

Avances en transgénesis de cultivos ornamentales. El uso de la tecnología de *Agrobacterium rhizogenes* como herramienta en el mejoramiento.

Gennarelli, María Cristina^{1,2}; Álvarez, María Alejandra³; Escandón, Alejandro Salvio¹.

¹Instituto de Floricultura. INTA-Castelar, de los reseros y Nicolás Reppetto s/n. Pcia. de Buenos Aires, Argentina, email: aescandon@cni.inta.gov.ar; ²Estudiante de la Maestría en Biotecnología (UBA);

³Fundación Pablo Cassará. Saladillo 2454. Buenos Aires, Argentina.

En el mejoramiento de los cultivos ornamentales la Ingeniería Genética y la transformación genética de plantas son herramientas de gran utilidad para incrementar, artificialmente, la variabilidad genética. Una de sus más importantes ventajas es que permiten la incorporación de un gen determinado sobre un fondo genético selecto, evitando la dilución de las características genotípicas del organismo. Asimismo, estas estrategias permiten incorporar los genes deseados independientemente del origen de los mismos (Cubero, 2003).

A las demandas clásicas de genes de resistencia a herbicidas, a estreses, a insectos y plagas, etc., que hacen los diferentes cultivos a la Biotecnología, los cultivos ornamentales le suman genes que modifican otras características de la planta, como su arquitectura, colores, vida en florero, capacidad de generar perfumes, manejo de los tiempos de floración, etc (Tanaka et al., 2005).

En la naturaleza se dispone de una muy importante variedad de genes que tienen, o pueden tener, una gran relevancia en el mejoramiento de ornamentales. A manera de ejemplo, genes que modifiquen la arquitectura de las plantas es posible hallarlos tanto en *Agrobacterium tumefaciens*, los genes *iaaM*, *iaaH* e *ipt*, así como los genes *rol* y *aux 1* y *aux 2* de *A. rhizogenes* (Casanova et al., 2005). Otro gen de gran utilidad en la modificación de la arquitectura de las plantas es el inhibidor de la síntesis de giberelinas, *gai* de *A. thaliana*. Alguno de ellos fueron probadas en plantas modelos como tabaco y otros en cultivos como el crisantemo, el clavel, rosa, entre otros (Wang & Li, 2006).

Agrobacterium rhizogenes es una bacteria del suelo causante de la enfermedad denominada raíces en cabellera. Algunos de los síntomas de esta enfermedad, entre otros, enanismo, mayor compacidad, menor dominancia apical, variabilidad en hojas y flores Tepfer (1984), son interesantes en el contexto de un programa de mejoramiento de plantas ornamentales. Otra ventaja de esta estrategia es que, siendo una transformación natural, su liberación está fuera, al menos en la Argentina, de los procesos regulatorios (Burachick, com. per.)

En el Instituto de Floricultura, en el marco de un programa de mejoramiento en el género *Calibrachoa*, La LLave y Lexarza (Solanaceae), y con el objeto de obtener variedades más compactas del género, se propuso la puesta a punto de la técnica de transformación genética, vía *A. rhizogenes*, de *Calibrachoa excellens*, que es una semi arbustiva, nativa de la Argentina, cuyas flores de intenso color fucsia le confieren un interesante potencial ornamental. Segmentos nodales de la especie de interés fueron desinfectados con el método estándar de etanol/hipoclorito sódico y cultivados en un medio MS libre de hormonas. Estas *in vitro plantas* se utilizaron como fuente de explantos (hojas y segmentos nodales) para estudiar la respuesta de *C. excellens* frente a la infección de diferentes cepas de *A. rhizogenes*. Se obtuvieron raíces en cabellera a partir de hojas infectadas con la cepa LBA 15834. Las raíces se subcultivaron a un medio Murashige-Skoog 0,5X agarizado, libre de hormonas y suplementado con Cefotaxime®, cuya concentración inicial de 500 µg/ml se disminuyó gradualmente hasta su total eliminación cuando no se verificó crecimiento bacteriano. Posteriormente fueron transferidas a igual medio pero líquido, donde crecieron vigorosamente. La presencia del transgén en las raíces fue confirmada por PCR. De estas raíces regeneraron yemas en forma espontánea. Una vez desarrolladas, las plántulas fueron transferidas a un medio MS sólido y mantenidas bajo condiciones *in vitro* durante 2 subcultivos (cada 30 días). Alcanzados los 3-4 cm. de largo,

las plántulas fueron transferidas a macetas de 8 cm de diámetro conteniendo sustrato artificial y mantenidas bajo condiciones de cámara húmeda para su aclimatación. Finalmente, las plantas aclimatadas se cultivaron bajo condiciones de invernáculo estándar.

Se obtuvieron dos eventos de transformación independientes, las plantas regeneradas mostraron los típicos síntomas de la enfermedad de raíces en cabellera: entrenudos cortos, hojas arrugadas, hojas y flores de menor tamaño y un vigoroso crecimiento de raíces y la presencia de los genes *rol A*, *rol B* y *rol C* fue verificada por PCR. Así como también se descartó la presencia de *Agrobacterium* remanente en las plantas regeneradas a través de la PCR para el gen *vir D*.

Ambos eventos no sólo mostraron diferencias anatómicas entre ellos, sino que también se observaron diferencias fenológicas, ya que si bien ambos florecieron en primavera/verano, bajo situación de día largo (artificial) uno de ellos ha florecido, independientemente de la temperatura, y el otro no. El polen de ambos eventos mostró ser viable y el obtenido a partir de uno de ellos fue utilizado para efectuar un cruzamiento con otra especie de *Calibrachoa*. Esta sería una experiencia pionera en la región de la aplicación de esta tecnología con fines de mejora en plantas ornamentales nativas.

BIBLIOGRAFÍA

CASANOVA, E.; TRILLASA, M.I.; MOYSSETA, L.L.; VAINSTEIN, A. Influence of *rol* genes in floriculture. **Biotechnology Advances**, n. 23, p. 3–39, 2005.

CUBERO, J.I. Los poliploides en la mejora vegetal. En: **Introducción a la mejora genética vegetal**. Cap. 15. Ediciones Mundi-prensa. Madrid. España, 2003. p. 325-351.

TEPFER, D. Transformation of several species of higher plants by *Agrobacterium rhizogenes*: Sexual transmission of the transformed genotype and phenotype. **Cell**. n.37, p. 959– 67, 1984.

WANG, Y; LI, J. Genes controlling plant architecture. **Current opinion on Biotech**, n. 17, p. 123-129, 2006.

TANAKA, Y.; KATSUMOTO, Y.; BRUGLIERA, F.; MASON, J. Genetic engineering in floriculture. **Plant Cell, Tissue and Organ Culture**, n. 80, p. 1–24, 2005.

PALAVRAS CHAVES:

Agrobacterium rhizogenes, transgénesis, melhoramento.