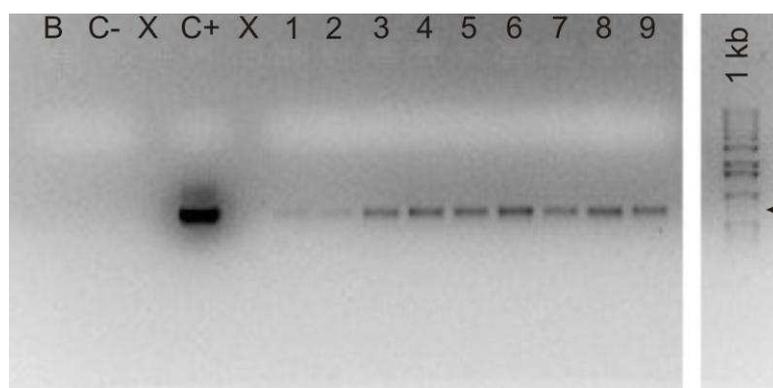


Figura 34. Electroforesis en gel del producto de amplificación de una PCR GUS. La banda esperada se encuentra señalada con una flecha. Calles 1-9: ADN de plantas T1. B: Control negativo sin la adición de ADN. C-: Control negativo con la adición de ADN que no debiera ser amplificado. C+: Control positivo de ADN del vector de transformación. 1 kb: 1 kb Plus DNA ladder. X: calles vacías.

4.6.2.2. Southern blot

Se analizó la presencia del transgén en 7 plantas T1 obtenidas de 4 plantas T0 mediante Southern blot. La digestión se realizó con la enzima NcoI que digiere a ambos lados del gen de la β -glucuronidasa dando un fragmento de 2.588 pb, en la figura 35 se observa la hibridación de la sonda gus993-1390 (figura 6). Esta banda no se pudo detectar en la muestra correspondiente a la planta T1 1-5 (T0 8-42). Además, se observaron bandas de aproximadamente 4.000 y 5.000 pb, debido a una hibridación inespecífica de la sonda. En el control (ADN de una planta de girasol no transformada) no se detectó ninguna banda.

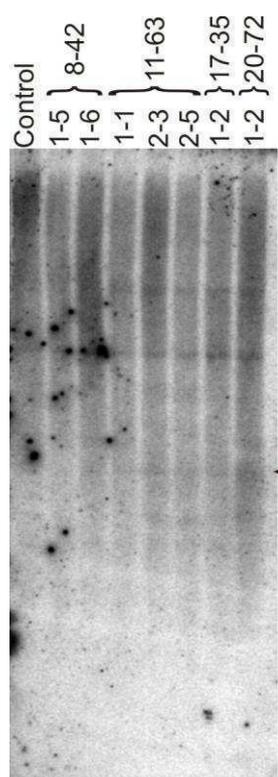


Figura 35. Southern blot de 7 plantas T1 correspondientes a 4 plantas T0 (8-42, 11-63, 17-35, 20-72). Las bandas detectadas se encuentran señaladas con flechas.

4.6.2.3. Detección histoquímica de GUS

Se analizaron 38 plantas T1 obtenidas de 8 plantas T0 mediante la detección histoquímica de GUS. Se observó tinción en 6 hojas procedentes de plantas T1 provenientes 3 plantas T0 distintas (tabla 4).

Tabla 4. Plantas T1 que resultaron positivas por detección histoquímica de GUS y su correspondiente T0.

| Plantas T0 (n° ensayo-n° explanto) | Plantas T1 (n° capítulo-n° akenio) |
|------------------------------------|------------------------------------|
| 8-42 | 1-5 |
| | 1-6 |
| 11-63 | 1-1 |
| | 2-3 |
| | 2-5 |
| 17-35 | 1-2 |

En la parte superior de la tabla se indica el tipo de planta y el significado de su nomenclatura entre paréntesis.

En las hojas de plantas T1 1-5 y 1-6 (descendientes de la misma planta T0 8-42) se observó el patrón de tinción observado anteriormente para el promotor CaMV35S en los tricomas de la nervadura principal en la cara abaxial.

En la hoja de la planta T1 1-2 (T0 17-35) se observó tinción en los tricomas de toda la hoja. Por último, 3 plantas T1, descendientes de la T0 11-63, resultaron positivas presentando dos patrones de expresión distintos. En la T1 2-5 se observó tinción en los tricomas de distintas zonas de la hoja, mientras que en las hojas de las T1 1-1 y T1 2-3 se observó tinción intensa no sólo en los tricomas si no en toda la hoja, comparable a la obtenida en otras especies con promotores constitutivos (figura 36).

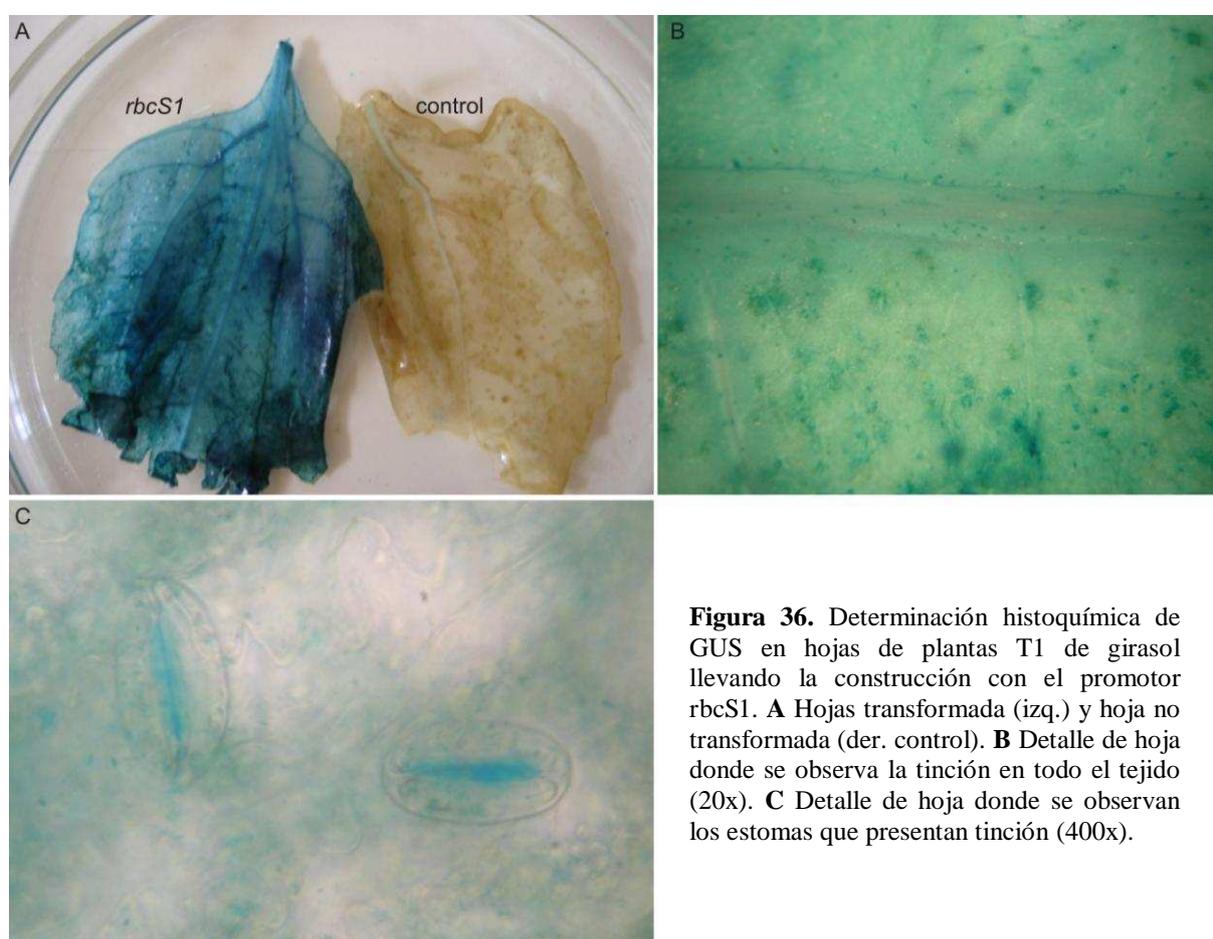


Figura 36. Determinación histoquímica de GUS en hojas de plantas T1 de girasol llevando la construcción con el promotor *rbcS1*. **A** Hojas transformada (izq.) y hoja no transformada (der. control). **B** Detalle de hoja donde se observa la tinción en todo el tejido (20x). **C** Detalle de hoja donde se observan los estomas que presentan tinción (400x).

Discusión

5. Discusión

El girasol es un cultivo estratégico para nuestro país, dado que es uno de los primeros productores mundiales de esta oleaginosa. Con una producción equivalente al 40 % de la producción mundial, actúa como formador de precios de este cultivo. Dada la relevancia del girasol y el desarrollo agroindustrial derivado del mismo para la economía del país, es importante el desarrollo de la tecnología necesaria para mantener la competitividad del cultivo a nivel mundial. Hasta el momento no se encuentra disponible, en el mundo, girasol transgénico liberado al mercado. Sin embargo, se lo puede encontrar en forma controlada y experimental bajo las normativas que rigen para los cultivos transgénicos, tanto en empresas privadas como en entidades públicas.

5.1. Optimización de la selección con el antibiótico kanamicina

La mayoría de los sistemas de transformación genética de plantas desarrollados hasta el momento, requieren necesariamente de algún mecanismo o método para seleccionar aquellas plantas que contienen el transgén y eliminar a las restantes no transformadas. Actualmente, el sistema de selección más utilizado consiste en incorporar, además del gen de interés, otro gen con resistencia a un antibiótico o a un herbicida. De este modo, al realizar el cultivo *in vitro* en presencia del agente selectivo, se garantiza que únicamente sobrevivan aquellas plántulas que fueron transformadas.

La selección por kanamicina ya fue utilizada con anterioridad en la transformación de girasol (Escandón y Hahne, 1991; Knittel y col., 1994; Malone-Schoneberg y col., 1994; Grayburn y Vick, 1995; Burrus y col., 1996; Müller y col., 2001) aplicando distintas concentraciones (de 1 a 175 mg/L) y con distintos niveles de éxito (desde la incapacidad de regenerar brotes hasta un 79,3 % de escapes). Estas publicaciones utilizaban, en su mayoría, como criterio de selección la pérdida de coloración de los brotes.

En las investigaciones realizadas durante el desarrollo de la tesis de licenciatura en Biotecnología (Radonic, 2005), punto de partida de esta tesis doctoral, se discutieron los trabajos mencionados en el párrafo anterior y se demostró que la selección por formación de raíz *in vitro* en presencia de kanamicina es un método exitoso para girasol, ya que no se obtuvieron escapes y la eficiencia de transformación fue del 0,7 %. Además, se demostró que la selección por el aspecto y coloración del brote es inadecuada e ineficiente, ya que el 79,4 %

de los brotes obtenidos presentaban una coloración verde normal, y a su vez el 50,6 % de los mismos eran negativos por PCR. En consecuencia, esta característica fue descartada como criterio de selección. Asimismo, se observó que la aplicación de 50 mg/L inmediatamente después del cocultivo afectaba a los explantos, los que se veían seriamente dañados y no eran capaces de prosperar, siendo adecuada entonces la aplicación de kanamicina 50 mg/L en los medios Re3, Re4 y de enraizamiento (RA).

En el presente trabajo se confirmó que la selección por formación de raíz *in vitro* en presencia de kanamicina a una concentración de 50 mg/L era necesaria ya que con una concentración de 25 mg/L se obtenían escapes. También se corroboró que éste es el único criterio aplicable, ya que se advirtió nuevamente que la selección por el aspecto y la coloración no era adecuada. Con el fin de mejorar la eficiencia de selección se aplicaron distintos esquemas de concentraciones crecientes de antibiótico demostrando que el esquema Re1 kan 1 mg/L; Re2 kan 10 mg/L; Re3, Re4 y RA kan 50 mg/L era el más adecuado ya que aumentó la eficiencia de 0,7 % a 1,26 % y no se registraron escapes.

En los últimos años no se publicaron trabajos sobre protocolos de selección de plantas transgénicas de girasol en kanamicina, aunque existen algunos artículos acerca del aumento en los niveles de transformación. En estas publicaciones continúan realizando la selección en kanamicina por la decoloración de los brotes, como Dağüstü y col. (2008) que realizaron la selección luego de un mes en kanamicina 50 mg/L, con la obtención de 96,3 % de brotes verdes aunque no mencionan el nivel de escapes. De la misma manera, Lewi y col. (2006) describieron un protocolo de selección en kanamicina 50 mg/L con el que obtuvieron una eficiencia entre 1 y 5 %. En otros trabajos, a pesar de utilizar kanamicina en los medios de cultivo finalmente realizan la selección por expresión del gen reportero. Este es el caso de Mohamed y col. (2006) que mencionan eficiencias de transformación entre 3,3 y 4,8 % sobre el total de explantos transformados, realizando la selección por la expresión de GUS o GFP (sigla en inglés de green fluorescent protein, proteína verde fluorescente) presente en los brotes obtenidos. Del mismo modo, Ikeda y col. (2005), realizaron un pasaje por kanamicina 20 mg/L pero luego evaluaron la transformación por detección histoquímica de GUS.

Con el sistema de cultivo *in vitro* y transformación de girasol utilizado en este trabajo de tesis, la regeneración da lugar a una quimera, que si bien no siempre es capaz de enraizar, parte de sus tejidos se encuentran transformados. Esta característica fue evaluada en trabajos previos (Radonic, 2005; Radonic y col., 2006) en los que se demostró que cerca del 53 % de los brotes obtenidos resultaron positivos en el análisis por PCR. Por lo tanto, si evaluáramos la

eficiencia de transformación teniendo en cuenta estos antecedentes, los niveles de transformación superarían los obtenidos por los autores mencionados precedentemente.

5.2. Transformación con genes antifúngicos

La protección de los cultivos es uno de los mayores desafíos de la agricultura, siendo los patógenos fúngicos una de las principales causas de pérdidas en el rendimiento de los cultivos. Mediante la expresión de proteínas antifúngicas conocidas pueden lograrse niveles agronómicamente viables de resistencia durable contra un relativamente amplio rango de hongos.

Los genes presentes en las construcciones antifúngicas de esta tesis fueron utilizados en otras especies, ya sea en forma individual, conjunta, o junto con otros, obteniéndose distintos resultados. Ouyang y col. (2005) mostraron que la resistencia a *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se veía aumentada en los ensayos de susceptibilidad en dos generaciones de tomates transgénicos para el gen de osmotina y de quitinasa. Salehi y col. (2005) introdujeron el gen de quitinasa en soja y obtuvieron algunas líneas transgénicas, que comparadas con plantas no transformadas, mostraban mayor actividad quitinasa en ensayos de desafío in vitro contra *Rhizoctonia solani*. Mondal y col. (2007) expresaron un gen de glucanasa en *Brassica juncea* y observaron una resistencia contra *Alternaria brassicae*, manifestada por el menor número y tamaño de las lesiones, y un retraso en el inicio de la enfermedad. Sridevi y col. (2008) observaron resistencia a *Rhizoctonia solani* en plantas de arroz transformadas con una quitinasa de arroz y el gen de glucanasa. Todos los trabajos mencionados, publicados durante el transcurso de esta tesis doctoral muestran y avalan la vigencia de esta estrategia de obtención de plantas, por expresión de uno o varios genes antifúngicos, para estudiar si la resistencia conferida por los mismos ocurre ya sea de manera individual o de modo sinérgico. Los dos vectores con genes antifúngicos utilizados en este trabajo de tesis también fueron usados en frutilla (Vellicce y col., 2006) donde se obtuvieron dos líneas transgénicas del vector pHGC39 y una línea portadora de pHCA35. En este mismo trabajo se obtuvieron otras 13 líneas transgénicas, 2 líneas con un vector conteniendo los genes de glucanasa y ap24, y las líneas restantes con vectores conteniendo uno solo de éstos genes. El desafío con el patógeno *Botrytis cinerea* mostró que 2 líneas, que expresaban únicamente el gen de quitinasa, exhibieron altos niveles de resistencia. Sin embargo no manifestaron resistencia ante el agente etiológico de la antracosis (*Colletotrichum acutatum*), que fuera el objetivo

primario del trabajo. Se debe mencionar que en esta publicación, la utilización de los cassettes dobles pHGC39 y pHCA35 redujo la frecuencia de obtención de plántulas transgénicas al 0,5 %, mientras que cuando utilizaban los cassettes simples de un único gen la eficiencia era del 1,25 %, en tanto que en los ensayos con vectores portadores del gen reportero GUS la eficiencia era del 6,6 %.

Cuando las construcciones pHGC39 y pHCA35 fueron utilizadas para la transformación de girasol, se observaron resultados de eficiencia de transformación diferentes entre sí. En el caso del vector pHGC39, la eficiencia de transformación obtenida fue de 1,29 %, no observándose una reducción de la eficiencia con respecto a la utilización del vector portando el gen reportero. Sin embargo, con la construcción pHCA35, aunque los brotes presentaban un aspecto similar a los obtenidos con las otras construcciones, no se obtuvieron brotes enraizados. Si bien el número de brotes agroinfectados obtenidos con esta última construcción fue menor al obtenido con la construcción pHGC39, si consideramos que la eficiencia debería ser similar a la obtenida previamente en la tesis de licenciatura (Radonic, 2005) o con la construcción pHGC39, se deberían haber logrado de 3 a 6 plántulas enraizadas en kanamicina. Este hecho podría estar indicando que la presencia del gen ap24 podría tener un efecto negativo en las células de esta especie vegetal, lo cual debería ser evaluado en futuros ensayos.

Del mismo modo, con respecto a los brotes obtenidos dentro del grupo de trabajo con la construcción conteniendo la poliproteína, la respuesta descrita no fue observada previamente en nuestro laboratorio y resultó en la imposibilidad de utilizar este vector. Los 1.524 brotes obtenidos presentaron las características negativas descritas en el ítem 4.2. Considerando que todos los materiales utilizados, tales como medios de cultivo, semillas, cepas de *Agrobacterium*, etc., así como las condiciones de trabajo (cámaras de cultivo, flujos laminares, bombas de vacío, etc.) y los recursos humanos participantes fueron los mismos en todos los ensayos realizados dentro del grupo de trabajo, sólo puede atribuirse la hiperhidricidad y/o necrosis presente en estos brotes, a la utilización del vector conteniendo la poliproteína. Adicionalmente, este fenotipo alterado se observó en una construcción conteniendo una poliproteína con los genes reporteros GUS y GFP, por lo que este efecto no podría ser adjudicado sólo a la presencia de ap24. Dado que las enfermedades causadas por virus en el girasol cultivado (*Helianthus annuus* L.) o en otras especies salvajes del género *Helianthus* son raras, y teniendo en cuenta que nueve de los virus que infectarían al girasol naturalmente o experimentalmente pertenecen a la familia Potyviridae (Lenardon y col., 2001;

Gulya y col., 2002), y que además el gen de la proteasa NIa utilizado en esta construcción pertenece al TEV, el Potyviridae más relacionado con el virus del mosaico del girasol (SuMV, sigla en inglés de Sunflower Mosaic Virus), se podría considerar, como hipótesis, que los tejidos del girasol se verían afectados por la presencia y/o la actividad de esta proteasa. Esta posibilidad deberá ser evaluada en futuros ensayos utilizando el vector que porte únicamente el gen de la proteasa.

5.3. Análisis de la expresión regulada por el promotor CaMV35S

El promotor de origen viral CaMV35S (Benfey y Chua, 1990) es el más ampliamente utilizado para la transformación genética de especies vegetales, tanto monocotiledóneas como dicotiledóneas, regulando la expresión de genes reporteros o de selección y es utilizado en distintos vectores como pCAMBIA, pPZP, pGWB Gateway, etc. Sin embargo, a pesar del éxito en la utilización de este promotor, se han publicado trabajos describiendo ciertas dificultades o patrones de expresión diferentes a lo esperado. Por esto, en ensayos de transformación de alfalfa se observó expresión del gen reportero en hojas, raíces y tallos, mientras que el promotor estaba inactivo en las zonas correspondientes a los nódulos simbióticos y a los meristemas apical y radicular (Samac y col., 2004). En algodón y tabaco (Sunilkumar y col., 2002; Hraska y col., 2008) también se describió una expresión de GFP diferencial en tejidos y en distintos estadios del desarrollo; mientras que en un cultivar híbrido de genciana (Polano-White) las construcciones conteniendo al promotor CaMV35S fueron silenciadas por metilación de citosinas en sitios CpG y CpWpG (W contiene A o T) (Mishiba y col., 2005).

En el caso de las especies de la familia Asteraceae crisantemo y lechuga, los problemas existentes con el uso del promotor CaMV35S publicados hasta el momento son más importantes, ya que no se trata de una expresión diferencial dependiente del tejido o del estadio del desarrollo, sino a la falta de actividad o la altísima inestabilidad de los transgenes. Así, en crisantemo, se describió la falta de actividad de la β -glucuronidasa cuando se encuentra bajo la regulación del promotor CaMV35S (Annadana y col., 2002c; Outchkourov y col., 2003). Este resultado sugiere que el crisantemo y otras especies de la familia Asteraceae, no poseerían los factores de transcripción necesarios o en cantidades suficientes para este promotor. Visser y col. (2007) informaron que se frustraron numerosos intentos de sobreexpresión de una gran variedad de diferentes genes, situación que llevó a los laboratorios

holandeses y japoneses, donde el crisantemo es una especie económicamente muy importante, al aislamiento y prueba de varios promotores alternativos para expresar genes tanto en hoja como en flores (Annadana y col., 2002a; Annadana y col., 2002b; Outchkourov y col., 2003; Aida y col., 2004; Aida y col., 2005). Solamente los promotores *cab* (chlorophyll-a/b-binding protein de crisantemo) y *rbcS1* fueron capaces de expresar las proteínas bajo su regulación en un nivel comparable al del promotor CaMV35S en otras especies.

En el caso de la transformación de girasol, todos los trabajos publicados a nivel mundial se realizaron con este promotor (Lucas y col., 2000; Müller y col., 2001; Molinier y col., 2002; Weber y col., 2003). Sólo en una publicación donde se transforma girasol con el gen *oxo* de trigo, se utilizaron los promotores constitutivos *scp1* y SuperMas (Hu y col., 2003), siendo este último un derivado del CaMV35S.

En esta tesis se probó que todos los eventos obtenidos en girasol con el promotor CaMV35S regulando al gen reportero de la β -glucuronidasa (utilizando dos vectores de estructura idéntica, a excepción del gen de selección, *bar* o *nptII*) tienen niveles de expresión bajos, requiriendo el uso de lupa para detectar la tinción, y un patrón tejido específico, ya que sólo se detecta tinción en los tricomas de hojas jóvenes sobre la nervadura principal en la cara abaxial (figuras 9 y 10). Adicionalmente, se detectó inestabilidad de los transgenes, dado que el análisis mediante PCR de todas las semillas T2, de 6 eventos T1, mostró que carecían de los transgenes.

Estos resultados se observaron en el caso de la transformación de lechuga, donde la dificultad principal no se debió a los bajos niveles de expresión obtenidos, sino a la baja estabilidad de los transgenes. En la publicación de McCabe y col. (1999) se analizó la heredabilidad de la resistencia al herbicida glufosinato de amonio hasta la tercera generación, en dos poblaciones de lechuga transgénicas portadoras del gen *bar* bajo la regulación de los promotores CaMV35S o PPC. Solamente el 2,5 % de las plantas con la construcción CaMV35S-*bar*, que fueron seleccionadas en kanamicina en la T0, transmitieron la resistencia al herbicida hasta la generación T3, mientras que el 97 % de las plantas PPC-*bar* seleccionadas en kanamicina en la T0, pudieron conferir resistencia al herbicida a través de las tres generaciones.

En concordancia con estos autores, durante este trabajo de tesis, al analizar la funcionalidad de la construcción GUS-intrón en plantas de lechuga se demostró que la expresión del gen reportero GUS, regulada por el promotor CaMV35S era constitutiva (figura 11). Se observó la tinción a simple vista de todo el sistema vascular, y con ayuda de lupa se pudo detectar la expresión también en los estomas y el mesófilo de las hojas. La heredabilidad de los transgenes no ha sido evaluada.

5.4. Establecimiento de una nueva estrategia

Los bajos niveles de expresión del gen reportero y la inestabilidad de los transgenes, sumados a los bajos rendimientos obtenidos con las construcciones antifúngicas y a los antecedentes bibliográficos donde se manifiestan las dificultades generadas por el promotor CaMV35S en especies de la familia Asteraceae, condujeron a un replanteo de la estrategia de esta tesis, para alcanzar los objetivos propuestos.

De este modo, se planteó que el reemplazo del promotor CaMV35S por otro, mejoraría los niveles de expresión y la estabilidad de los transgenes. Para ello, se comenzó la búsqueda y evaluación de otros promotores.

5.5. Puesta a punto de la agroinfiltración en girasol

Los estudios de expresión de genes en sistemas homólogos o heterólogos, constituyen un componente crítico para la investigación biológica en plantas. Un beneficio de la transformación genética transitoria es su procesamiento rápido, comparado a la transformación genética estable, pudiéndose obtener los resultados en días.

Los ensayos de expresión transitoria mediados por *Agrobacterium* han sido exitosamente utilizados para analizar la función de genes, el silenciamiento de los mismos y las interacciones gen a gen, por ejemplo entre los genes de resistencia del huésped y los de avirulencia del patógeno (Scofield y col., 1996; Kapila y col., 1997; Frederick y col., 1998; Baulcombe, 1999). También han sido empleados para caracterizar la producción de anticuerpos recombinantes en tabaco y lechuga (Vaquero y col., 1999; Negrouk y col., 2005). Notablemente los procedimientos experimentales son simples y no requieren equipamientos e insumos costosos (Kim y col., 2009).

En particular, este método funciona eficientemente en muchas especies de plantas, como tabaco, papa, lechuga, arveja, uva y *Arabidopsis* (Mestre y col., 2000; Van der Hoorn y col., 2000; Wroblewski y col., 2005; Santos-Rosa y col., 2008). Sin embargo, este sistema no había sido utilizado en girasol hasta el desarrollo de este trabajo de tesis, en el que se establecieron las condiciones para realizar este método de forma equivalente a otras especies, definiéndose entre los factores importantes para el ensayo el estadio de desarrollo de las plantas y los genotipos (backgrounds genéticos) de *Agrobacterium*.

Manavella y Chan (2009) realizaron la infiltración de girasol mediante la aplicación de vacío a discos de hoja en el estadio R1 utilizando la cepa LBA4404. Este método requiere el cultivo in vitro de estos discos en cámaras de cría durante 3 días, luego del cual se realizan los diferentes análisis, siendo posible que las condiciones fisiológicas de estos tejidos ya no representen las de los tejidos de plantas crecidas en invernáculo. Estos autores aseguran que en girasol la estructura de la hoja y la dureza de la epidermis dificultan la entrada de la suspensión bacteriana, en concordancia con lo observado en este trabajo para las hojas de la planta en estadio V12, pero no así con lo observado para las plantas V2 en las que la suspensión bacteriana se esparció dentro de las hojas. Al igual que estos autores, en el presente trabajo de tesis fue posible medir de modo directo la actividad de distintos promotores por cuantificación fluorométrica de MUG, además de por detección histoquímica de GUS, sin la necesidad de un pasaje por cultivo in vitro y por lo tanto, conservando las condiciones fisiológicas de los tejidos.

Por otro lado, el hecho que la estructura de la hoja puede afectar la infiltración fue informado previamente por Wroblewski y col. (2005) describiéndolo en lechuga, pimienta, *N. tabacum* y algodón, tal como se observó en girasol en este trabajo de tesis (figura 18 B). Las suspensiones bacterianas penetraban los tejidos de la hoja pero su dispersión se veía limitada por las nervaduras de las hojas, al contrario de lo que ocurre en *Nicotiana benthamiana* (figura 18 A), *Petunia hybrida*, tomate y *Arabidopsis*. Una ventaja de este comportamiento, es que estas barreras físicas permiten el ensayo simultáneo de diferentes construcciones, evitando resultados dudosos por la posibilidad de superposición de las zonas agroinfiltradas.

Los backgrounds de las cepas bacterianas utilizadas condicionan considerablemente la eficiencia de la expresión transitoria. Las diferentes cepas de *Agrobacterium* son definidas por sus backgrounds cromosomales y la presencia de plásmidos Ti residentes. La mayoría de las cepas ampliamente utilizadas se originan de dos aislamientos representativos, C58 (Hamilton y Fall, 1971) y Ach5 (Hoekema y col., 1983). Las cepas EHA105 y GV3101 tienen el origen C58. La cepa LBA4404, una de las más comúnmente utilizadas en esta técnica, se origina a partir del background cromosomal Ach5.

La virulencia de las cepas depende de las especies de planta blanco. Estas variaciones son causadas por las diferencias, ya sean en la habilidad de las células bacterianas de unirse a las células vegetales o en los mecanismos de transferencia del ADN-T, codificados tanto por la bacteria como por la planta (Yanofsky y col., 1985a; Yanofsky y col., 1985b; Nam y col., 1997). Sin embargo, se desconocen cuáles son los componentes del huésped que afectan el

proceso de reconocimiento, la transferencia del ADN y la integración del ADN-T en el huésped (Ditt y col., 2001).

Pareciera que cepas específicas de *Agrobacterium* funcionan mejor que otras en especies vegetales específicas. Por ejemplo, se ha sugerido que la cepa C58C1 es más adecuada para la expresión transitoria en lechuga, tabaco y *Arabidopsis* (Wroblewski y col., 2005). De acuerdo a esta observación en este trabajo de tesis se demostró que la cepa EHA105 fue la más adecuada para la agroinfiltración de girasol. Además se demostró en Zavallo (2006) que esta cepa era la más adecuada para la transformación transitoria y estable de girasol.

Previamente, había sido publicado que las respuestas necróticas a *Agrobacterium* son un problema muy importante para los ensayos de transformación en uva (Yanofsky y col., 1985a; Yanofsky y col., 1985b), tomate, papa, pepino y pimiento (Van der Hoorn y col., 2000). En el presente estudio ninguna de las cepas estudiadas produjo una respuesta necrótica en las condiciones ensayadas. En el caso de LBA4404 se observó algo de daño en hojas agroinfiltradas de la planta V12 (figura 16), pero esta respuesta se debió más probablemente al daño causado por la manipulación de la lámina de la hoja, que a otros factores como la virulencia de *Agrobacterium*.

La intensidad óptima de detección histoquímica de GUS se observó a los 3 días de la agroinfiltración y luego decreció. Este hecho fue informado previamente por Wroblewski y col. (2005) para todas las especies analizadas y por Kim y col. (2009) en *Arabidopsis*, en concordancia con los resultados presentados.

La puesta a punto de este método otorga una herramienta importante para el análisis de distintos promotores, como así también la posibilidad de realizar distintos tratamientos de la misma forma en que se realizan en otras especies vegetales.

5.6. Análisis de la transformación transitoria de girasol con distintos promotores

Hasta este momento, no se había realizado una comparación de promotores en girasol, a diferencia de otras especies como por ejemplo centeno, maíz y tabaco (Schledzewski y Mendel, 1994), *Arabidopsis thaliana* (Holtorf y col., 1995; Gandhi y col., 1999), lechuga (Curtis y col., 1994b; McCabe y col., 1999), gladiolo (Kamo y Blowers, 1999), alfalfa (Samac y col., 2004) y zanahoria (Wally y col., 2008).

En este trabajo se demostró que, en principio, no existen diferencias estadísticamente significativas en los niveles de expresión del gen reportero entre los promotores *rbcS1* y *CaMV35S* al menos en los ensayos de expresión transitoria en hojas de girasol (figura 20), pero en la evaluación de la expresión transitoria de los explantos blanco de transformación estable, los niveles de expresión del promotor *rbcS1* presentaron diferencias significativas con el promotor *CaMV35S* (figura 24). En consecuencia, el promotor *rbcS1* fue considerado como el mejor candidato ensayado para reemplazar al promotor *CaMV35S*. Adicionalmente, se observó por detección histoquímica de GUS que la expresión de este promotor se encontraba principalmente en la zona del hemiembrión (zona meristemática) a partir de la cual se regeneran los brotes (figura 23).

Al mismo tiempo, se destacó la importancia de realizar las evaluaciones de actividad de promotores, en el sistema propio de estudio. Por ejemplo, el promotor PPC descrito como un promotor fuerte en lechuga (Curtis y col., 1994b), la especie modelo de la familia Asteraceae, es prácticamente no funcional en girasol, quedando así manifiesta la importancia de haber puesto a punto la técnica de la agroinfiltración y la evaluación de los explantos de transformación en forma temprana, evitando el análisis en sistemas heterólogos.

También se descartó, la utilización del promotor *2X35S*, a pesar de haberse obtenido niveles de expresión elevados, debido a que este promotor consiste en una duplicación del enhancer del promotor *CaMV35S*. Este enhancer es considerado como el posible causante de los efectos negativos de este promotor (Yoo y col., 2005; Gudynaite-Savitch y col., 2009).

La expresión dada por el promotor nos, tanto en el análisis de expresión transitoria de los explantos de transformación, como en la agroinfiltración de girasol, fue muy baja en comparación a los restantes promotores, con excepción del promotor PPC. Considerando que el promotor nos, regula la expresión del gen de selección en todas las construcciones utilizadas en transformación de girasol, sería necesario evaluar distintos promotores para lograr un aumento en los niveles de eficiencia de transformación y el número de plántulas transgénicas obtenidas en cada ensayo de transformación. En este caso, se debe tener presente que, como afirman Prakash y col. (2008), el uso de un promotor fuerte no siempre se correlaciona con una frecuencia de transformación más alta. De esta manera, sería posible reconsiderar la selección utilizando el herbicida glufosinato de amonio mediante la expresión del gen *bar*, regulado por otro promotor distinto de nos. El uso de este herbicida fue descartado en el grupo de trabajo por la imposibilidad de establecer un criterio de selección (tratado en el ítem 1.6.3).

5.7. Análisis de la transformación estable de girasol utilizando el promotor rbcS1

El promotor de rbcS1 es homólogo a los promotores de los genes de rbcS, altamente expresados de las familias Asteraceae, Fabaceae y Solanaceae. Este promotor fue utilizado para expresar inhibidores de proteasas en plantas de papa, debido al mayor nivel de expresión promedio conseguidos en comparación con el promotor Lhca.3.St1 de papa y el promotor CaMV35S (Outchkourov y col., 2003; Outchkourov y col., 2004). La comparación del promotor rbcS1 con el CaMV35S, regulando la expresión de la β -glucuronidasa en tabaco y crisantemo, mostró que la actividad promedio de la enzima era 8 veces más alta en la construcción conteniendo el promotor rbcS1 (Outchkourov y col., 2003). Mett y col. (2007) expresaron un autoantígeno de la diabetes tipo 1 en plantas de *Nicotiana benthamiana*, con niveles 2 a 3 veces más altos cuando el promotor rbcS1 controlaba la expresión en lugar del CaMV35S. En concordancia con estos resultados, los niveles de expresión en transformación estable de girasol con el promotor rbcS1 (figuras 31 y 36) fueron más altos que los obtenidos con el promotor CaMV35S.

Los altos niveles de expresión obtenidos con este promotor en distintas especies, llevaron a su uso para la expresión de antígenos en plantas para la producción de vacunas. Como ejemplo se pueden mencionar, la expresión en tabaco y col de una vacuna a subunidad contra la viruela (Golovkin y col., 2007), la expresión de los componentes de la vacuna trivalente para difteria-tétanos-tos ferina en forma soluble en plantas de tabaco (Brodzik y col., 2009), la expresión por agroinfiltración en *N. benthamiana* del gen de la glicoproteína hemaglutinina-neuroaminidasa del virus de la enfermedad de Newcastle (Gómez y col., 2009) y de una potencial vacuna del virus de la inmunodeficiencia humana en tabaco (Scotti y col., 2009). Del mismo modo, fue utilizado en ajo para obtener plantas con resistencia al lepidóptero *Spodoptera exigua* (Zheng y col., 2004; Zheng y col., 2005) y en la caracterización de los genes que codifican la enzima final en la biosíntesis de sinapina, el compuesto más abundante en las semillas de *Brassica napus* (Weier y col., 2008).

El hecho de que de 38 plantas T1 evaluadas, que resultaron positivas por PCR, sólo 6 plantas T1 presentaran expresión del gen reportero, podría deberse a un silenciamiento tanto a nivel transcripcional (una o múltiples copias se integraron en un locus localizado en o cercano a secuencias genómicas hipermetiladas) como postranscripcional (la transcripción ocurre pero no se acumula el ARN) (Vaucheret y col., 1998).

Debe destacarse que hasta el momento no se han publicado trabajos que describan efectos negativos de este promotor sobre las plantas transformadas.

5.8. Efecto en trans del promotor CaMV35S sobre la construcción nos-nptII

La primer publicación que describe un efecto en trans del promotor CaMV35S fue realizada por Yoo y col. (2005). Estos autores describen que el promotor CaMV35S afectaba y alteraba en trans el patrón de expresión de transgenes específicos de tejido y cambiaba el fenotipo de las plantas transgénicas, mientras que esta interferencia desaparecía cuando este promotor era reemplazado. En este trabajo sugieren que estos efectos son provocados por el enhancer del promotor CaMV35S. Posteriormente, Zheng y col. (2007) describen que la presencia del promotor CaMV35S afecta la expresión de otros promotores dirigiendo diferentes genes reporteros en plantas de tabaco. Así, el promotor CaMV35S convierte a los promotores AGL5 específico de ovario, PAB5 específico de embriogénesis temprana y tejidos reproductivos y al promotor AAP2 específico de tejidos vasculares, en promotores constitutivos. Los autores proponen entonces la utilización del promotor nos para reemplazar al CaMV35S.

Recientemente, Gudynaite-Savitch y col. (2009) estudiaron en transformación genética de *Arabidopsis thaliana* la interferencia provocada por el promotor CaMV35S, dirigiendo la expresión del gen de selección, sobre promotores tejido específicos ubicados dentro de la misma construcción. Estos autores determinaron que el promotor CaMV35S interfiere con la correcta expresión de los transgenes y provoca una pérdida de la especificidad transcripcional. Este efecto desaparece al reemplazar al promotor CaMV35S o al aumentar la distancia entre ambos promotores. Adicionalmente aseguran que el potencial de interacción de cada promotor con el promotor CaMV35S debe ser investigado en profundidad, ya que encuentran diferente susceptibilidad a esta interacción para los promotores de una napina de *Brassica napus* y de la peroxidasa Prx de soja.

En este trabajo de tesis el reemplazo del promotor CaMV35S por el promotor rbcS1, produjo un aumento en los niveles de eficiencia en la transformación de girasol, debido a un aumento del número de plántulas capaces de enraizar en presencia del antibiótico kanamicina. Esto podría indicar que la presencia del promotor CaMV35S estaría afectando en trans la expresión del gen de selección regulada por el promotor nos. Al mismo tiempo, las plántulas obtenidas con el promotor rbcS1 presentaron en su mayoría un aspecto saludable y aquellas capaces de

enraizar en el medio selectivo produjeron, en general, raíces abundantes (figura 28 B). Además, todos los brotes transferidos al invernáculo se adaptaron perfectamente a las condiciones ex vitro, produciendo plantas de gran porte, con capítulos florales más grandes y con un aumento importante en el número y tamaño de los aquenios producidos (figuras 29 y 30). Es necesario señalar que esta respuesta de las plantas en el invernáculo, no había sido observada en el laboratorio al trabajar con los diferentes vectores conteniendo el promotor CaMV35S. Este hecho indicaría, tal como describen Yoo y col. (2005), que la presencia del promotor viral estaría afectando de algún modo la respuesta en general de la planta T0.

5.9. Consideraciones finales

A partir de los resultados obtenidos durante el desarrollo de esta tesis, podría afirmarse que las grandes dificultades encontradas en la transformación genética de girasol, considerando tanto la experiencia propia como la manifiesta en la bibliografía internacional, se deben al efecto producido por el promotor CaMV35S y no a la fisiología y genética del girasol per se. Por otra parte, este trabajo de tesis dio origen a la investigación del promotor CaMV35S en nuestro Instituto, del que deben estudiarse los motivos de su marcado efecto en las especies de la familia Asteraceae. Así también, es el principio del establecimiento de las bases para la caracterización in vivo de genes de interés agronómico, cuyo logro constituyó el objetivo principal de esta tesis. Además, el análisis de la estabilidad de los transgenes con el promotor rbcS1, será motivo de futuras investigaciones de nuestro grupo de trabajo. Por todo lo expuesto los objetivos propuestos fueron alcanzados permitiendo cumplimentar la hipótesis planteada.

Conclusiones

6. Conclusiones

1. La eficiencia del esquema de selección fue mejorada, por el incremento gradual de la concentración del antibiótico kanamicina, en los sucesivos pasos de regeneración in vitro y de enraizamiento.
2. La coloración de las plántulas in vitro en presencia de kanamicina no puede ser utilizada como criterio de selección, confirmándose así los resultados obtenidos previamente utilizando el vector GUS-intrón.
3. Se adaptó e implementó la técnica de transformación genética de lechuga, variedad Grand Rapids.
4. Se puso a punto el único protocolo de agroinfiltración en hojas de plantas de girasol mantenidas en invernáculo, similar al descrito para *Nicotiana benthamiana*, que permite la evaluación de distintas actividades evitando el uso de sistemas heterólogos.
5. Quedó demostrada la importancia de realizar los ensayos de evaluación de actividad de promotores en el propio sistema de estudio, a partir de que el promotor PPC, descrito como un buen promotor en lechuga (especie modelo en la transformación de asteráceas), es prácticamente no funcional en girasol.
6. Se demostró la importancia de evaluar los resultados de las transformaciones mediante diferentes métodos, como la detección histoquímica de GUS y la determinación fluorométrica de MUG.
7. Las plántulas transformadas con la construcción conteniendo el promotor *rbcS1*, presentaron en general un aspecto más saludable, y aquellas capaces de enraizar en el medio selectivo produjeron raíces principales con abundantes raíces secundarias.
8. En condiciones ex vitro, las plantas obtenidas con el promotor *rbcS1*, presentaron mayor altura y mayor tamaño de sus capítulos florales, que llevaron a un aumento en el número y tamaño de los aquenios.
9. Las plantas T0 y T1 obtenidas con el promotor *rbcS1*, presentaron niveles de expresión comparables a los obtenidos en otras especies con promotores constitutivos.
10. La transformación de girasol fue realizada con niveles de eficiencia similares a los obtenidos en otras especies, cercanos al 7 %.

11. La presencia del promotor constitutivo de origen viral CaMV35S, regulando la expresión del gen reportero de la β -glucuronidasa, afectaría en trans al gen de selección nptII bajo la regulación del promotor nos que se encuentra en el mismo vector de transformación, produciendo bajos niveles de eficiencia de transformación.

Lic. Laura M. Radonic
Tesisista

Dr. H. Esteban Hopp
Director

Dra. Marisa López Bilbao
Director Asistente

Bibliografía

Bibliografía

- "Compositae Genome Project" de <http://compgenomics.ucdavis.edu/index>.
- "La Argentina en Mapas" de www.laargentinaenmapas.gov.ar.
- "Asociación Argentina de Girasol" (2008) de www.asagir.org.ar.
- Aida R, Nagaya S, Yoshida K, Kishimoto S, Shibata M y Ohmiya A (2005) Efficient Transgene Expression in Chrysanthemum, *Chrysanthemum morifolium* Ramat., with the Promoter of a Gene for Tobacco Elongation Factor 1.ALPHA. Protein. Japan Agricultural Research Quarterly, 39(4): 269-274.
- Aida R, Ohira K, Tanaka Y, Yoshida K, Kishimoto S, Shibata M y Ohmiya A (2004) Efficient Transgene Expression in Chrysanthemum, *Dendranthema grandiflorum* (Ramat.) Kitamura, by Using the Promoter of a Gene for Chrysanthemum Chlorophyll-a/b-binding Protein. Breeding Science, 54(1): 51-58.
- Al-Kaff NS, Kreike MM, Covey SN, Pitcher R, Page AM y Dale PJ (2000) Plants rendered herbicide-susceptible by cauliflower mosaic virus-elicited suppression of a 35S promoter-regulated transgene. Nature Biotechnology, 18(9): 995-999.
- Alibert B, Lucas O, Le Gall V, Kallerhoff J y Alibert G (1999) Pectolytic enzyme treatment of sunflower explants prior to wounding and cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*, enhances efficiency of transient β -glucuronidase expression. Physiologia Plantarum, 106(2): 232-237.
- Alibert G, Aslane-Chanabe C y Burrus M (1994) Sunflower tissue and cell cultures and their use in biotechnology. Plant Physiology and Biochemistry, 32(1): 31-44.
- An G (1986) Development of plant promoter expression vectors and their use for analysis of differential activity of the nopaline synthase promoter in transformed tobacco cells. Plant Physiology, 81: 86-91.
- Annadana S, Beekwilder MJ, Kuipers G, Visser PB, Outchkourov NS, Pereira A, Udayakumar M, De Jong J y Jongsma MA (2002a) Cloning of the chrysanthemum UEP1 promoter and comparative expression in florets and leaves of *Dendranthema grandiflora*. Transgenic Research, 11(4): 437-445.
- Annadana S, Kuiper G, Visser PB, De Kogel WJ, Udayakumar M y Jongsma MA (2002b) Expression of potato multicystatin in florets of chrysanthemum and assessment of resistance to western flower thrips, *Frankliniella occidentalis*. ISHS Acta Horticulturae, 572: 121-129.
- Annadana S, Mlynárová L, Udayakumar M, de Jong J y Nap J-P (2002c) The potato Lhca3.St.1 promoter confers high and stable transgene expression in chrysanthemum, in contrast to CaMV-based promoters. Molecular Breeding, 8(4): 335-344.
- Aoyama T y Chua N-H (1997) A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. The Plant Journal, 11(3): 605-612.
- Asurmendi S (2002) Desarrollo y aplicación de un sistema de expresión de poliproteínas autoclivables basado en la proteasa NIa del virus TEV para la obtención de plantas transgénicas con capacidad de procesar, secretar y dirigir subcelularmente

- las proteínas expresadas. Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
- Baker CM, Muñoz-Fernandez N y Carter CD (1999) Improved shoot development and rooting from mature cotyledons of sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 58(1): 39-49.
 - Baulcombe D (1999) Gene silencing: RNA makes RNA makes no protein. *Current Biology*, 9: 599-601.
 - Bazzini AA, Mongelli VC, Hopp HE, del Vas M y Asurmendi S (2007) A practical approach to the understanding and teaching of RNA silencing in plants. *Electronic Journal of Biotechnology*, 10(2): 178-190.
 - Benfey PN y Chua N-H (1990) The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants. *Science*, 250(4983): 959-966.
 - Bernard P y Couturier M (1992) Cell killing by the F plasmid CcdB protein involves poisoning of DNA-topoisomerase II complexes. *Journal of Molecular Biology*, 226(3): 735-745.
 - Berrios E, Gentzbittel L, Alibert G, Griveau Y, Bervillé A y Sarrafi A (1999a) Genetic control of in vitro-organogenesis in recombinant inbred lines of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding*, 118(4): 359-361.
 - Berrios E, Gentzbittel L, Serieys H, Alibert G y Sarrafi A (1999b) Influence of genotype and gelling agents on in vitro regeneration by organogenesis in sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59: 65-69.
 - Bidney D, Scelonge C, Martich J, Burrus M, Sims L y Huffman G (1992) Microprojectile bombardment of plant tissues increases transformation frequency by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology*, 18(2): 301-313.
 - Bradford MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 72(1-2): 248-254.
 - Bradley C, Markell S y Gulya T (2007). Diseases of sunflower. En *Sunflower Production*. (Berghlund DR). Fargo, North Dakota: 54-77.
 - Brodzik R, Spitsin S, Pogrebnyak N, Bandurska K, Portocarrero C, Andryszak K, Koprowski H y Golovkin M (2009) Generation of plant-derived recombinant DTP subunit vaccine. *Vaccine*, 27(28): 3730-3734.
 - Broglie K, Chet I, Holliday M, Cressman R, Biddle P, Knowlton S, Mauvais CJ y Broglie R (1991) Transgenic plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani*. *Science*, 254: 1194-1197.
 - Bronner R, Jeannin G y Hahne G (1994) Early cellular events during organogenesis and somatic embryogenesis induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus*). *Canadian Journal of Botany*, 72(2): 239-248.
 - Burrus M, Chanabe C, Alibert G y Bidney DL (1991) Regeneration of fertile plants from protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 10: 161-166.
 - Burrus M, Molinier J, Himer C, Hunold R, Bronner R, Rousselin P y Hahne G (1996) *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) shoot apices: transformation patterns. *Molecular Breeding*, 2(4): 329-338.

-
- Bustos MM, Guiltinan MJ, Jordano J, Begum D, Kalkan FA y Hall TC (1989) Regulation of β -glucuronidase expression in transgenic tobacco plants by an A/T-rich, cis-acting sequence found upstream of a French bean β -phaseolin gene. *Plant Cell*, 1(9): 839-853.
 - Caddick MX, Greenland AJ, Jepson I, Krause K-P, Qu N, Riddell KV, Salter MG, Schuch W, Sonnewald U y Tomsett AB (1998) An ethanol inducible gene switch for plants used to manipulate carbon metabolism. *Nature Biotechnology*, 16(2): 177-180.
 - Ceriani MF, Hopp HE, Hahne G y Escandón AS (1992) Cotyledons: an Explant for Routine Regeneration of Sunflower Plants. *Plant and Cell Physiology*, 33(2): 157-164.
 - Curtis IS, Power JB, Blackhall NW, de Laat AMM y R. DM (1994a) Genotype-independent transformation of lettuce using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Experimental Botany*, 45(279): 1441-1449.
 - Curtis IS, Power JB, McCabe MS, de Laat AMM y Davey MR (1994b) Promoter-GUS fusions in lettuce (Abstract 1682) 4th International Congress of Plant Molecular Biology, The International Society for Plant Molecular Biology, Amsterdam.
 - Chamberland S, Daigle N y Bernier F (1992) The legumin boxes and the 3' part of a soybean beta-conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants. *Plant Molecular Biology*, 19(6): 937-949.
 - Chandler VL y Vaucheret H (2001) Gene activation and gene silencing. *Plant Physiology*, 125(1): 145-148.
 - Chraibi KM, Castelle J-C, Latche A, Roustan J-P y Fallot J (1992) A genotype-independent system of regeneration from cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus* L.). The role of ethylene. *Plant Science*, 86(2): 215-221.
 - Chraibi KM, Latche A, Roustan JP y Fallot J (1991) Stimulation of shoot regeneration from cotyledons of *Helianthus annuus* by the ethylene inhibitors, silver and cobalt. *Plant Cell Reports*, 10: 204-207.
 - Christensen AH y Quail PH (1996) Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Research*, 5(3): 213-218.
 - Dağüstü N, Fraser P, Enfissi E y Bramley P (2008) Screening for high callus induction and *Agrobacterium*-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biotechnology and Biotechnological Equipment*, 22(4): 933-937.
 - Datta K, Muthukrishnan S y Datta SK (1999) Expression and function of PR-protein genes in transgenic plants. *Pathogenesis-Related Proteins in Plants*: 231-278.
 - Davey MR, Anthony P, Van Hooff P, Power JB y Lowe K (2007). Lettuce. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. (Pua E-C y Davey MR), Springer Berlin Heidelberg. 59: 221-249.
 - Davey MR, McCabe MS, Mohapatra U, Power JB, Khachatourians GG, McHughen A, Scorza R, Nip WK y Hui YH (2002). Genetic manipulation of lettuce. En *Transgenic Plants and Crops*: 613.
 - De Loose M, Danthinne X, Van Bockstaele E, Van Montagu M y Depicker A (1995) Different 5' leader sequences modulate β -glucuronidase accumulation levels in transgenic *Nicotiana tabacum* plants. *Euphytica*, 85(1-3): 209-216.

-
- Deglene L, Lesignes P, Alibert G y Sarrafi A (1997) Genetic control of organogenesis in cotyledons of sunflower (*Helianthus annuus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 48(2): 127-130.
 - Depicker A, Stachel S, Dhaese P, Zambryski P y Goodman HM (1982) Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence. *Journal of Molecular and Applied Genetics*, 1(6): 561-573.
 - Dhaka N y Kothari SL (2002) Phenylacetic acid improves bud elongation and in vitro plant regeneration efficiency in *Helianthus annuus* L. *Plant Cell Reports*, 21(1): 29-34.
 - Ditt R, Nester EW y Comai L (2001) Plant gene expression responses to *Agrobacterium tumefaciens*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98: 10954-10959.
 - Escandón AS y Hahne G (1991) Genotype and composition of culture medium are factors important in the selection for transformed sunflower (*Helianthus annuus*) callus. *Physiologia Plantarum*, 81(3): 367-376.
 - Finer JJ (1987) Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of hybrid sunflower (*Helianthus annuus* L.) on a high-sucrose medium. *Plant Cell Reports*, 6(5): 372-374.
 - Finnegan J y Mc Elroy D (1994) Transgene Inactivation: Plants Fight Back! *Nature Biotechnology*, 12: 883-888.
 - Frederick RD, Thilmony RL, Sessa G y Martin GB (1998) Recognition specificity for the bacterial avirulence protein AvrPto is determined by Thr-204 in the activation loop of the tomato Pto kinase. *Molecular Cell*, 2: 241-245.
 - Freyssinet M y Freyssinet G (1988) Fertile plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature embryos. *Plant Science*, 56(2): 177-181.
 - Funk VA, Bayer RJ, Keeley S, Chan R, Watson L, Gemeinholzer B, Schilling E, Panero JL, Baldwin BG, Garcia-Jacas N, Susanna A y Jansen R (2005) Everywhere but Antarctica: using a supertree to understand the diversity and distribution of the Compositae. *Biologiske Skrifter*, 55: 343-374.
 - Gallie DR y Walbot V (1992) Identification of the motifs within the tobacco mosaic virus 5'-leader responsible for enhancing translation. *Nucleic Acids Research*, 20(17): 4631-4638.
 - Gandhi R, Maheshwari SC y Khurana P (1999) Transient gene expression and influence on foreign gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *In Vitro Cell Dev Biol Plant*, 35: 232-237.
 - Golovkin M, Spitsin S, Andrianov V, Smirnov Y, Xiao Y, Pogrebnyak N, Markley K, Brodzik R, Gleba Y, Isaacs SN y Koprowski H (2007) Smallpox subunit vaccine produced in planta confers protection in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(16): 6864-6869.
 - Gómez E, Zoth SC, Asurmendi S, Vázquez Rovere C y Berinstein A (2009) Expression of Hemagglutinin-Neuraminidase glycoprotein of Newcastle Disease Virus in agroinfiltrated *Nicotiana benthamiana* plants. *Journal of Biotechnology*, 144(4): 337-340.
 - Grayburn WS y Vick BA (1995) Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.) following wounding with glass beads. *Plant Cell Reports*, 14(5): 285-289.

- Greco B, Tanzarella OA, Carrozzo G y Blanco A (1984) Callus induction and shoot regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Science Letters*, 36(1): 73-77.
- Gudynaite-Savitch L, Johnson DA y Miki BLA (2009) Strategies to mitigate transgene-promoter interactions. *Plant Biotechnology Journal*, 7(5): 472-485.
- Gulya TJ, Shiel PJ, Freeman T, Jordan RL, Isakeit T y Berger PH (2002) Host Range and Characterization of Sunflower mosaic virus. *Phytopathology*, 92(7): 694-702.
- Hamilton RH y Fall MZ (1971) The loss of tumour-initiating ability in *Agrobacterium tumefaciens* by incubation at high temperature. *Experientia*, 27: 229-230.
- Hanahan D (1983) Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *Journal of Molecular Biology*, 166(4): 557-580.
- Hartley JL, Temple GF y Brasch MA (2000) DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Research*, 10(11): 1788-1795.
- Hesley J (1999) The economic impact of weeds, diseases, and insects on world sunflower production. Rochester Consulting Group report.
- Hewezi T, Perrault A, Alibert G y Kallerhoff J (2002) Dehydrating immature embryo split apices and rehydrating with *Agrobacterium tumefaciens*: A new method for genetically transforming recalcitrant sunflower. *Plant Molecular Biology Reporter*, 20(4): 335-345.
- Heywood VH (1978) Flowering plants of the world. Englewood Cliffs, N. J., PrenticeHall.
- Hoekema A, Hirsch PR, Hooykaas PJJ y Schilperoort RA (1983) A binary plant vector strategy based on separation of vir- and T-region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti-plasmid. *Nature*, 303: 179-180.
- Hoff T, Schnorr KM y Mundy J (2001) A recombinase-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant Molecular Biology*, 45(1): 41-49.
- Holsters M, Silva B, van Vliet F, Genetello C, de Block M, Dhaese P, Depicker A, Inzé D, Engler G, Villarroel R, Van Montagu M y Schell J (1980) The functional organization of the nopaline *Agrobacterium tumefaciens* plasmid pTiC58. *Plasmid*, 3(2): 212-230.
- Holtorf S, Apel K y Bohlmann H (1995) Comparison of different constitutive and inducible promoters for the overexpression of transgenes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Molecular Biology*, 29: 637-646.
- Hood EE, Gelvin SB, Melchers LS y Hoekema A (1993) New *Agrobacterium* helper plasmids for gene transfer to plants. *Transgenic Research*, 2(4): 208-218.
- Horvath H, Huang J, Wong O, Kohl E, Okita T, Kannangara CG y von Wettstein D (2000) The production of recombinant proteins in transgenic barley grains. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97(4): 1914-1919.
- Hraska M, Rakousky S y Cum V (2008) Tracking of the CaMV-35S promoter performance in GFP transgenic tobacco, with a special emphasis on flowers and reproductive organs, confirmed its predominant activity in vascular tissues. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 94: 239-251.

- Hu X, Bidney DL, Yalpani N, Duvick JP, Crasta O, Folkerts O y Lu G (2003) Overexpression of a gene encoding hydrogen peroxide-generating oxalate oxidase evokes defense responses in sunflower. *Plant Physiology*, 133(1): 170-181.
- Ikeda M, Matsumura M y Kamada H (2005) Suitability of small and branching sunflower varieties for molecular genetic experiments and their transformation by *Agrobacterium* infection. *Plant Biotechnology*, 22(2): 97-104.
- Ito H, Hiraga S, Tsugawa H, Matsui H, Honma M, Otsuki Y, Murakami T y Ohashi Y (2000) Xylem-specific expression of wound-inducible rice peroxidase genes in transgenic plants. *Plant Science*, 155(1): 85-100.
- Jach G, Gornhardt B, Mundy J, Logemann J, Pinsdorf E, Leah R, Schell J y Maas C (1995) Enhanced quantitative resistance against fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco. *The Plant Journal*, 8(1): 97-109.
- Jeannin G, Bronner R y Hahne G (1995) Somatic embryogenesis and organogenesis induced on the immature zygotic embryo of sunflower (*Helianthus annuus* L.) cultivated in vitro: role of the sugar. *Plant Cell Reports*, 15(3-4): 200-204.
- Jeannin G y Hahne G (1991) Donor plant growth conditions and regeneration of fertile plants from somatic embryos induced on immature zygotic embryos of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Breeding*, 107(4): 280 - 287.
- Jefferson RA, Kavanagh TA y Bevan MW (1987) GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 6(13): 3901-3907.
- Jordano J, Almoguera C y Thomas TL (1989) A sunflower helianthinin gene upstream sequence ensemble contains an enhancer and sites of nuclear protein interaction. *Plant Cell*, 1(9): 855-866.
- Kamo K y Blowers A (1999) Tissue specificity and expression level of GUSA under rolD, mannopine synthase and translation elongation factor 1 subunit alpha promoters in transgenic *Gladiolus* plants. *Plant Cell Reports*, 18: 809-815.
- Kang T-J, Kwon T-H, Kim T-G, Loc N-H y Yang M-S (2003) Comparing constitutive promoters using CAT activity in transgenic tobacco plants. *Molecules and Cells*, 16(1): 117-122.
- Kapila J, De Rycke R, Van Montagu M y Angenon G (1997) An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. *Plant Science*, 122(1): 101-108.
- Karimi M, Inzé D y Depicker A (2002) GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends in Plant Science*, 7(5): 193-195.
- Kay R, Chan A, Daly M y McPherson J (1987) Duplication of CaMV 35S Promoter Sequences Creates a Strong Enhancer for Plant Genes. *Science*, 236(4806): 1299-1302.
- Kesseli RV y Michelmore RW (1997). The Compositae: systematically fascinating but specifically neglected. En *Genome Mapping in Plants*. (Paterson AH). Georgetown, TX, R. G. Landes Co.: 179-191.

-
- Kim MJ, Baek K y Park C-M (2009) Optimization of conditions for transient *Agrobacterium*-mediated gene expression assays in *Arabidopsis*. *Plant Cell Reports*, 28: 1159-1167.
 - Kim SR, Kim Y y An G (1993) Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter. *Plant Physiology*, 103: 97-103.
 - Knittel N, Escandón AS y Hahne G (1991) Plant regeneration at high frequency from mature sunflower cotyledons. *Plant Science*, 73(2): 219-226.
 - Knittel N, Gruber V, Hahne G y Lenee P (1994) Transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): a reliable protocol. *Plant Cell Reports*, 14(2-3): 81-86.
 - Kohli A, Griffiths S, Palacios N, Twyman RM, Vain P, Laurie DA y Christou P (1999) Molecular characterization of transforming plasmid rearrangements in transgenic rice reveals a recombination hotspot in the CaMV 35S promoter and confirms the predominance of microhomology mediated recombination. *The Plant Journal*, 17(6): 591-601.
 - Kononowicz H, Wang YE, Habeck LL y Gelvin SB (1992) Subdomains of the octopine synthase upstream activating element direct cell-specific expression in transgenic tobacco plants. *Plant Cell*, 4: 17-27.
 - Konov A, Bronner R, Skryabin K y Hahne G (1998) Formation of epiphyllous buds in sunflower (*Helianthus annuus* L.): induction in vitro and cellular origin. *Plant Science*, 135(1): 77-86.
 - Krasnyanski S y Menczel L (1993) Somatic embryogenesis and plant regeneration from hypocotyl protoplasts of sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 12(5): 260-263.
 - Landy A (1989) Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda site-specific recombination. *Annual Review of Biochemistry*, 58: 913-949.
 - Lenardon SL, Giolitti F, León A, Bazzalo ME y Grondona M (2001) Effect of sunflower chlorotic mottle virus infection on sunflower yield parameters. *Helia*, 24(35): 55-65.
 - Lessard PA, Allen RD, Fujiwara T y Beachy RN (1993) Upstream regulatory sequences from two β -conglycinin genes. *Plant Molecular Biology*, 22(5): 873-885.
 - Lewi DM, Hopp HE y Escandón AS (2006). Sunflower (*Helianthus annuus* L.). En *Agrobacterium Protocols*, Humana Press. 343: 291-298.
 - Lucas O, Kallerhoff J y Alibert G (2000) Production of stable transgenic sunflowers (*Helianthus annuus* L.) from wounded immature embryos by particle bombardment and co-cultivation with *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular Breeding*, 6(5): 479-487.
 - Lupi MC, Bennici A, Locci F y Gennai D (1987) Plantlet formation from callus and shoot-tip culture of *Helianthus annuus* (L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 11(1): 47-55.
 - Malone-Schoneberg J, Scelonge CJ, Burrus M y Bidney DL (1994) Stable transformation of sunflower using *Agrobacterium* and split embryonic axis explants. *Plant Science*, 103(2): 199-207.

- Manavella PA y Chan RL (2009) Transient transformation of sunflower leaf discs via an *Agrobacterium*-mediated method: applications for gene expression and silencing studies. *Nature Protocols*, 4(11): 1699-1707.
- Mayor ML, Nestares G, Zorzoli R y Picardi LA (2003) Reduction of hyperhydricity in sunflower tissue culture. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 72(1): 99-103.
- McBride KE y Summerfelt KR (1990) Improved binary vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Plant Molecular Biology*, 14: 269-276.
- McCabe MS, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat AM, Power JB y Davey MR (1999) Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a *petE* promoter-bar gene compared with a *CaMV 35S*-bar gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(3-4): 587-592.
- McElroy D, Zhang W, Cao J y Wu R (1990) Isolation of an Efficient Actin Promoter for Use in Rice Transformation. *Plant Cell*, 2(2): 163-171.
- Mestre P, Brigneti G y Baulcombe DC (2000) An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the *Nla* proteinase from potato virus Y. *The Plant Journal*, 23: 653-661.
- Mett V, Shamloul A-M, Hirai H, Zhou Z, Notkins A y Yusibov V (2007) Engineering and expression of the intracellular domain of insulinoma-associated tyrosine phosphatase (IA-2ic), a type 1 diabetes autoantigen, in plants. *Transgenic Research*, 16: 77-84.
- Miao G-H, Hirel B, Marsolier MC, Ridge RW y Verma DPS (1991) Ammonia-regulated expression of a soybean gene encoding cytosolic glutamine synthetase in transgenic *Lotus corniculatus*. *Plant Cell*, 3(1): 11-22.
- Mishiba K-i, Nishihara M, Nakatsuka T, Abe Y, Hirano H, Yokoi T, Kikuchi A y Yamamura S (2005) Consistent transcriptional silencing of 35S-driven transgenes in gentian. *The Plant Journal*, 44: 541-556.
- Mitsuhashi I, Ugaki M, Hirochika H, Ohshima M, Murakami T, Gotoh Y, Katayose Y, Nakamura S, Honkura R, Nishimiya S, Ueno K, Mochizuki A, Tanimoto H, Tsugawa H, Otsuki Y y Ohashi Y (1996) Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant and Cell Physiology*, 37(1): 49-59.
- Mohamed S, Boehm R y Schnabl H (2006) Stable genetic transformation of high oleic *Helianthus annuus* L. genotypes with high efficiency. *Plant Science*, 171(5): 546-554.
- Molinier J, Thomas C, Brignou M y Hahne G (2002) Transient expression of *ipt* gene enhances regeneration and transformation rates of sunflower shoot apices (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 21(3): 251-256.
- Mondal KK, Bhattacharya RC, Koundal KR y Chatterjee SC (2007) Transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) expressing tomato glucanase leads to arrested growth of *Alternaria brassicae*. *Plant Cell Reports*, 26: 247-252.
- Müller A, Iser M y Hess D (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(5): 435-444.
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15(3): 473-497.

-
- Nam J, Matthyse AG y Gelvin SB (1997) Differences in susceptibility of *Arabidopsis* ecotypes to crown gall disease may result from a deficiency in T-DNA integration. *Plant Cell*, 9: 317-333.
 - Negrouk V, Eisner G, Lee H, Han K, Taylor D y Wong HC (2005) Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce. *Plant Science*, 169: 433-438.
 - Nishizawa Y, Saruta M, Nakazono K, Nishio Z, Soma M, Yoshida T, Nakajima E y Hibi T (2003) Characterization of transgenic rice plants over-expressing the stress-inducible beta-glucanase gene *Gns1*. *Plant Molecular Biology*, 51: 143-152.
 - Outchkourov NS, Kogel WJd, Wiegers GL, Abrahamson M y Jongsma MA (2004) Engineered multidomain cysteine protease inhibitors yield resistance against western flower thrips (*Frankliniella occidentalis*) in greenhouse trials. *Plant Biotechnology Journal*, 2: 449-458.
 - Outchkourov NS, Peters J, de Jong J, Rademakers W y Jongsma MA (2003) The promoter-terminator of *chrysanthemum rbcS1* directs very high expression levels in plants. *Planta*, 216(6): 1003-1012.
 - Ouwerkerk PBF, de Kam RJ, Hoge JHC y Meijer AH (2001) Glucocorticoid-inducible gene expression in rice. *Planta*, 213(3): 370-378.
 - Ouyang B, Chen YH, Li HX, Qian CJ, Huang SL y Ye ZB (2005) Transformation of tomatoes with osmotin and chitinase genes and their resistance to *Fusarium* wilt. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(5): 517-522.
 - Parody BP (2003) Cultivo in vitro de girasol (*Helianthus annuus* L.): Optimización de sus distintas etapas. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
 - Paterson KE y Everett NP (1985) Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant Science*, 42(2): 126-132.
 - Pérez Fernández J (2002). Enfermedades: Identificación y manejo. En *Manual práctico para el cultivo de girasol*, Hemisferio Sur: 142-152.
 - Plesse B, Criqui M-C, Durr A, Parmentier Y, Fleck J y Genschik P (2001) Effects of the polyubiquitin gene *Ubi.U4* leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum*. *Plant Molecular Biology*, 45(6): 655-667.
 - Power CJ (1987) Organogenesis from *Helianthus annuus* inbreds and hybrids from the cotyledons of zygotic embryos. *American Journal of Botany*, 74(4): 497-503.
 - Prakash NS, Prasad V, Chidambaram TP, Cherian S, Jayaprakash TL, Dasgupta S, Wang Q, Mann MT, Spencer TM y Boddupall RS (2008) Effect of promoter driving selectable marker on corn transformation. *Transgenic Research*, 17: 695-704.
 - Pwee KH y Gray JC (1993) The pea plastocyanin promoter directs cell-specific but not full light-regulated expression in transgenic tobacco plants. *The Plant Journal*, 3(3): 437-449.
 - Radonic LM (2005) Utilización del antibiótico kanamicina como marcador de selección en la transformación genética de girasol (*Helianthus annuus*). Tesis de Licenciatura, Escuela de Ciencia y Tecnología, Universidad Nacional de General San Martín.

- Radonic LM, Zimmermann JM, Zavallo D, López N y López Bilbao M (2006) Rooting in Km selective media as efficient in vitro selection method for sunflower genetic transformation. *Electronic Journal of Biotechnology*, 9, 315-319 <http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol9/issue3/full/19/index.html>.
- Rozen S y Skaletsky HJ (2000). Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. En *Bioinformatics Methods and Protocols: Methods in Molecular Biology*. (Krawetz S y Misener S). Totowa, NJ, Humana Press: 365-386.
- Saghai-Marroof MA, Soliman KM, Jorgensen RA y Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci USA*, 81(24): 8014-8018.
- Salehi A, Mohammadi M, Okhovvat SM y Omid M (2005) Chitinase gene transformation through *Agrobacterium* and its expression in soybean in order to induce resistance to root rot caused by *Rhizoctonia solani*. *Communications in agricultural and applied biological sciences*, 70(3): 399-406.
- Samac DA, Tesfaye M, Dornbusch M, Saruul P y Temple SJ (2004) A comparison of constitutive promoters for expression of transgenes in alfalfa (*Medicago sativa*). *Transgenic Research*, 13(4): 349-361.
- Sambrook J y Russell DW (2001) *Molecular Cloning. A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Santos-Rosa M, Poutaraud A, Merdinoglu D y Mestre P (2008) Development of a transient expression system in grapevine via agro-infiltration. *Plant Cell Reports*, 27: 1053-1063.
- Scofield SR, Tobias CM, Rathjen JP, Chang JH, Lavelle DT, Michelmore RW y Staskawicz BJ (1996) Molecular basis of gene-for-gene specificity in bacterial speck disease of tomato. *Science*, 274: 2063-2065.
- Scotti N, Alagna F, Ferraiolo E, Formisano G, Sannino L, Buonaguro L, Stradis AD, Vitale A, Monti L, Grillo S, Buonaguro FM y Cardi T (2009) High-level expression of the HIV-1 Pr55^{gag} polyprotein in transgenic tobacco chloroplasts. *Planta*, 229: 1109-1122.
- Schledzewski K y Mendel RR (1994) Quantitative transient gene expression: comparison of the promoters for maize polyubiquitin1, rice actin1, maize-derived Emu and CaMV 35S in cells of barley, maize and tobacco. *Transgenic Research*, 3: 249-255.
- Schneiter AA y Miller JF (1981) Description of sunflower growth stages. *Crop Science*, 21: 901-903.
- Schöb H, Kunz C y Meins F, Jr. (1997) Silencing of transgenes introduced into leaves by agroinfiltration: a simple, rapid method for investigating sequence requirements for gene silencing. *Molecular and General Genetics*, 256(5): 581-585.
- Schrammeijer B, Sijmons PC, Van den Elzen PJM y Hoekama A (1990) Meristem transformation of sunflower via *Agrobacterium*. *Plant Cell Reports*, 9: 55-60.
- Seiler GJ (1997). Anatomy and morphology of sunflower. En *Sunflower technology and production*. (Schneiter AA). Madison, Wis. USA, American Society of Agronomy: 67-111.

- Shin S, Mackintosh CA, Lewis J, Heinen SJ, Radmer L, Dill-Macky R, Baldrige GD, Zeyen RJ y Muehlbauer GJ (2008) Transgenic wheat expressing a barley class II chitinase gene has enhanced resistance against *Fusarium graminearum*. *Journal of Experimental Botany*, 59(9): 2371-2378.
- Sridevi G, Parameswari C, Sabapathi N, Raghupathy V y Veluthambi K (2008) Combined expression of chitinase and β -1,3-glucanase genes in indica rice (*Oryza sativa* L.) enhances resistance against *Rhizoctonia solani*. *Plant Science*, 175(3): 283-290.
- Sujatha M y Prabakaran AJ (2001) High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 65(1): 23-29.
- Sunilkumar G, Mohr L, Lopata-Finch E, Emani C y Rathore KS (2002) Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Molecular Biology*, 50(3): 463-474.
- van der Hoeven C, Dietz A y Landsmann J (1994) Variability of organ-specific gene expression in transgenic tobacco plants. *Transgenic Research*, 3: 159-165.
- Van der Hoorn RAL, Laurent F, Roth R y De Wit PJGM (2000) Agroinfiltration is a versatile tool that facilitates comparative analyses of Avr9/Cf-9-induced and Avr4/Cf-4-induced necrosis. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 13(4): 439-446.
- Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, Willmitzer L y Rocha-Sosa M (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. *Molecular and General Genetics*, 220: 245-250.
- Vaquero C, Sack M, Chandler J, Drossard J, Schuster F, Monecke M, Schillberg S y Fischer R (1999) Transient expression of a tumorspecific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96: 11128-11133.
- Vasil IK (2008) A history of plant biotechnology: from the Cell Theory of Schleiden and Schwann to biotech crops. *Plant Cell Reports*, 27: 1423-1440.
- Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel J-B, Mourrain P, Palauqui J-C y Vernhettes S (1998) Transgene-induced gene silencing in plants. *The Plant Journal*, 16(6): 651-659.
- Vaucheret H y Fagard M (2001) Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends in Genetics*, 17(1): 29-35.
- Vazquez Rovere C, del Vas M y Hopp HE (2002) RNA-mediated virus resistance. *Current Opinion in Biotechnology*, 13: 167-172.
- Vellicce GR, Díaz Ricci JC, Hernández L y Castagnaro AP (2006) Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. *Transgenic Research*, 15: 57-68.
- Vigliola MI (1986) *Manual de Horticultura*. Buenos Aires, Argentina.
- Visser PB, Maagd RA y Jongsma MA (2007). *Chrysanthemum*. En *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. (Pua E-C y Davey MR), Springer Berlin Heidelberg. 61: 253-272.
- Wally O, Jayaraj J y Punja ZK (2008) Comparative expression of β -glucuronidase with five different promoters in transgenic carrot (*Daucus carota* L.) root and leaf tissues. *Plant Cell Reports*, 27: 279-287.

-
- Wang J y Oard JH (2003) Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems. *Plant Cell Reports*, 22(2): 129-134.
 - Washida H, Wu C-Y, Suzuki A, Yamanouchi U, Akihama T, Harada K y Takaiwa F (1999) Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene GluB-1. *Plant Molecular Biology*, 40(1): 1-12.
 - Weber S, Friedt W, Landes N, Molinier J, Himber C, Rousselin P, Hahne G y Horn R (2003) Improved Agrobacterium-mediated transformation of sunflower (*Helianthus annuus* L.): assessment of macerating enzymes and sonication. *Plant Cell Reports*, 21(5): 475-482.
 - Weier D, Mittasch J, Strack D y Milkowski C (2008) The genes BnSCT1 and BnSCT2 from Brassica napus encoding the final enzyme of sinapine biosynthesis: molecular characterization and suppression. *Planta*, 227: 375-385.
 - Wen-Jun S y Forde BG (1989) Efficient transformation of Agrobacterium spp. by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Research*, 17(20): 8385.
 - Wilcox McCann A, Cooley G y Van Dreser J (1988) A system for routine plantlet regeneration of sunflower (*Helianthus annuus* L.) from immature embryo-derived callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14(2): 103-110.
 - Witzens B, Scowcroft WR, Downes RW y Larkin PJ (1988) Tissue culture and plant regeneration from sunflower (*Helianthus annuus*) and interspecific hybrids (*H. tuberosus* x *H. annuus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 13(1): 61-76.
 - Wroblewski T, Tomczak A y Michelmore R (2005) Optimization of Agrobacterium-mediated transient assays of gene expression in lettuce, tomato and Arabidopsis. *Plant Biotechnology Journal*, 3: 259 -273.
 - Yanofsky M, Lowe B, Montoya A, Rubin R, Krul W, Gordon M y Nester E (1985a) Molecular and genetic analysis of factors controlling host range in Agrobacterium tumefaciens. *Molecular and General Genetics*, 201(2): 237-246.
 - Yanofsky M, Montoya A, Knauf V, Lowe B, Gordon M y Nester E (1985b) Limited-host-range plasmid of Agrobacterium tumefaciens: molecular and genetic analyses of transferred DNA. *Journal of Bacteriology*, 163: 341-348.
 - Yoo SY, Bomblies K, Yoo SK, Yang JW, Choi MS, Lee JS, Weigel D y Ahn JH (2005) The 35S promoter used in a selectable marker gene of a plant transformation vector affects the expression of the transgene. *Planta*, 221(4): 523-530.
 - Zavallo D (2006) Optimización de la transformación genética de girasol (*Helianthus annuus* L.) modificando las distintas etapas de la agroinfección. Tesis de Licenciatura, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA.
 - Zavallo D, López Bilbao M, Hopp HE y Heinz R (2010) Isolation and functional characterization of two novel seed-specific promoters from sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Plant Cell Reports*, 29(3): 239-248.
 - Zheng S-J, Henken B, Ahn YK, Krens FA y Kik C (2004) The development of a reproducible Agrobacterium tumefaciens transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and the production of transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner). *Molecular Breeding*, 14: 293-307.
 - Zheng S-J, Henken B, Maagd RAd, Purwito A, Krens FA y Kik C (2005) Two different Bacillus thuringiensis toxin genes confer resistance to beet armyworm

-
- (*Spodoptera exigua* Hübner) in transgenic Bt-shallots (*Allium cepa* L.). *Transgenic Research*, 14: 261-272.
- Zheng X, Deng W, Luo K, Duan H, Chen Y, McAvoy R, Song S, Pei Y y Li Y (2007) The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters. *Plant Cell Reports*, 26: 1195-1203.
 - Zhu Q, Maher EA, Masoud S, Dixon RA y Lamb CJ (1994) Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco. *Nature Biotechnology*, 12: 807-812.

Trabajos derivados de esta tesis

Publicación en revista internacional con referato

- Radonic LM, Zimmermann JM, Zavallo D, López N y López Bilbao, M (2008) Introduction of antifungal genes in sunflower via *Agrobacterium*. *Electronic Journal of Biotechnology*, 11 (5).
<http://www.ejbiotechnology.cl/content/vol11/issue5/full/2/index.html>

Presentaciones en Congresos Nacionales e Internacionales

- “Transformación genética de girasol con genes antifúngicos” **Radonic LM***, Zimmermann JM*, Zavallo D, López N y López-Bilbao M. ASAGIR 2007 4º Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Argentina, 29 y 30 de Mayo de 2007.
- “Obtención de plantas transgénicas de girasol”. **Radonic LM**, Zimmerman JM, Zavallo D, López N y López-Bilbao M. ASAGIR 2007 4º Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Argentina, 29 y 30 de Mayo de 2007.
- “Utilización de dos estrategias diferentes para la introducción de genes antifúngicos en girasol vía *Agrobacterium*”. **Radonic LM**, Zimmerman JM, Zavallo D, López N y López-Bilbao M. REDBIO 2007 VI Encuentro Latinoamericano y del Caribe de Biotecnología Agropecuaria, Viña del Mar y Valparaíso, Chile, 22 al 26 de Octubre de 2007.
- “Agroinfiltración en plantas de girasol”. **Radonic LM**, Lopez N, Lopez Bilbao M. VII Simposio Nacional de Biotecnología – REDBIO Argentina 2009, Rosario, Santa Fe, Argentina. 20 al 24 de Abril de 2009.
- “Comparación de promotores para la transformación genética de girasol”. **Radonic LM**, Lopez N, Lopez Bilbao M. VII Simposio Nacional de Biotecnología – REDBIO Argentina 2009, Rosario, Santa Fe, Argentina. 20 al 24 de Abril de 2009.
- “The CaMV35S promoter is not a constitutive promoter in transgenic sunflower plants”. **Radonic, LM**; Zimmermann, JM; Zavallo, D; Lopez, N; y Lopez-Bilbao, M. Meeting in Induced Resistance in Plants against Insects and Diseases, Granada, España. 12-16 Mayo 2009. Seleccionado para presentación oral.
- “Eficiencia relativa de promotores de expresión génica utilizados en transgénesis de girasol”. **Radonic LM**, López NE, Hopp HE, López Bilbao, M. Taller ASAGIR 2010, Mar del plata, Buenos Aires, Argentina. 30 y 31 de marzo de 2010.
- “Mejoramiento de la eficiencia de transformación de girasol a través del rediseño de las construcciones genéticas”. **Radonic LM**, López NE, Hopp HE, López Bilbao, M. Taller ASAGIR 2010, Mar del plata, Buenos Aires, Argentina. 30 y 31 de marzo de 2010.
- “Estudio de promotores utilizados en transgénesis de girasol”. **Laura M. Radonic**, Nilda E. López, H. Esteban Hopp, Marisa López Bilbao. 5º Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Argentina. 1 y 2 de junio de 2010.
- “Mejora de la eficiencia de transformación de girasol a través del reemplazo del promotor CaMV35S por el promotor *rbcS1*”. **Laura M. Radonic**, Nilda E. López, H. Esteban Hopp, Marisa López Bilbao. 5º Congreso Argentino de Girasol, Buenos Aires, Argentina. 1 y 2 de junio de 2010.