

***IV SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA VEGETAL
REDBIO ARGENTINA '99***

11 Y 12 DE NOVIEMBRE DE 1999.

Biblioteca Nacional – Auditorio Jorge Luis Borges
Ciudad Autónoma de Buenos Aires

El Comité Organizador del IV Simposio Nacional de Biotecnología Vegetal, REDBIO Argentina '99, agradece profundamente la desinteresada colaboración de:

Secretaría de Ciencia y Técnica de la Nación.

Asociación Semilleros Argentinos, Asociación Civil.

FAO/REDBIO

CANBIOTECH, Canadá

NIDERA S.A.

Universidad Nacional de Quilmes (UNQ)

Biosidus

Foro Argentino de Biotecnología (FAB)

Sin su patrocinio esta reunión no hubiera podido concretarse.

COLABORADORES

El Comité Organizador agradece la ayuda brindada por los Ings. Agrs.: Victor Beltrán y Carlos Vera Bravo de la EEA INTA Bella Vista (Corrientes) y de:

Cantore, Damián
Castroagudín, Vanina
Commessatti, Lorena
González, Alejandro
Piñeiro, Sandra
Ponde de León, Juan
Ramirez, Viviana
Rodríguez, Marcos
Sacco, Natalia
Soria, Verónica
Uz, Viviana

**Alumnos de la Diplomatura en Ciencia y Tecnología de la
UNIVERSIDAD NACIONAL DE QUILMES**



REDBIO
ARGENTINA

IV SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL REDBIO ARGENTINA – 99

11 y 12 de Noviembre

**Auditorio Jorge Luis Borges, Biblioteca Nacional,
Agüero 2502, Ciudad Autónoma de Buenos Aires**

Comité Organizador

Alicia Diamante (EEA Bella Vista-INTA, Corrientes)
Graciela Salerno (FIBA, Mar del Plata)
Sandra Sharry (CeProVe, UNLP, La Plata)
Ana María Giulietti (Cát. Biotecnología, FFyB, UBA)
Alejandro Escandón (IB, CNIA-INTA)
Horacio Esteban Hopp (IB, CNIA-INTA y FCEyN, UBA)
Alberto Acevedo (IRB, CIRN-INTA y Depto. Ciencia y Tecnología, UNQ)

Programa

Jueves 11

8,00 - 10,00	Acreditación Colocación de Pósters
10,30 - 11,30	Sesión Inaugural <i>"Actividades de los laboratorios de la RED Argentina"</i> . Ing. Agr. Alicia Diamante, Coordinadora Nacional de REDBIO Apertura de simposio Dr. Alberto Díaz (UNQ) Conferencia <i>"Rol crítico de la biotecnología en el mejoramiento de cultivos alimenticios. Perspectivas para el próximo milenio. La visión de la FAO"</i> Dr. Juan Izquierdo (FAO-RLCA)
11,30 - 11,45	Café
11,45 - 13,00	Visita a Pósters
13,00 - 14,00	Almuerzo

SESION I - CULTIVO DE TEJIDOS Y METABOLITOS SECUNDARIOS

14,00 – 14,30	Conferencia: <i>"Micropropagación comercial: factores que la afectan"</i> . Ing. Agr. Daniel Moriconi (BIOSIDUS)
---------------	--



- 14,30 - 15,00 Estado actual del tema a nivel Nacional
Análisis de los trabajos presentados (pósters)
Ing. Agr. Hebe Rey
Dra. Ana María Giulietti
Coordinador: Ing. Agr. Luis Mroginski
- 15,00 - 15,30 Discusión general
- 15.30 - 15,45 Café

SESION II - HERRAMIENTAS Y PERSPECTIVAS DE LA BIOLOGIA MOLECULAR EN EL MEJORAMIENTO VEGETAL

PLANTAS TRANSGENICAS

- 15,45 – 16.30 Conferencia:
"Sustentabilidad, Desarrollo y Plantas Transgénicas"
Dr. Elibio Rech (CENARGEN-EMBRAPA, Brasil)
- 16,30 – 17,00 *"Manejo de insectos en cultivos transgénicos"*
Ing. Agr. Juan Kiekebuch (ASA)
- 17,00 - 17,30 Estado actual del tema a nivel Nacional
Análisis de los trabajos presentados (pósters)
Ing. Agr. Martín Reggiardo
Coordinador: Dr. Alejandro Escandón
- 17,30 - 18,00 Discusión general
- 18,00 - 19,30 Reunión Nacional de REDBIO
- 21,00 Cena de Camaradería.

Viernes 12 (Continuación Sesión II)

MARCADORES MOLECULARES

- 9,00 - 9,45 Conferencia
"Aplicación de Marcadores Moleculares AFLP. Avances en la Viticultura Molecular"
Dra. María Teresa Cervera (INIA Madrid, España)
- 9,45 - 10,30 Estado actual del tema a nivel Nacional
Análisis de los trabajos presentados (pósters)
Dr. Ricardo Mazuelli
Dr. Dario Bernacchi
Coordinadora: Dra. Graciela Salerno
- 10,30 - 11,00 Discusión general
- 11,00 - 11,15 Café



PERSPECTIVAS EN EL MEJORAMIENTO DEL RINDE Y LA SANIDAD

- 11,15 - 11,45 Conferencias:
"Señales moleculares en la asociación simbiótica entre
Rhizobium y leguminosas"
Dr. Mario Aguilar
- 11,45 - 12,15 "Pasado y presente de las investigaciones relacionadas con roya de
la hoja del trigo en el Instituto de Genética del INTA Castelar"
Ing. Francisco Sacco
Coordinador: Dr. Alberto Acevedo
- 12,15 - 12,30 Discusión general
- 12,30 - 14,00 Almuerzo

SESION III - BIOSEGURIDAD Y PERCEPCION PUBLICA

- 14,00 - 14,30 Conferencia:
"Bioseguridad de Cultivos Transgénicos"
Dra. M. Kenny Directora Asociada, Canadian Food Inspection
Agency (CFIA-Ottawa)
- 14,30 - 14,45 Preguntas y discusión
- 14,45 - 15,15 Conferencia:
"Percepción Pública sobre la Biotecnología moderna"
Mr. Rick Walter Presidente, BCG Life Sciences Inc. (Ottawa)
- 15,15 - 15,30 Preguntas y discusión
Coordinador: Dr. Burachik
- 15,30 - 15,45 Café

SESION IV - OPORTUNIDADES DE COOPERACION Y FINANCIAMIENTO

- 15,45 - 16,05 Dr. Mario Parisi FONCyT
- 16,05 - 16,25 Ing. Carlos León - FONTAR
"Oportunidades económicas para el desarrollo de la biotecnología
en la región"
- 16,25 - 16,45 Ing. Agr. MSc. Daniel Pagliano (INIA Uruguay)
Coordinador: Dr. Juan Dellacha
- 16,45- 17,10 Preguntas y discusión
- 17,15- 17,30 Cierre.

La inscripción se abonará en el hall del auditorio el costo es de:
Particulares: \$200. Investigadores: \$50,00. Estudiantes: \$10,00.

REDBIO 99
ARGENTINA

La humanidad enfrenta en la actualidad una extensa variedad de amenazas como ser: el deterioro ambiental, el crecimiento de la población mundial, la necesidad de producir mas alimentos y la superficie cultivable que ya prácticamente alcanzó su techo.

La biotecnología, con los primeros aportes de mayor productividad agrícola a menor costo y menos contaminación ambiental, plantea dudas a los ecologistas y se ponen serias objeciones a esta fértil herramienta del conocimiento. El problema principal surge tal vez por el desconocimiento que existe sobre las bondades o consecuencias de su aplicación.

Sin descartar objeciones y preocupaciones serias, se debe continuar y avanzar en el conocimiento sabiendo que la naturaleza siempre estuvo generando plantas transgénicas, que los genetistas siempre transfirieron no solo un gen sino “paquetes de genes” al obtener variedades más productivas y resistentes a enfermedades y plagas. Sería un grave error ignorar su aplicación y no evaluar sus consecuencias mediante un riguroso análisis de costos y beneficios.

El objetivo general de la **Red de Cooperación Técnica de Biotecnología Vegetal – REDBIO** es el de desarrollar mecanismos de concertación y promoción del conocimiento para la aplicación de la Biotecnología Vegetal a la solución de problemas productivos que afectan a la agricultura de América Latina y el Caribe.

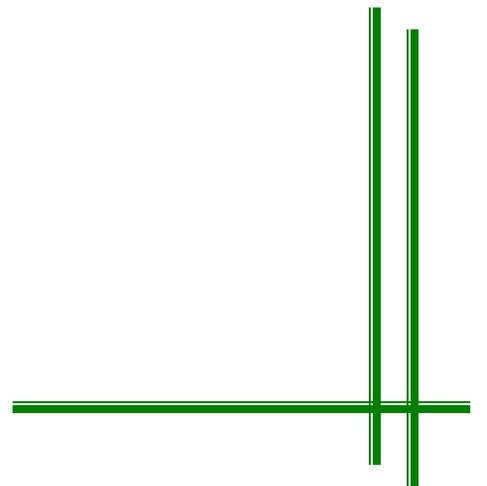
REDBIO Argentina, hoy concreta uno de sus más caros anhelos, que es el de fortalecer la RED de laboratorios de BIOTECNOLOGIA VEGETAL y dar continuidad a aquellas primeras y exitosas reuniones iniciadas en el año 1991, lo que se cristaliza en este **IV SIMPOSIO NACIONAL DE BIOTECNOLOGIA VEGETAL REDBIO-99**.

Finalmente esta Coordinación desea manifestar su agradecimiento al grupo de colaboradores que hicieron posible la realización de este evento.

Alicia Diamante
Coordinadora Argentina de REDBIO

Sección I

Cultivo de Tejidos



ACTIVIDADES EN EL LABORATORIO DE CULTIVOS IN-VITRO EN LA EEA INTA BALCARCE

Susana Rigato y Marcelo Huarte

Laboratorio de Cultivos In-Vitro:

Se realiza el saneamiento, la introducción y el mantenimiento in-vitro de cultivares de papa. En la eliminación de virosis se aplican técnicas de termoterapia, quimioterapia y cultivos de meristemas. Se mantienen in-vitro colecciones de materiales sanos de interés para mejoramiento e investigación y de variedades comerciales.

Se trabaja en micropropagación a gran escala para producción de semilla pre-básica de papa de alta sanidad. Se inició el desarrollo de un nuevo sistema de producción de plántulas donde se combinan técnicas de micropropagación e hidroponía.

**ESTIMULACION DE LA REGENERACION DE PLANTAS POR PRODUCTOS
EXTRACELULARES CIANOBACTERIANOS – Proyecto UBACYT TX79.**

María Cristina Zaccaro, Gloria Zulpa, Mónica Storni, **Marta Divo de Sesar y ***Ana María Stella.

Laboratorio de Fisiología Vegetal y Biología de Cianobacterias, FCEyN. **Cátedra de Producción Vegetal, Facultad de Agronomía, UBA. ***Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) – CONICET y FCEyN, UBA. E-mail: cyanob@bg.fcen.uba.ar.

La regeneración eficiente de plantas a partir de callos de arroz ha sido ampliamente registrada. Extractos de diferentes cianobacterias promueven la embriogénesis somática en cultivos de tejidos de zanahoria y sándalo. La influencia de exometabolitos cianobacterianos en la capacidad morfogénica de callos de arroz está poco estudiada.

Se estudian los efectos de productos extracelulares (PE) de *Microchaete tenera* n° 14 b (Cyanobacteria), aislada de arrozales de Argentina, sobre la regeneración de plantas de *Oryza sativa* var. Yeruá, de uso comercial, a partir de callos embriogénicos.

Callos de 30 días, obtenidos a partir de embriones maduros en medio MS adicionado con 3 mg/L de 2-4 D, se cultivan en MS suplementado con: 1) 0.05 mg/L de ANA y 0.25 mg/L de BAP, 2) 5 ml de PE de un cultivo de 14b en fase estacionaria y 3) 5 ml de PE de 14b, 0.05 mg/L de ANA y 0.25 mg/L de BAP, con una intensidad luminosa de 45 $\mu\text{E}/\text{m}^2/\text{s}$, fotoperíodo 16:8 y $26 \pm 1^\circ \text{C}$. Se toman fotografías a la lupa de las plantas regeneradas y se realizan cortes histológicos a fin de corroborar la naturaleza bipolar correspondiente a los embriones somáticos.

A los 20 días se observó la inducción de embriones somáticos en los callos tratados con los PE según el tratamiento 2; y desarrollo de raíces en los otros tratamientos: 1 y 3, siendo mayor el número de raíces en el tratamiento combinado (3).

Los exometabolitos cianobacterianos podrían reemplazar el uso de reguladores del crecimiento sintéticos para la obtención de embriones somáticos a partir de callos de arroz.

ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES DE AJO (*Allium sativum*)

Silvia Cabral, Pablo Zaltz, Alejandro Mentaberry. (INGEBI-CONICET).

El presente trabajo se realiza en el marco del proyecto de transformación genética del ajo en el que nuestro laboratorio está involucrado. El objetivo es disponer de una técnica eficiente y reproducible para la introducción de genes en el ajo para poder de esa forma avanzar rápidamente en su mejoramiento genético.

La electroporación de protoplastos aparece como una alternativa posible para lograr esto.

Trabajando con discos de diente de ajo colorado, se generaron callos en medio de Murashige-Skoog suplementado con 2 mg/l de Cinetina; 1,5 mg/l de 2,4 D y 2 mg/l de AIA. Los discos de diente fueron incubados a 25 C en oscuridad durante alrededor de 4 meses, con repiques a medio fresco cada aproximadamente 45 días. Los callos obtenidos fueron utilizados para iniciar suspensiones celulares colocando alrededor de 1gr de tejido en Erlenmeyers de 125 ml conteniendo medio MS líquido suplementado con 3 concentraciones diferentes de 2,4 D: 0.2 mg/l; 0.5 mg/l y 1mg/l, así como MS líquido + Cinetina 2 mg/l+ 2,4D 1,5 mg/l + AIA 2 mg/l. En todos los casos los Erlenmeyers fueron incubados a 25C, en oscuridad y a 110 RPM en un shaker rotatorio. La evolución de los cultivos fue seguida por observación en microscopio de fluorescencia de muestras teñidas con FDA. Solamente en el caso de los callos incubados con 2,4D a una concentración de 1mg/l fue posible obtener a partir de los 15 días de incubación una cantidad suficiente de células viables como para intentar la obtención de protoplastos a partir de las mismas. Resultados preliminares nos indican que es posible obtener protoplastos de ajo viables incubando durante 4 hs las células en presencia de 0.01 gr de pectoliasa y 0.1 gr de celulasa . Si bien los resultados no son todavía totalmente reproducibles ya estamos intentando poner a punto las condiciones de electroporación utilizando el colorante calceína.

COMPORTAMIENTO “in vitro” DE UNA LINEA DE MAIZ (*Zea mays*) PORTADORA DE UN SISTEMA DE LETALES BALANCEADOS.

Ciancio J.R., Robredo C.G., Rios R.D., Gomez M.C., Salerno J.C., Franzone P.M., Díaz D.G.

Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (IGEAF)-CICV y A-CNIA-INTA
C.C.25 (1712) Castelar.

El genotipo de maíz BLS1, desarrollado en el IGEAF, se caracteriza por presentar un sistema de letales balanceados formado por un gen para pigmentación, que en condición homocigota recesiva produce plantas de fenotipo amarillo que mueren al estado de 34 hojas y 1 gen letal gamético que actúa sobre el polen. Estos genes están estrechamente ligados en repulsión y por autofecundación dicha línea produce, generación tras generación, progenie formada por 50% de plantas de fenotipo amarillo y 50% de plantas de fenotipo verde (normales) heterocigotas para ambos genes. Experimentos posteriores mostraron que las plantas heterocigotas para los genes letales tenían mayor rendimiento que las homocigotas verdes normales derivadas del sistema BLS por recombinación.

En el presente trabajo se determinó el crecimiento “in vitro” de suspensiones celulares, formadas a partir de callos individuales derivados de embriones inmaduros, de la línea BLS1 que regeneraban plantas verdes o amarillas. Para establecer el origen de los materiales y de este modo descartar una posible contaminación con polen extraño, se analizó una muestra aleatoria del material por la técnica de AFLP. El crecimiento *in vitro* se analizó a través de la técnica de “Pack Cell Volume”. Se observó que las suspensiones celulares derivadas de callos que regeneraban plantas amarillas, tuvieron un crecimiento estadísticamente superior al de las suspensiones derivadas de callos que regeneraban plantas verdes. Este hecho indica que en el “segmento cromosómico amarillo” existe al menos un gen que, al estado homocigota, otorga ventaja de crecimiento *in vitro* a nivel celular.

**APLICACIÓN DE RECURSOS BIOTECNOLÓGICOS AL MEJORAMIENTO DE LA CEBOLLA
(*Allium cepa* L.)**

II. Estudio de algunas respuestas de defensa en la interacción cebolla-*Phoma terrestris* y obtención de variantes con mayor tolerancia

Director: Curvetto, Néstor ⁽¹⁾

Integrantes: Zappacosta, Diego ⁽¹⁾; Marinangeli, Pablo ⁽¹⁾; Kiehr, Mirta ⁽²⁾; Delhey, Rolf ⁽²⁾

⁽¹⁾ Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina

⁽²⁾ Laboratorio de Patología Vegetal, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur, 8000 Bahía Blanca, Argentina

e-mail: ficurvet@criba.edu.ar

La cebolla (*Allium cepa* L.) es uno de los cultivos hortícolas más importantes en Argentina (30.000 ha), especialmente en el sur de la Pcia. de Buenos Aires (15000 ha) que incluye a la zona bajo riego del Valle Inferior del Río Colorado. El aumento de la producción se ha encontrado con algunas limitaciones, especialmente en lo relacionado con aspectos fitosanitarios debido a enfermedades causadas por hongos del suelo (fusariosis, raíz rosada y carbonilla). La raíz rosada, causada por el hongo *Phoma terrestris* Hansen, es una de las enfermedades de mayor incidencia en el cultivo de la cebolla y es endémica de las zonas productoras de nuestro país.

El presente proyecto pretende seleccionar *in vitro* cebollas de mayor tolerancia a *P. terrestris*, con la ayuda de marcadores bioquímicos (actividad peroxidasa y PAL, e isoformas quitinasas, 1,3-B-glucanasas y peroxidases), en presencia de una presión de selección (patógeno o sus metabolitos), sustituyendo así el sistema tradicional de selección a campo donde se utilizan plántulas e infección *in vivo*.

Con el objetivo de estudiar las eventuales respuestas de defensa en la interacción cebolla-*P. terrestris* se han ensayado distintos sistemas, tanto *in vivo* (infección de raíces originadas de bulbos), como *in vitro*. Los sistemas *in vitro* evaluados incluyen cultivos duales (hongo-callos) y el uso de filtrados sobre callos y plántulas. Hemos demostrado que el crecimiento así como algunos indicadores bioquímicos (actividad de peroxidases, presencia de pigmentos) sufren modificaciones, tanto en los sistemas *in vivo* como *in vitro*. Esto permitiría utilizar dichos sistemas como modelo para estudios de patogénesis y reacciones de defensa o, eventualmente, para la selección de genotipos resistentes.

PROPAGACIÓN CLONAL RÁPIDA (*scaling up*) DE VARIEDADES COMERCIALES DE PLANTAS BULBOSAS (*Lilium* sp. y *Allium sativum*) Y UTILIZACIÓN DE TÉCNICAS MOLECULARES PARA EL CONTROL DE LA IDENTIDAD GENÉTICA.

Director en Argentina: Curvetto, Néstor ⁽¹⁾

Co-Director en Argentina: Marinangeli, Pablo ⁽¹⁾

Director en Brasil: Sergeren, Monique ⁽²⁾

Integrantes: Luciani, Gabriela⁽¹⁾; Delmastro, Silvia⁽¹⁾; Mockel, Gabriela ⁽¹⁾

(1) Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur (LFV-DA-UNS), 8000 Bahía Blanca, Argentina.

(2) ⁽²⁾ ProClone, Rua dos Girassóis nº 70, Caixa Postal157; CEP: 13.825-000, Holambra, San Pablo, Brasil. Nuestro laboratorio trabaja desde hace varios años en sistemas de micropropagación de especies bulbosas de interés económico (lilium, ajo, cebolla, narciso), estableciendo y ajustando condiciones culturales como: medios de cultivo, temperatura, luminosidad y tiempo. En *Lilium*, se estudiaron las técnicas existentes de micropropagación por bulbificación directa y se ajustaron para optimizar la eficiencia de multiplicación considerando también la etapa de rustificación. En una etapa posterior se estudiaron los factores que afectan la inducción de callos y la regeneración por embriogénesis somática y organogénesis indirecta. En ajo, se establecieron líneas saneadas de tres clones de ajo colorado de importancia regional usando protocolos de termoterapia y cultivo de meristemas, se ajustaron las condiciones de multiplicación in vitro y se establecieron protocolos de bulbificación in vitro. El 40% de la producción florícola de Brasil se encuentra en Holambra, San Pablo, donde se ubica el laboratorio comercial ProClone, con amplia experiencia en micropropagación de especies ornamentales. Ha participado en programas de formación de recursos humanos del Centro Nacional de Investigaciones de Brasil (RHAECNPq) y de desarrollo de tecnología para la elaboración de protocolos y medios de cultivo para micropropagación. El presente proyecto binacional propone desarrollar un sistema para micropropagación eficiente y rápida de lilium y ajo empleando sistemas automatizados y monitoreo de estabilidad genética con técnicas moleculares. Para su concreción, ProClone será responsable de la coordinación de los procesos de automatización que lleven al *scaling up*, involucrando e integrando empresas especializadas en fabricación de autoclaves, sistemas filtrantes y proveedoras de innovaciones que integren los procesos en una propuesta única e inédita. El LFV-DA-UNS desarrollará los protocolos y medios de cultivo para los diferentes modelos y realizará el monitoreo de la estabilidad genética con métodos isoenzimáticos, moleculares y citogenéticos.

BIOTECNICAS PARA EL MEJORAMIENTO GENETICO DE LOS CITRUS APLICADAS EN LA EEA-INTA Bella Vista (Corrientes)

Alicia Diamante¹; Héctor Zubrzycki² y Carlos Vera Bravo³.

^{1,2}Ings. Agrs. MSc. en Mejoramiento Genético,

³Ing. Agrónomo

INTA Bella Vista CC 5 CP 3432 Bella Vista (Ctes) Argentina E-mail: intaexp@bvista.com.ar

Si bien existe gran variabilidad genética dentro del género cítrus y géneros relacionados, el mejoramiento convencional a tenido poco éxito en el desarrollo de nuevas variedades para copa y portainjerto.

La mayoría de las variedades que actualmente se encuentran en difusión comercial se obtuvieron por mutaciones espontaneas, selección de las ya existentes y muy pocas por hibridaciones e inducción de mutaciones.

Los cítricos tienen la ventaja de poder reproducirse a través de injertos, por ello obtener una planta con características superiores es suficiente.

El uso de técnicas biotecnológicas permite sortear las barreras biológicas de los cítricos y acelerar la solución de los problemas limitantes en sanidad y productividad. La EEA de INTA Bella Vista, con éxito a aplicado, desarrollado y ajustado las siguientes técnicas:

Microinjerto de ápices caulinares in vitro: Para obtener plantas cítricas libres de virus y otros patógenos. Para obtener plantas a partir de vástagos no enraizados in vitro.

Cultivo de óvulos: se emplea para inducir embriones nucleares libres de virus, para obtener callos friables para suspensiones celulares, para el rescate de embriones en cruzamientos interespecíficos y también para la inducción de poliembrionía en algunas especies.

Cultivo de nucelas: se emplea para la formación de embriones nucleares en variedades monoembrionicas las que dan plantas libres de virus y constituyen una fuente excelente para obtener callos embriogénicos.

Cultivo de anteras: para obtener plantas haploides, las que se utilizan para estudios genéticos. A través de esta técnica se obtienen plantas totalmente homocigotas, donde se pueden eliminar todos los genes letales o indeseables.

Fusión de protoplastos: permite lograr híbridos somáticos interespecíficos o intergenéricos.

CULTIVO DE ANTERAS APLICADO AL MEJORAMIENTO DE TRIGO

DIRECTOR: Dra. Viviana Echenique

e-mail: *echeniq@criba.edu.ar*

CODIRECTOR: Ing. Rubén Miranda

PARTICIPANTES: Ing. G. Aldao Humble, Lic. Pablo Polci y Srta. Verónica Conti.
Dpto. Agronomía (UNS). San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca
Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA).

La producción de doble haploides representa un acortamiento del período total de producción y un incremento de la eficiencia del proceso de selección sobre materiales con todos sus loci en homocigosis. Fuera de lo informado por Ortiz y Mroginski (1991) no se han realizado estudios para caracterizar variedades nacionales de trigo en función de su capacidad androgénica, ni se ha intentado incorporar la técnica como herramienta complementaria en planes de mejoramiento, tal vez debido a la falta de información concreta del potencial de respuesta de los genotipos utilizados en los bloques de cruzamiento de las compañías mejoradoras de trigo.

El objetivo de este proyecto es poner a punto una técnica de cultivo de anteras para materiales del Criadero de Cereales ACA y estimar la capacidad androgénica de las líneas parentales intervinientes a fin de utilizar esta técnica en planes de mejoramiento.

Se utilizaron semillas de 17 filiales F3 segregantes del Criadero. Las F3 se seleccionaron en función de los antecedentes de respuesta al cultivo de anteras de los padres involucrados en las cruzas, siendo estos en su gran mayoría, líneas nacionales con antecesores introducidos respondedores muy remotos en la genealogía. La selección más concreta fue la de las líneas 2186 y 2152, con Buck Ombú como padre y madre respectivamente, respondedor informado por Ortiz y Mroginski (1991).

Las anteras se inocularon en diferentes medios de inducción y se cultivaron en oscuridad a 25°C hasta la aparición de estructuras embriogénicas (45 días). Para la regeneración se aplicó un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 26°C.

Se lograron estructuras (embrioides) comparables a las documentadas en la bibliografía, resultando significativamente superior el medio MN6mod líquido para este propósito. Los genotipos Buck Ombu y F3 2103-5 regeneraron un 100% de plantas verdes. En cuanto a los materiales del bloque de cruzamiento: CB-113 y Coop. Liquen produjeron 0,3% de plantas verdes. La alta inducción registrada en dos de las tres filiales 2186-x hermanas de 2186-3 confirmó la hipótesis de mayor probabilidad de éxito para materiales relacionados cuando uno de ellos presenta respuesta. Los resultados sugieren mayor eficiencia del proceso induciendo con el medio NM6mod, pretratando con frío, y chequeando previamente los materiales.

CULTIVO DE TEJIDOS PARA LA OBTENCION DE VARIANTES SOMACLONALES EN PASTO LLORON

DIRECTOR: Dra. Viviana Echenique

PARTICIPANTES: Pablo A. Polci, Susana Cardone y Luís Mroginski
Depto. de Agronomía, UNS. San Andrés 800. Bahía Blanca, Argentina.

La variación en plantas obtenidas por cultivo *in vitro* es a menudo grande. Esta podría ser generada por procesos mutagénicos durante la iniciación, mantenimiento de callos, y diferenciación celular hasta la regeneración de plantas. Esta variabilidad puede ser epigenética o heredable y podría utilizarse en especies apomícticas con fines de mejoramiento.

Con este proyecto se pretende ampliar la variabilidad dentro del complejo *Eragrostis curvula*, fundamentalmente para cultivares de reproducción apomíctica obligada, estudiar la variación obtenida a varios niveles: morfológico, citogenético, bioquímico y molecular y la trasmisibilidad a la progenie.

Se obtuvieron plantas a partir de callos de inflorescencias utilizando MS suplementado con 2,4-D y BA, de 3 cultivares apomícticos obligados (Tanganyika $2n=4x=40$, Morpa $2n=4x=40$ y Don Pablo $2n=7x=70$) y uno facultativo, Kromdraai $2n=6x=60$). Se tomó una planta como donadora de explanto para cada cultivar que fue utilizada como control. Los cultivares de pasto llorón con reproducción apomíctica obligada son muy uniformes. Se analizaron 155 plantas R_0 y 702 R_1 entre los 4 cultivares. Para ambas generaciones se realizaron estudios de caracteres morfométricos (largo y ancho foliar, pesos fresco y seco, número de panojas y peso total de semillas por planta) que se analizaron por ANOVA, componentes principales y árboles de clasificación, isoenzimas (índice de Shannon), cromosomas y RAPD's.

El test de componentes principales permitió detectar variabilidad en R_0 para los 4 cultivares investigados. En R_1 se compararon grupos de plantas, cada uno formado por 5 hijas de cada planta R_0 . Los tests no evidenciaron variabilidad en caracteres morfométricos en cvs. Morpa y Don Pablo. Para todas las variables las diferencias fueron altamente significativas en cvs. Tanganyika y Kromdraai. La presencia de fenotipos intermedios, la altísima mortalidad de plántulas y los estudios isoenzimáticos indicarían la ocurrencia de hibridación en el cv. Tanganyika.

No obstante la ausencia de variación significativa en caracteres morfométricos, algunas plantas de los cultivares Morpa y Don Pablo mostraron cambios en isoenzimas y RAPD's, y evidencia de mosaicismo cromosómico. Los índices de Shannon para peroxidasa en R_0 y R_1 de los cvs. apomícticos obligados fueron mayores a los correspondientes a sus poblaciones control ($H=0$), alcanzando valores semejantes a los normales para el cv. Kromdraai ($H=0.79$).

El método es válido para generar variabilidad llevando a cultivares apomícticos obligados a niveles de variación similares a la de aquellos que exhiben un cierto grado de sexualidad.

Se continúa trabajando a fin de detectar posibles cambios en caracteres agrónomicamente deseables.

**MÉTODOS BIOTECNOLÓGICOS APLICADOS AL MEJORAMIENTO DE SORGO FORRAJERO.
OBTENCIÓN DE SUSPENSIONES CELULARES EN *Sorghum arundinaceum* var sudanense Y
EN *S. saccharatum* var EL INCA.**

DIRECTOR: Dra. Viviana Echenique

e-mail: echeniq@criba.edu.ar

PARTICIPANTES: Ing. Maria del Carmen Torroba, Lic. Pablo Polci
Facultad de Agronomía. UNLPampaDpto. Agronomía (UNS). San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca.

Casi toda la llanura pampeana está sujeta a procesos erosivos, debido a la naturaleza de sus suelos livianos y de los fuertes vientos que predominan especialmente en la primavera. En ésta región, la alimentación del ganado está basada en pastizales naturales o cultivados tanto en los campos de cría como en los de engorde. Los alfalfares y cultivos forrajeros de “estación” incluyen cereales de pastoreo, sorgos forrajeros y graníferos y maíces forrajeros.

Por lo expuesto, sería deseable lograr cultivos forrajeros que provean calidad y cantidad de forraje, con el menor movimiento de suelo y con costos menores de implantación que los verdeos anuales.

El género *Sorghum* comprende diferentes especies económicamente importantes que crecen fundamentalmente en zonas semiáridas. Las especies silvestres del género poseen genes de importancia agronómica tales como resistencia a enfermedades, que sería interesante incorporar a las especies cultivadas.

La posibilidad de obtener algunos híbridos de sorgos forrajeros interespecíficos utilizando métodos de mejoramiento tradicional no ha sido exitosa en lograr conjuntamente perennidad y calidad forrajera. Este proyecto se propone obtener un sistema de cultivo de tejidos de *Sorghum almun* Parodi (de corta perennidad) y *S. saccharatum* (L.) var El Inca, utilizando el medio básico de cultivo MS con distintas combinaciones de 2,4 D y BAP. A partir de los callos obtenidos se procederá a establecer suspensiones celulares, paso previo a la obtención de protoplastos con capacidad morfogénica que podrían utilizarse para la obtención de híbridos somáticos o cíbridos y/o para estudios de transformación genética.

De los cuatro explantos utilizados en ambas variedades los mejores resultados se obtuvieron con semilla y en segundo término, ápice; utilizando como medio de cultivo MS con el agregado de distintas combinaciones de 2,4-D y BAP (de 2 a 7 mg.l⁻¹ y 0,01 a 1 mg.l⁻¹, respectivamente).

En la etapa de proliferación, la concentración hormonal se unificó en los distintos tratamientos en 1mg.l⁻¹ de 2,4D y 0,01 mg.l⁻¹ de BAP, respondiendo en todos los casos con gran proliferación de callos embriogénicos. Actualmente, a partir de estos callos, se evalúa el número de plantas desarrolladas y la estabilidad genética de las mismas.

REGENERACIÓN IN VITRO DE *Arachis hypogaea* L. , MEDIANTE ORGANOGÉNESIS DIRECTA E INDIRECTA³.

Cucco¹, M, F.; A, Rossi Jaime²

1. Dto de Microbiología; Fac de Cs Exactas, Fco, Qco y Naturales. UNRC.
2. Profesor de Fisiología Vegetal. Fac de Cs Exactas, Fco, Qco y Naturales. UNRC. Arossijaume@exa.unrc.edu.ar
3. Proyecto financiado por la Secretaría de Ciencia y Técnica de la Universidad Nacional de Río Cuarto.

Las variedades de maní tipo runner, son las que principalmente se siembran en la zona sur de la provincia de Córdoba; su difusión introdujo una nueva enfermedad fúngica, la viruela tardía, la que conjuntamente con otras como: sarna, mancha húmeda, roya, tizones, podredumbre de frutos, ocasionan importantes pérdidas económicas y condicionan cada vez más su cultivo.

La transformación genética de la planta, mediante la introducción de genes que lleven resistencia a dichas enfermedades, constituye una alternativa para la obtención de variedades resistentes.

Una alta eficiencia de regeneración " in Vitro " de *Arachis hypogaea* L, es fundamental para la obtención de plantas transgénicas y este proyecto tiene como finalidad obtenerla.

Durante 1998, se comenzó a trabajar en la inducción de embriones somáticos a partir de diferentes explantos: cotiledones embrionados y no embrionados, epicótilos y hojuelas, de las variedades Tegua, Nahuel, Florman INTA; obteniéndose el mayor porcentaje de callos embriogénicos cultivando epicótilos con 50 mg/l de 2,4-D. Los embriones obtenidos dieron lugar a la formación de plántulas, las cuales aclimatadas llegaron al estado reproductivo.

Actualmente, se esta trabajando en la producción de embriones somáticos en medio líquido y en la multiplicación de las tres variedades mencionadas por medio de estacas.

CULTIVO *in vitro* DE RUDIMENTOS SEMINALES DE VID (*Vitis vinifera* L.)

Silvia M. Ulanovsky, Rubén H. Osorio, Jorge G. Valdez y Pablo Castro

Lugar: EEA Rama Caída INTA

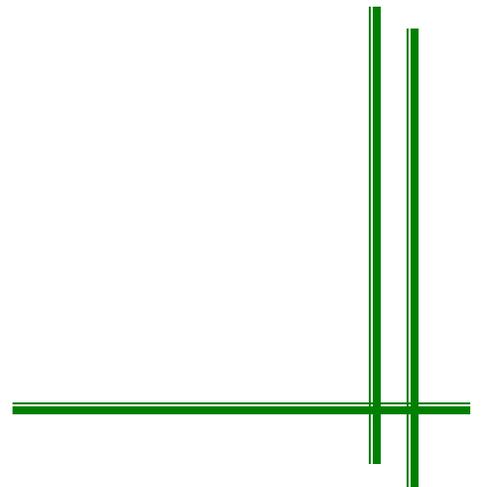
La demanda creciente de variedades de uva de mesa estenospermocárpicas, conocidas en el mercado como "sin semillas", ha incentivado la aplicación de técnicas de cultivo *in vitro* en los programas de obtención de nuevas variedades. El cultivo *in vitro* de rudimentos seminales ha posibilitado obtener plantas viables de cruzamientos entre progenitores estenospermocárpicos. Se aplica el término estenospermocarpia a la formación de frutos, que por aborto de los óvulos fecundados, no presentan semillas normales sino rudimentos seminales de distinto tamaño y consistencia.

En el Programa de Mejoramiento de vid conducido en la EEA INTA Rama Caída funciona desde 1996 el laboratorio de cultivo *in vitro*. Los rudimentos seminales se cultivan en cajas de Petri con medio nutritivo de Nitsch y Nitsch. Las plántulas, germinadas en forma directa o por excisión de embriones, crecen hasta su aclimatación a condiciones *in vivo* en frascos de vidrio con medio nutritivo de Murashige y Skoog.

Las variedades presentan un comportamiento diferencial al cultivo *in vitro*. Se ensayan cruzamientos recíprocos para evaluar la capacidad de producción de embriones viables de las variedades como progenitores femeninos y masculinos. Asimismo se determina para cada variedad el período adecuado de cosecha. En cada ciclo productivo se cultivan alrededor de 10.000 rudimentos seminales.

Sección II

Micropropagación



C.E.PRO.VE: PLANES DE INVESTIGACIÓN DENTRO DEL MARCO DE LA COMISION DE INVESTIGACIONES CIENTIFICAS (CICPBA)

Abedini W., Sharry S., Ruscitti M., Marinucci L. y Ledes S.

*Centro Experimental de Propagación Vegetativa (C.E.Pro.Ve), Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. C.C 31 (1900) La Plata.
Fax: 0221-425-2346. Tel. 0221-483-3467*

En los últimos años, la superficie forestada de la Prov. de Buenos Aires se vio incrementada en forma notoria, existiendo a la fecha más de 165.000 ha con plantaciones de producción. La creciente demanda de madera y productos forestales, la reducción de tierras disponibles para forestación y la existencia de ambientes no aptos o contaminados, a conducido a la necesidad de introducir varias herramientas moleculares y biotecnológicas dentro de los programas de investigación y mejora genética forestal. Por tal motivo, en el C.E.Pro.Ve se desarrollan los siguientes planes subsidiados por la Comisión de Investigaciones Científicas de la Prov. de Buenos Aires:

1. Incremento de la variabilidad genética de especies forestales de importancia para la Prov. de Buenos Aires mediante la aplicación de biotécnicas.

Objetivos:

- Ajuste de protocolos de regeneración de plantas *in vitro*
- Cultivo de meristemas
- Obtención de semilla sintética
- Análisis de la variabilidad de plantas regeneradas
- Selección *in vitro* a estrés abiótico
- Transformación genética

Especies en las que se trabaja: *Melia azedarach*, *Fraxinus sp.*, *Populus sp.*

2. Estudio de las especies forestales nativas que crecen en sitios de alta contaminación industrial en el partido de La Plata.

Objetivos:

- Dilucidar el efecto de ambientes con alta polución sobre la anatomía y fisiología de *Erythrina crista-galli* (seibo)
- Ajustar los métodos de propagación vegetativa de los individuos resistentes a situaciones de alta contaminación.
- Utilizar el material clonado con el fin de forestar ambientes semejantes.

**PROPAGACION VEGETATIVA DE ESPECIES FORESTALES, FRUTALES,
AROMATICAS Y MEDICINALES.**

**Programa de Incentivos a la Investigación, Ministerio de Educación de
la Nación C.E.Pro.Ve**

Abedini W., Dessy S., Sharry S., Rivas C., Traversaro M., Romero M., Torres R., Mattia V.

Cátedras de Introducción a la Dasonomía, Fruticultura y Fisiología Vegetal.

*Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. C.C 31
(1900) La Plata.*

Fax: 0221-425-2346. Tel. 0221-483-3467

La finalidad de este plan de investigación es la propagación de plantas nativas y exóticas de importancia para la industria forestal, alimenticia y farmacéutica. Para ello se aplican técnicas de macropropagación y cultivo de tejidos in vitro, en especies pertenecientes a la flora bonaerense y en especies exóticas de interés económico. La producción de un gran número de plantas nativas selectas obtenidas mediante estas técnicas, permitirá disponer de germoplasma nativo para rehabilitar ecosistemas degradados, conservar recursos genéticos y contar con materia prima de potencial uso industrial. En el caso de las especies frutales, se identifican y seleccionan variedades de ciruelos del Delta Bonaerense, con dos finalidades, determinar la aptitud para consumo en fresco e industrialización y buscar tolerancia a bacteriosis.

Objetivos:

Aplicar diferentes técnicas de reproducción asexual para la producción masiva de especies forestales, frutales, medicinales y aromáticas, nativas y exóticas.

Realizar acciones conducentes a profundizar el campo del conocimiento científico en lo referente a caracterización, aplicación industrial, propagación y conservación de recursos fitogenéticos nativos.

Conservar germoplasma de especies vegetales nativas mediante la aplicación de biotécnicas.

Especies que abarca el proyecto: *Celtis tala*, *Erythrina crista -galli*, *Scutia buxifolia*, *Acacia caven*, *Parkinsonia aculeata*, *Jodinia rombifolia*, *Phytolacca tetramera*, *Salix humboldtiana*, *Shinus sp.*, *Tessaria integrifolia*, *Phyllanthus sellowianus*, *Sapium haematospermum*, *Melia azedarach*, *Aloisia sp.*, *Melissa sp.*, *Hydrocotyle bonaeriensis*, *Lippia sp.*, *Mentha sp.*, *Pelargonium graveolens*.

**BANCO DE GERMOPLASMA DE ESPECIES FORESTALES NATIVAS DE LA
PROVINCIA DE BUENOS AIRES**

Abedini W., Rivas C., Guido A., Rivera S., Ruscitti M., Marinucci L. y Galliussi E.

*Cátedras de Introducción a la Dasonomía, Dendrología y Fisiología Vegetal.
Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata. C.C 31 (1900)
La Plata. Fax: 0221-425-2346. Tel. 0221-483-3467.*

La Provincia de Buenos Aires cuenta con un número elevado de especies vegetales nativas, distribuidas en las distintas Regiones Fitogeográficas, y la mayoría se encuentran sometidas a distintas presiones, sobre todo de tipo antrópico, que ponen en peligro la subsistencia de la flora, la fauna y de los ecosistemas en su conjunto.

Los árboles autóctonos, en particular, brindan desde tiempos remotos una serie de servicios a los pobladores locales en forma de leña, abrigo, tratamientos terapéuticos formando parte del patrimonio cultural y paisajístico. La pérdida de biodiversidad es un proceso acelerado que lleva a la desaparición de especies nativas sin haber conocido a fondo sus características y usos potenciales.

Los bancos de germoplasma de plantas poseen colecciones de material vegetal con objeto de mantenerlas vivas y preservar sus características para el futuro beneficio de la humanidad y del ambiente.

El propósito de este plan es conservar germoplasma forestal nativo ex situ en forma de banco activo de semillas, banco in vitro y huerto clonal.

Las especies incluidas son: espinillo (*Acacia caven*), seibo (*Erythrina crista-galli*) y cina-cina (*Parkinsonia aculeata*)

Las tareas programadas incluyen:

- Relevamiento, identificación y recolección del material en áreas protegidas.
- Estudio de la fisiología de las semillas (viabilidad y características germinativas)
- Conservación de semillas en condiciones de baja temperatura y humedad.
- Ajuste de técnicas de micropropagación in vitro.
- Conservación de meristemas y plantas completas in vitro en condiciones de crecimiento limitado.
- Implantación de huerto clonal con ejemplares obtenidos mediante técnicas de macropropagación y micropropagación in vitro.
- Caracterización y evaluación del material regenerado, mediante técnicas bioquímicas y moleculares

MICROPROPAGACIÓN DE ESPECIES DE INTERÉS AGRÍCOLA E INDUSTRIAL

Llorente, B. E.; Apóstolo, N. M.; Brutti, C. B.; Carletti, S. M.; Bravo, C. A.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CULTEV)

Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján
CC 221. Luján (6700). BsAs. Argentina. e-mail: llorente@mail.unlu.edu.ar

La finalidad de este proyecto es tratar de establecer los parámetros biológicos, químicos y ambientales, necesarios para micropropagar clones de especies vegetales elegidas por su importancia agronómica o industrial. De este modo se trata de optimizar la producción constante de clones selectos por sexo y productividad, tanto con fines agrícolas como para la obtención de metabolitos.

En nuestro laboratorio hemos logrado estandarizar la técnica de micropropagación de jojoba, *Aristolochia* y alcaucil. El plan de trabajo incluye los ensayos necesarios para incrementar los rendimientos en las diferentes etapas de la micropropagación (variaciones en la concentración de nitrógeno, reguladores de crecimiento y utilización de ciclodextrinas).

Actualmente realizamos ensayos para estudiar el efecto de oligosacáridos (3 a 5 unidades) y de diferentes sustratos sobre el enraizamiento y la aclimatización de jojoba y alcaucil. Por otra parte, ha comenzado a estudiarse el efecto de la concentración de amonio en los medios de cultivo sobre la vitrescencia o hiperhidricidad de los brotes de jojoba. Estos experimentos involucran estudios morfológicos, anatómicos y ultraestructurales de las plantas micropropagadas.

Además, está proyectado realizar el estudio de la estabilidad genética y ensayos a campo de las plantas producidas. Por otro lado, se estudia el enraizamiento de especies vegetales recalcitrantes y la aclimatización de plantas obtenidas por cultivo *in vitro* aplicando algunas PGPR (Plant Growth-Promoting Rhizobacteria) como *Azospirillum*, *Azotobacter*, *Bacillus*, *Bradyrhizobium*, *Pseudomonas*.

En primera instancia, se evaluó la acción de diferentes PGPR sobre cultivos hidropónicos de tomate, pimiento, vinca, digitalis, cebada y jojoba. *Azospirillum* y *Azotobacter* estimularon el enraizamiento *in vitro* y la aclimatización de jojoba, portainjertos de manzano y cerezo y *Spathiphyllum*. Esta técnica biotecnológica se aplicará en diferentes especies cultivadas *in vitro* y se realizarán estudios ultraestructurales y de actividad peroxidásica.

AVANCES EN EL ESTUDIO DE LA PROPAGACIÓN DE PLANTAS LEÑOSAS DE INTERÉS REGIONAL

Miriam E Arena

Laboratorio de Propagación y Producción Vegetal (LPPV), Centro Austral de Investigaciones Científicas (CONICET), C.c. 92, Ushuaia (9410), Tierra del Fuego, Argentina.

Desde 1992, el LPPV viene llevando a cabo estudios sobre la producción y propagación de plantas forestales y frutales de la Patagonia. Si bien se han abordado diversos aspectos de la propagación convencional tanto agámica como sexual en diversas especies, los estudios se han centrado en la propagación por cultivo *in vitro*, desarrollándose protocolos de propagación para diversas especies de *Nothofagus*, *Berberis buxifolia* y *Ribes magellanicum*. La capacidad de enraizamiento suele ser el factor limitante al propagar especies leñosas, existiendo un gran desconocimiento al referirnos a la fisiología de especies nativas en general. Es por ello que en los últimos años el LPPV ha comenzado a estudiar la morfofisiología del enraizamiento adventicio *in vitro* en *N. nervosa* y *N. antarctica*, y más recientemente en *B. buxifolia*, en forma conjunta con diversas Instituciones (Centro de Ecofisiología Vegetal, Universidad Nacional del Sur, Universidad de Buenos Aires, Universidad Nacional de La Plata). Los trabajos llevados a cabo tienen por objetivo correlacionar las diferentes etapas del enraizamiento adventicio *in vitro* (Iniciación, Inducción y Expresión), con los cambios bioquímicos (peroxidasas, reguladores del crecimiento, fenoles y flavonoides, nutrientes, poliaminas, etc...) y morfológicos (cortes histológicos e histoquímicos) ocurridos dentro de la microestaca. Los resultados obtenidos aportan conocimientos y metodologías de análisis para el estudio del enraizamiento adventicio *in vitro* de las especies leñosas, que a través de la comprensión del proceso, permitirán mejorar las técnicas y medios de propagación (medios sucesivos de propagación).

CULTIVO "*in vitro*" DE *Eucalyptus dunnii*: ENRAIZAMIENTO Y RUSTICACIÓN

Billard, Cristina - Lallana, V.H.

Facultad Ciencias Agropecuarias - Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales - Universidad Nacional de Entre Ríos

El Laboratorio de Cultivos de Tejidos Vegetales, dependiente de la Cátedra de Fisiología Vegetal de la F.C. A. - U.N.E.R. cuenta con el equipamiento básico necesario para la realización de trabajos de micropropagación *in vitro* de especies arbóreas y ornamentales.

A través de un proyecto de Investigación (PID - UNER 2113) sobre multiplicación de *Eucalyptus dunnii* se logró poner a punto la técnica de desinfección e implantación de los explantos (segmentos nodales y brotes epicórmicos de *Eucalyptus dunnii*) y la preparación de medios de cultivos. Los resultados fueron presentados en el II Simposio Argentino de Biotecnología Vegetal - REDBIO Argentina - Huerta Grande, Córdoba - 1993 y en la Revista Ciencia, docencia y tecnología de la Universidad Nacional de Entre Ríos N°16 año IX,1998. Además se publicó una traducción del inglés "Términos comúnmente usados en cultivo de tejidos", 1995.

La continuidad de este trabajo se logró a través del Proyecto PID - UNER 2064 "Cultivo *in vitro* de *Eucalyptus dunnii*: enraizamiento y rusticación" actualmente en ejecución. El objetivo es ensayar medios de cultivo y concentraciones hormonales para lograr al menos el 50% de enraizamiento de brotes a partir de explantos de *Eucalyptus dunnii* ensayando distintos sustratos y condiciones de sombreado para lograr la rusticación de plantas.

Además se participa del Proyecto: "Banco de Germoplasma y selección de ecotipos de especies medicinales y aromáticas" en lo que se refiere a la multiplicación de plantas madres de las especies seleccionadas para el Banco de Germoplasma, habiendo realizado ensayos preliminares para la obtención de plántulas de menta (*Mentha sp.*), que servirán de base para ensayos a ser implantados en el 2000.

Palabras claves: micropropagación - cultivo *in vitro* - rusticación - *Eucalyptus dunnii* - *Mentha sp.* -

PROPAGACIÓN DE *Prosopis chilensis* (MOL.) STUNTZ MEDIANTE TÉCNICAS DE CULTIVO "in vitro".

Director: Dr. Luis F. Hernández

E-mail: lhernan@criba.edu.ar

Participantes: Ing. Agr. Luis A. Caro, Dra. Viviana Echenique, Lic. Pablo Polci, Ing. Agr. Pablo Marinángelli y Dr. Néstor Curvetto.

Departamento de Agronomía – Universidad Nacional del Sur
San Andrés s/n (Altos de Palihue)
(8000) Bahía Blanca - Buenos Aires - Argentina
TE: 0291-4531821 FAX: 0291-4595127 E-mail: lcaro@criba.edu.ar

Dada la dificultad de regenerar agámicamente por vías convencionales árboles adultos de *Prosopis chilensis* ("algarrobo de Chile"), se intenta establecer, como objetivo general, un protocolo simple de regeneración *in vitro* de plántulas de esta especie, con fines de poder seleccionar fenotipos en estado adulto que demuestren caracteres forestales elite para su propagación.

Se evaluaron 2 medios de cultivo basales, BTM (Broadleave Tree Medium) con la concentración de macronutrientes reducidos a la mitad y MS (Murashigue and Skoog). A ambos medios basales se los combino con 3 auxinas (ácido 3 indol acético, ácido naftalen acético y ácido 3 indol butírico) y una citocinina (6-bencil adenino purina). Como explantes se utilizaron estacas de 1-2 cm de longitud con una yema lateral, extraídas de árboles adultos y plantines.

Las microestacas fueron cultivadas en tubos de ensayo con 5 ml de medio de cultivo durante un período de 10 días, subcultivándose posteriormente las mismas en medio basal por 30 días más. Por cada tratamiento se realizaron 30 réplicas y dos repeticiones. Los parámetros evaluados fueron: % de tubos infectados (TI), % de tubos con estacas brotadas (V), % de tubos con estacas brotadas y enraizadas (VR), longitud de raíces en mm (LR), longitud de vástagos en mm (LV), peso seco de raíces (PR) y peso seco de vástagos (PV).

El porcentaje de infección de los explantes es mayor cuando se trabaja con material adulto. La mayor longitud de raíces y porcentaje de enraizamiento se obtuvo con el medio basal BTM fortificado con 3 mg.l⁻¹ de IBA y 0,05 mg.l⁻¹ de BAP (p<0,05). Se observó menor porcentaje de enraizamiento, menor elongación de vástagos y menor porcentaje de estacas brotadas en los tratamientos que contenían ANA (p<0,05). No se encontraron diferencias significativas en los valores medios de PR y PV (p<0,05).

LIBERACIÓN DE VIRUS Y MICROPROPAGACIÓN DE CLONES DE AJO COLORADO (*Allium sativum* L.) PARA LA OBTENCIÓN DE AJO SEMILLA

Director: Curvetto, Néstor

Integrantes: Luciani, Gabriela; Marinangeli, Pablo

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS – CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina.

e-mail: ficurvet@criba.edu.ar

El ajo es la primera hortícola de exportación en fresco con ingresos que oscilan entre 50 y 70 millones de dólares por año. En Argentina, el ajo colorado representa el 40 % de la producción total y el 50 % del volumen exportable. La región productora del sur de Buenos Aires con 650 ha y un rendimiento de 5-6 tn ha⁻¹ aporta el 5 % de la producción nacional.

La micropropagación del ajo presenta dos problemas principales: baja tasa de multiplicación y fácil dispersión de enfermedades, principalmente virosis que causan una gran disminución del rendimiento y la calidad del cultivo. La resolución de estos problemas fue planteada a través de la aplicación de termoterapia y quimioterapia para la obtención de plantas saneadas de virus y la optimización de la multiplicación y bulbificación in vitro en clones de ajo colorado. Se trabajó en colaboración con la Dra. V. Conci del IFFIVE (INTA) Córdoba y se logró la liberación de virus de los clones Español Selección Ascasubi, Español Selección Médanos e I 50 mediante el uso de termoterapia y cultivo de meristemas. Actualmente, se está evaluando el efecto de dos agentes antivirales. También se logró la optimización de la multiplicación y bulbificación de dichos clones estudiando la influencia del medio de cultivo basal, el suplemento hormonal y el tipo de explanto empleado. Así se obtuvo un protocolo ajustado a los requerimientos nutricionales de cada clon donde la relación nitrato:amonio es la variable que condiciona en multiplicación la respuesta a los reguladores de crecimiento y en bulbificación la respuesta a las concentraciones del medio y de sacarosa. Asimismo, se evaluó el efecto del AMPc y de los ácidos traumático (AT) y jasmónico (AJ) en el medio de multiplicación, observándose que tanto el AMPc como el AJ ejercen una estimulación de la brotación y de la formación de bulbillos mientras que el AT solamente estimula la bulbificación.

MULTIPLICACIÓN DE PORTAINJERTOS PARA FRUTALES DE CAROZO

Daorden, Maria Elena; Graciela Corbino.
EEA INTA San Pedro.
CC N° 43 2930 San Pedro - Buenos Aires.
E - mail: daorden@inta.gov.ar

Laboratorio de Cultivo in vitro de la E.E.A San Pedro, cuenta con la infraestructura adecuada para llevar a cabo trabajos de micropropagación de distintas especies, y con equipamiento para realizar la determinación de virus mediante el test Elisa.

Una de las líneas de trabajo que se lleva a cabo es la multiplicación in vitro de portainjertos clonales de frutales de carozo con el objetivo de obtener un lote de plantas madres de sanidad controlada.

Con esta finalidad se llevan a cabo las siguientes acciones:

- I. Evaluación virósica por medio del test de Elisa de los distintos portainjertos que se multiplican in vitro. Los virus evaluados son: Prunus Necrotic Ring Spot Virus (PNRSV), Prunus Dwarf (PDV) y Sharka (PPV).
- II. Aplicación de distintas estrategias in vivo para el control de microorganismos en el material que se sembrará in vitro.
- III. Evaluación de distintas hormonas de multiplicación y en diferentes dosis para cada uno de los porta-injertos probados.
- IV. Ensayos de ajuste de la técnica de micropropagación para portainjertos de propagación agámica y de semilla.
- V. Evaluación de distintas hormonas de enraizamiento y en diferentes dosis para cada uno de los porta-injertos probados
- VI. Medición de desarrollo de plantas obtenidas en vivero (altura y diámetro de tronco), en ensayo de distintos orígenes de carozos.
- VII. Ensayos de germinabilidad de carozos de diferentes orígenes de cuaresmillos.

MICROPROPAGACION DE *Eucalyptus grandis* PARA LA FORMACION DE VIVEROS CLONALES. PROCEDIMIENTO Y COSTO.

PARTE I

PROCEDIMIENTO: DIAMANTE Alicia¹ y VERA BRAVO Carlos² COSTO: MOLINA, Néstor³

INTA Bella Vista (Ctes.) CC 5 CP 3432 Tel-FAX: 03777 451923.

E-mail: intaexp@bvista.com.ar

¹Ing. Agr. MSc. Mejoramiento Genético ²Ingeniero Agrónomo ³CPN
Especial. Desarrollo Regional.

La micropropagación clonal de *Eucalyptus grandis* es una realidad innegable por las bondades que presenta el método para la multiplicación comercial de material seleccionado. Uno de los temas que no se ha estudiado con detenimiento es el cálculo de costos.

El objetivo del trabajo fue calcular el costo de cada actividad involucrada en el protocolo de micropropagación *in vitro* de *Eucalyptus grandis* para determinar el costo unitario del plantín.

Se trabajó con clones de *Eucalyptus grandis* seleccionados del jardín clonal del INTA Bella Vista. El protocolo de micropropagación se dividió en etapas: Introducción, Inducción, Multiplicación, Enraizamiento, Acondicionamiento de plantas completas y tareas de Mantenimiento (tercerizadas).

La metodología de costeo aplicada fue la de "Sistema de Costos basado en Actividades" (ABC) el cual incorpora elementos cuantitativos (costo primo determinado, imputado, efectivo) y cualitativos (mejora calidad, negociación y cadena de valor).

La metodología propuesta describe los componentes del costo y permite ajustar actividades en base al principio: "el costo que no arroja valor debe ser tercerizado".

El ciclo productivo para obtener clones de Eucaliptos *in vitro* es variable y puede abarcar de 10 a 16 meses, dependiendo del clon, su actividad vegetativa y adaptación *in vitro*.

El método de medición de costo basado en el protocolo de micropropagación estandarizado en INTA Bella Vista permitió obtener un valor unitario por plantín el que presenta factibilidad económica para la formación de viveros de plantas madres prebásicas, constituyendo esta la "PARTE I", la que se complementa con la "PARTE II", presentada en otro trabajo.

**MICROESTACAS (MICROCUTTING) DE *Eucalyptus grandis* A PARTIR DE CLONES
MICROPROPAGADOS "in vitro".
PROCEDIMIENTO Y COSTO. PARTE II**

PROCEDIMIENTO: DIAMANTE Alicia¹ y VERA BRAVO Carlos² COSTO: MOLINA Néstor³

INTA Bella Vista (Ctes.) CC 5 CP 3432 Bella Vista (Corrientes) Argentina

Tel-FAX: 03777 451923 E-mail: intaexp@bvista.com.ar

¹Ing. Agr. MSc. Mejoramiento Genético ²Ing. Agrónomo ³CPN Esp. En Desarrollo Regional

En Eucaliptos la micropropagación *in vitro* de individuos selectos, complementada con la técnica de producción de microestacas (microcutting) *ex vitro* representa una nueva alternativa para la obtención de forestaciones clonales de máxima homogeneidad y calidad.

El objetivo de este trabajo fue calcular el costo de las actividades necesarias para lograr microestacas enraizadas *ex vitro* y en condiciones óptimas para su transferencia a campo, a partir de clones micropropagados *in vitro*.

Se utilizaron clones de *Eucalyptus grandis* de *in vitro* como plantas madres dadoras de microestacas. Las plantas de *in vitro* y las microestacas fueron transferidas a tubetes conteniendo un sustrato formado por vermiculita y turba (1:1) y un fertilizante de liberación lenta con macro y microelementos. Las plantas se rustificaron en invernáculo húmedo (80 % humedad). A los 30 días del trasplante se inició la primera cosecha de microestacas, separando los extremos de crecimiento (3 a 5 cm) de las plantas madres. Para calcular el costo se utilizó el procedimiento de "Costeo basado en Actividades" considerando el total de microestacas obtenidas durante los 5 meses que duró la experiencia.

Se constató que las microestacas forman plantas completas sin el agregado de enraizantes.

La cantidad total de plantas de microestacas obtenidas a partir de una planta madre de *in vitro* varió de 0.5 a 14.2. De estas, las que alcanzaron condiciones óptimas para el trasplante pasaron de 0.4 a 12.7. Esta variación estuvo asociada con el agregado de fertilizantes.

El costo unitario de cada planta lograda de microestaca sin fertilizar triplicó el valor de la planta madre *in vitro*. En cambio con el agregado de fertilizante, el valor es un tercio de la planta original.

Queda pendiente, para futuros ensayos, determinar el costo mínimo posible con mayor tratamiento de fertilizante, de forma de alcanzar el punto de inflexión de costos.

**OBTENCIÓN DE MICROESTACAS (MICROCUTTINGS) PARA LA
PRODUCCIÓN CLONAL DE *Eucalyptus grandis* A PARTIR DE PLANTAS
MICROPROPAGADAS IN VITRO**

Vera Bravo Carlos, APARICIO Jorge y DIAMANTE Alicia
EEA INTA Bella Vista CC 5 – CP 3432 – Corrientes E-mail: intaexp@bvista.com.ar

Para la producción clonal de *Eucalyptus grandis*, existe una nueva técnica que permite propagar masivamente árboles selectos, empleando microestacas (microcutting) obtenidas a partir de plantas micropropagadas *in vitro*. En estas últimas se produce un rejuvenecimiento que permite incrementar la capacidad de enraizamiento de los microcuttings, los que además tienen la ventaja de presentar buen sistema radicular.

El objetivo del presente trabajo fue determinar la producción de microcutting a partir de plantas propagadas *in vitro*, el efecto de la incorporación de un fertilizante al sustrato y la producción de plantas de calidad.

Se usó un stock de 787 plantas enraizadas *in vitro* dispuestas en bloques de 200 y transferidas a un sustrato compuesto por vermiculita y turba (1:1) al que se aplicó un fertilizante de liberación controlada con 4 dosis (0, 200, 400 y 600 mg/planta). Al mes se extrajeron puntas de brotes de 3-5 cm y las láminas foliares se redujeron al 30%, el enraizamiento se realizó en un invernáculo con humedad relativa ambiente del 80-85% y temperatura promedio de 35 °C. El proceso de corte de microcutting se repitió 9 veces durante 5 meses.

La relación entre el número de microcutting y la planta madre fue: 0,5; 10,2; 12,7 y 14,2 a medida que aumentó la dosis de fertilizante en el sustrato.

Por otra parte, la relación entre las plantas óptimas para trasplantar a campo y la planta madre fue: 1; 7; 9,5 y 11,8 respectivamente, alcanzando en este último caso un 83 % de eficiencia.

Estos resultados preliminares demostraron la importancia del fertilizante en el sustrato, se deberán realizar ensayos para determinar dosis y la obtención del mayor número de plantas óptimas para el transplante.

**INFLUENCIA DE TRES MEDIOS DE CULTIVO EN EL MACOLLAJE IN VITRO DE LA
VARIEDAD DE CAÑA DE AZÚCAR LCP 85-384.**

Díaz, L.; Sosa, S.; Digonzelli, P.; Portas de Zamudio, A.; Martínez Arias, F. y Noguera, A.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Cátedra de Caña de Azúcar. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900. (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina.

E-mail: ldiaz@manant.unt.edu.ar

La micropropagación de variedades de caña de azúcar es ampliamente utilizada para producir caña semilla de calidad en muchas regiones cañeras del mundo. En un sistema de micropropagación en escala comercial es fundamental optimizar todas las etapas. El objetivo de este trabajo es lograr la optimización de la etapa de multiplicación, a fin de obtener el mayor número de macollos posibles, para la variedad LCP 85-384. Se trabajó con tres medios de cultivo líquidos:

a)1M= MS (1962) + Cinetina (0.07 ppm) + BAP (0.15 ppm) + Ac. Cítrico (150 ppm).

b)2M= MS (1962) + Cinetina (0.1 ppm) + BAP (0.2 ppm) + Ac. Cítrico (150 ppm).

c)3M= MS (1962) + Cinetina (0.05 ppm) + BAP (0,1 ppm) + Ac. Cítrico (150 ppm). Se utilizaron vástagos provenientes de cultivo de meristemas, se seleccionaron tres alturas diferentes: 2, 4 y 6 cm. Se colocaron seis vástagos por frasco de 350 ml, conteniendo 50 ml de medio de cultivo. Se trabajó con un diseño totalmente aleatorizado con cinco repeticiones para cada altura y medio de cultivo. Durante dos meses se realizaron evaluaciones cada veinte días de: altura, número y peso fresco de los macollos y número de hojas de los mismos. El análisis estadístico de los resultados demuestra que no hay diferencias significativas entre los tres medios con respecto al peso fresco y altura de macollos; mientras que el 2M es significativamente superior con respecto al número de macollos formados. La tasa de multiplicación fue 1:5 para el 1M, 1:7 para el 2M y 1:6 para el 3M. Hay diferencias significativas entre los tres medios de cultivo en relación al número de hojas, el 2 M es el de mejor comportamiento. En la actualidad se está evaluando el comportamiento de esta variedad empleando medios de cultivo sin cinetina.

**COLORANTES PARA CONTROLAR LA CONTAMINACIÓN BACTERIANA EN LA ETAPA DE MULTIPLICACIÓN DE LA VARIEDAD DE CAÑA DE AZÚCAR NA 63-90.
PARTE I.**

Digonzelli,P; Carrizo de Bellone,S; Díaz,L y Portas de Zamudio,A.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales. Cátedra de Caña de Azúcar. Laboratorio de Microbiología. Cátedra de Microbiología Agrícola. Facultad de Agronomía y Zootecnia. Universidad Nacional de Tucumán. Av. Roca 1900. (4000) San Miguel de Tucumán. Argentina.

E-mail: digonze@manant.unt.edu.ar

El problema de la contaminación bacteriana es uno de los más graves para los micropropagadores de plantas en el mundo. La caña de azúcar presenta una gran flora bacteriana endofítica que se convierte en contaminante de alta frecuencia de aparición en la etapa de multiplicación. El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de cuatro colorantes, en cuatro concentraciones, sobre el crecimiento de dos cepas bacterianas aisladas a partir de cultivos contaminados de la variedad de caña de azúcar NA 63-90 en la etapa de multiplicación. Los colorantes empleados fueron: Azul de Metileno, Cristal Violeta, Verde Brillante, Violeta de Genciana. Se usaron las siguientes concentraciones: 50,100, 200 y 400 ppm, incorporando los colorantes al medio de cultivo de multiplicación (MS 1962 modificado). Las bacterias se sembraron en medio MS (líquido) con el agregado de los colorantes, con cinco repeticiones para cada colorante y cada concentración. Se llevó a estufa de cultivo y se evaluó el desarrollo de colonias, realizándose preparados microscópicos para confirmar la presencia de las bacterias sembradas. Se determinó el colorante y la concentración que permite el control de ambas cepas bacterianas simultáneamente. El verde brillante en las concentraciones de 100, 200 y 400 ppm y el cristal violeta en las concentraciones de 200 y 400 ppm impidieron el desarrollo de ambas cepas bacterianas. Se probó luego si su efecto es bacteriostático o bactericida, para lo cual se resembró en medio MS (sólido) con los colorantes en las concentraciones mencionadas y sin los colorantes, con cuatro repeticiones para cada colorante y cada concentración. En ningún caso se observó desarrollo de colonias, por lo cual se infiere que el efecto de los colorantes es bactericida. En la actualidad se está probando la fitotoxicidad de estos colorantes en las concentraciones mencionadas sobre plántulas de caña de azúcar en la etapa de multiplicación.

**CAMBIOS EN PARAMETROS BIOQUIMICOS DURANTE EL
DESARROLLO DE LA HIPERHIDRICIDAD EN VASTAGOS MICROPROPAGADOS DE *Lupinus
polyphyllus***

* M. Divo de Sesar, **V. Melito, *A. Kato, *F. Vilella, A. M. Stella

*Cátedra de Producción Vegetal –Facultad de Agronomía, UBA, ** Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) – CONICET y FCE y N, UBA. Fvilella@mail.agro.uba.ar

La vitrificación o hiperhidricidad es un desorden que afecta la multiplicación *in vitro* de *L. polyphyllus* apareciendo alteraciones anatómicas, morfológicas y fisiológicas. Estos desórdenes pueden ser la consecuencia de cambios que ocurren antes que los síntomas visibles que definen este estado se vuelvan aparentes. Por lo tanto, este trabajo estudia cambios bioquímicos originados durante un ciclo de multiplicación en vástagos micropropagados vitrificados de *L. polyphyllus*. Se utilizó el medio M-S suplementado con 2,2 mM de BAP y 0,27 mM de ANA, tomándose muestras durante cuatro semanas para realizar los análisis correspondientes. El contenido de clorofilas (Cl) disminuyó desde 2512 a 499 $\mu\text{g g/p.fr}$. Las proteínas bajaron de 146,3 a 66,5 $\mu\text{g/g}$ de p.fr. La relación peso sc/fr descendió (%) de 14,9 a 6,7. El contenido total de porfirinas se redujo de 20 a 5 $\mu\text{g mg/proteína}$. Las porfirinas con mayor número de grupos carboxilos aumentaron mientras que el nivel de uroporfirinógeno III disminuyó. La disminución en Cl implicaría una caída en la tasa fotosintética y una reducción en la relación C/N. M-S es un medio rico en iones NH_4 , los que se asimilan más rápido que otros. La rápida absorción de NH_4 aumentaría el consumo de C desviándolo del camino metabólico que lleva a la síntesis de lignina y celulosa, lo que disminuiría la presión de las paredes celulares incrementando la absorción de agua, explicando el crecimiento vitrificado.

**ENRAIZAMIENTO DIRECTO DE VASTAGOS MICROPROPAGADOS
DE ARANDANO (*V. ashei* Reade y *V. corimbossum*)**

Divo de Sesar, Marta; Espósito, José; Vilella, Fernando

Cátedra de Producción Vegetal – Facultad de Agronomía – UBA
Fvilella@ mail.agro.uba.ar

Numerosos sistemas de micropropagación a escala comercial o experimental utilizan el enraizamiento *ex vitro* de los vástagos logrados. Este procedimiento provee un excelente período de transición entre el ambiente del laboratorio y el invernáculo disminuyendo las labores culturales. Este trabajo estudia el efecto de distintos factores que afectan el enraizamiento directo de distintas variedades de arándano. Vástagos micropropagados (5 ± 1 cm) de *V. ashei* var Climax y Tifblue y *V. corimbossum* var Cape Fear y O'Neill se plantaron, previo tratamiento con IBA (25 mg/l) en pequeñas bandejas cubiertas, para crear una cámara húmeda, en distintos sustratos: turba (T), perlita (P), arena (A), turba y arena (T+A), turba y perlita (T+P). A la mitad de las bandejas se les aplicó un pre-tratamiento de 14 días en oscuridad. Existiendo un tratamiento adicional para la variedad O'Neill en P sin IBA. Las bandejas se incubaron en cámaras climatizadas con 16 horas de fotoperíodo durante 9 semanas.

Tratamientos con IBA mejoran el porcentaje de enraizamiento (86 vs 45 %), el largo (32 vs 17 cm) y el peso seco (26 vs 15 mg) de las raíces. Asimismo, se observaron diferencias altamente significativas ($P \leq 0,01$) en los porcentajes de enraizamiento (media: 62 % y $T > P > T+P > T+A > A$), peso y largo de raíces. Las raíces formadas con T son más largas (28 cm) y las de P más pesadas (29 mg).

MULTIPLICACION *in vitro* DE BLUEBONNET (*Lupinus polyphyllus*)

*Kato, Adriana Elena; *Divo de Sesar, Marta; * Vilella, Fernando;

**Stella, Ana María

*Cátedra de Producción Vegetal –Facultad de Agronomía, UBA, ** Centro de Investigaciones sobre Porfirinas y Porfirias (CIPYP) – CONICET y FCE y N, UBA. Fvilella@mail.agro.uba.ar

Lupinus texensis es la flor del estado de Texas. Otras especies del mismo género poseen atractiva floración primaveral adaptándose a distintas condiciones ambientales. Por lo tanto, es de interés la explotación comercial de las mismas para flor de corte o bordura. El objetivo del presente trabajo fue ajustar un protocolo para la micropropagación de *L. polyphyllus*.

Segmentos nodales (1 cm) provenientes de seedlings se sembraron en el medio MS, completo, semisólido, suplementado con 3 % de sacarosa y distintas concentraciones de BAP (0 a 4,4 mM) y 0,27 mM de ANA. Los mismos se mantuvieron en cámaras climatizadas con fotoperíodo de 16 horas y $32 \mu\text{mol cm}^{-2}$ de luz.

A los 15 días comenzó la diferenciación de yemas. Al aumentar la concentración de BAP se incrementa el número de vástagos (tasa media de multiplicación 4,65:1) y a partir del día 18 y con 2,2 y 4,4 mM de BAP comienzan a manifestarse signos de hiperhidricidad (vitricación). Este desorden fue parcialmente revertido (66 %) al iniciarse y/o subcultivarse los mismos en el mismo medio reemplazando los iones NH_4 por K. Los brotes formados se dividieron y repicaron cada 4 semanas. Durante la etapa de enraizamiento no se observó formación de raíces en los brotes vitricados.

MICROPROPAGACIÓN DE *Eucalyptus grandis*

Autores: Plata, M. I.; Tesón, N.

Programa de Producción de Material de Propagación Mejorado del Subprograma Eucalyptus en Mesopotamia del Proyecto Forestal de Desarrollo INTA - SAGPyA, EEA Concordia. CC 34. Entre Ríos.

La propagación agámica es utilizada en la EEA Concordia del INTA como una herramienta ventajosa dentro del Mejoramiento Genético, ya que permite capturar la variancia genética total, maximizando el progreso genético en cada ciclo de mejoramiento. Para seleccionar un árbol que va a ser clonado los principales criterios que se tienen en cuenta son: productividad, forma del fuste o tronco, desrame natural, tamaño de copa. Los clones producidos en la experimental tienen como destino la instalación de ensayos comparativos clonales, de huertos semilleros clonales y la reposición del área de multiplicación vegetativa.

La técnica de micropropagación se utiliza para aquellos árboles selectos que por diversos motivos no pueden ser apeados y macropropagados. El cultivo *in vitro* de *Eucalyptus* consta de cuatro etapas: desinfección e introducción del explanto, multiplicación de brotes, elongación de brotes y enraizamiento. El mismo se lleva a cabo en una cámara de cultivo con condiciones de temperatura, intensidad de luz y fotoperíodo controlados. Para las distintas etapas se utilizan los medios de Murashige y Skoog, el de Fossard y el de Knop modificados. El explanto utilizado proviene de brotaciones epicórmicas obtenidas a partir de ramas incubadas en condiciones de alta humedad y temperatura. El mismo es desinfectado y sembrado en condiciones asépticas en el medio de cultivo específico para esta etapa. A los treinta días aproximadamente se separan los brotes axilares obtenidos y se repican al medio de cultivo donde se multiplican. Al mes se vuelven a separar los brotes multiplicados y se colocan en el medio de cultivo para elongación. Cuando el brote alcanza aproximadamente tres cm, se repica al medio de enraizamiento. En cada etapa varían la composición del medio de cultivo y las condiciones de luz. Una vez obtenidas las plantas completas *in vitro* se transplantan a macetas y se aclimatan primero en el módulo de propagación y luego en el vivero. El comportamiento de los clones es variable. Algunos pueden no ser elongados. En otros, la etapa de enraizamiento puede realizarse *ex vitro*, transplantando los brotes elongados directamente al sustrato esterilizado y manteniéndolos con alta humedad en la cámara de cultivo durante dos semanas. La EEA Concordia cuenta con noventa y cuatro clones de los cuales veinticinco son producidos mediante micropropagación. Los mismos están siendo evaluados en ensayos clonales de productividad.

MICROPROPAGACION DE PORTAINJERTOS PARA FRUTALES LEÑOSOS

M.I. Plata, C.M. Anderson y A. Fabiani

EEA Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, C.C. 34, 3200 Concordia, E. R.,
Email:plata@concordia.com.ar

Los frutales leñosos como cítricos, vides y durazneros se injertan sobre portainjertos que le confieren a la combinación copa/pie ciertos atributos como tolerancia a heladas, sequía, enfermedades y plagas. Los portainjertos para cítricos y durazneros son propagados comercialmente por semilla mientras que los de vid se obtienen por enraizamiento de estacas. Algunos portainjertos para cítricos potencialmente importantes producen poca semillas o son variables, al igual que sucede con los de duraznero.

1. Cítricos. Segmentos uninodales de trifolio [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf.] Rich 16-6 y Flying Dragon, de citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. x *P. trifoliata*] Benton y C-35 y de mandarina (*C. reticulata* Blanco) Murcott fueron cultivados en el medio de Murashige y Skoog (MS) + 25 mg/l y 500 mg/l de extracto de malta. La multiplicación de los vástagos de 'Rich 16-6', 'Flying Dragon', 'Benton' y 'C-35' se logró en MS con 40 mg/l de adenina, 2.2 μM de 6-bencilaminopurina (BA) y 1.23 μM de ácido indolbutírico (IBA), mientras que 'Murcott' se multiplicó en MS + 4.44 μM BA y 2.46 μM IBA. El enraizamiento se llevó a cabo en MS + 5.4 μM de ácido naftalenacético (ANA). Plantas de 'C-35', 'Benton', 'Flying Dragon' y 'Rich 16-6' de 1 año de edad se injertaron con yemas de naranja dulce 'Salustiana' y se plantaron a campo.

2. Durazneros. Segmentos uninodales de *Prunus* sp. Nemaguard extraídos de brotaciones de primavera fueron cultivados en 1/3 MS + 0.44 μM BA. La multiplicación y elongación de los vástagos se realizó en MS + 4.44 μM BA. Para enraizamiento se usó 1/2MS + 4.9 μM IBA con un 54% de éxito. Se adaptaron a maceta el 53% de las plántulas.

3. Vides. Segmentos uninodales de 5 cm de los híbridos SO4, Paulsen 1103 y Richter 110 extraídos de brotaciones de primavera se cultivaron en MS líquido sin sacarosa + 9.99 μM BA. La etapa de multiplicación y elongación se realizó en MS + 4.44 μM BA. El 64% de las plántulas de 'SO4' en 1/2MS + 0.54 μM ANA enraizaron y se obtuvo un 48% de adaptación a maceta. La disponibilidad del material permitirá evaluar el comportamiento versus los pies obtenidos por semillas o estacas.

**NUEVOS ENFOQUES AGRONÓMICOS Y TECNOLÓGICOS PARA PRUNOIDEAS
APTAS PARA LA ZONA FRUTÍCOLA TEMPLADO-HÚMEDA DE ARGENTINA**

Proyecto SECYT 08-044 04 Director O.H.Caso

Cátedra de Fruticultura Facultad Cs. Agr. y Forestales UNLP. CC 31. 1900 La Plata.

Centro de Ecofisiología Vegetal-CONICET. Serrano 669. 1414. Capital Federal.
Estación Experimental Agropecuaria San Pedro, Ruta Nac 9 Km 170 CC 43.CP 2930. San Pedro.

El proyecto propone establecer pautas para el mejoramiento de la producción de frutales de carozo en la zona templado-húmeda de la Argentina.

Para ello se buscará el saneamiento de los cultivares de portainjertos e injertos actualmente en uso, la recuperación de áreas por la incorporación de otros nuevos y el desarrollo de tecnologías de propagación clonal empleables para una producción en gran escala. Es importante además, para áreas frutícolas pre-existentes, la selección de nuevos portainjertos adecuados a la resolución de sus limitantes vinculadas con el suelo, que posibiliten la replantación de las nuevas combinaciones aprovechando el mayor vigor de la combinación estiónica.

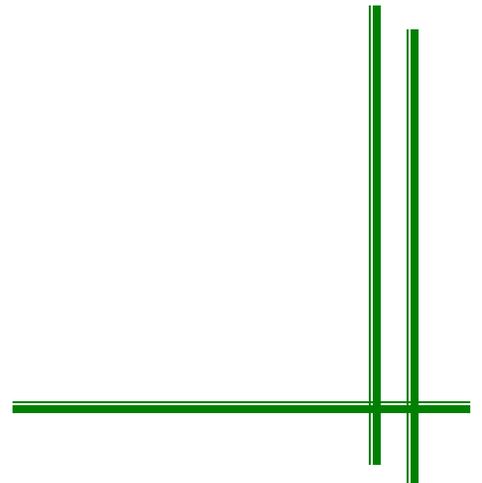
La propagación de los portainjertos de duraznero, se hará por micropropagación y/o propagación tradicional, identificando los métodos de multiplicación que mejor se adecuen a cada uno de ellos.

Se estudiará también la compatibilidad entre el patrón y el injerto, determinando la mejor combinación que permita contar con plantas de alta calidad y productividad. Como así también se evaluarán los perjuicios que ocasionan las enfermedades sistémicas actualmente presentes en el país

Material identificado y de sanidad controlada será propagado para ser evaluado, comparando su comportamiento en condiciones de campo, con los actualmente empleados. Los objetivos finales de este proyecto serán difundir entre los productores frutícolas actuales los resultados de las investigaciones sobre portainjertos y variedades, a fin de generar demanda de nuevas combinaciones estiónicas. Accionar sobre los viveristas, a través de la provisión de material vegetal de base y la transmisión del conocimiento, para que den respuesta a esta demanda. Contribuir a implementar la legislación nacional y provincial sobre viveros frutícolas. Generar fuentes de trabajo tecnificado. Contribuir a desarrollar las ventajas competitivas de la zona en el abastecimiento con frutas frescas de mercados nacionales y del exterior. Aportar información técnica sobre nuevas áreas potenciales a interesados diversos (Organismos públicos y privados, productores de plantas y de frutas, inversores, comercializadores).

Sección III

Metabolitos Secundarios



OBTENCIÓN DE ENZIMAS Y METABOLITOS SECUNDARIOS

Llorente, B. E.; Brutti, C. B.; Bravo, C. A.; Apóstolo, N. M.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales (CULTEV)

Departamento de Ciencias Básicas. Universidad Nacional de Luján.
CC 221. Luján (6700). BsAs. Argentina. e-mail: llorente@mail.unlu.edu.ar

Producción y purificación de proteinasas coagulantes de la leche

En este proyecto se estudia la actividad proteolítica y coagulante de la leche de extractos vegetales de especies de la Familia Compositae en plantas cultivadas a campo e *in vitro*. El objetivo consiste en aislar, caracterizar y purificar proteinasas vegetales que podrían usarse como sustitutos del cuajo bovino, en la elaboración de quesos.

Para lograr este objetivo, se elaboró la siguiente estrategia experimental: 1) estudio de la actividad proteolítica y coagulante de la leche de los extractos crudos de las diferentes partes de especies de esta Familia; 2) caracterización de la preparación enzimática cruda que presente los mejores parámetros de acuerdo a los resultados del ítem anterior; 3) purificación de dicho extracto crudo y caracterización de las fracciones puras; 4) inducir la expresión *in vitro* de proteinasas coagulantes de la leche por influencia de diferentes reguladores de crecimiento, en callos y suspensiones celulares; 5) realizar estudios comparativos entre las proteinasas coagulantes de la leche obtenidas de las plantas y por cultivos *in vitro*; 6) inmunolocalización de las proteinasas obtenidas; 7) producción de diferentes tipos de quesos y evaluación bioquímica y sensorial.

Obtención de metabolitos secundarios de plantas medicinales autóctonas: *Aristolochia* spp.

El objetivo de este proyecto es obtener metabolitos de interés medicinal a partir de especies nativas de *Aristolochia* por técnicas de cultivo *in vitro*. Las metodologías en desarrollo son: 1) micropropagación de diferentes especies de *Aristolochia* para producir clones seleccionados por su productividad de ácidos aristolóquicos y/o aristolactama;. 2) obtención de callos y suspensiones a partir de plantas cultivadas *in vitro*; 3) cultivo de tejidos transformados por *Agrobacterium* spp.; 4) estudios fitoquímicos sobre las plantas madres y tejidos cultivados *in vitro*, seleccionando el tipo de estrategia y/o tejidos más adecuado para la producción de estos metabolitos secundarios.

PRODUCCIÓN DE ALCALOIDES DEL TROPANO MEDIANTE EL EMPLEO DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *Brugmansia candida*: ESTUDIO DE LA INFLUENCIA DE GIBERELINAS EN EL METABOLISMO PRIMARIO Y SECUNDARIO

Carla N. Carrizo, Julián Rodríguez Talou, Sandra I. Pitta-Alvarez y Ana M. Giulietti.
Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,

Universidad de Buenos Aires. Junín 956, Buenos Aires (1113), Argentina. E-mail:
ccarrizo@ffyb.uba.ar

Los alcaloides del tropano, hiosciamina y escopolamina, son compuestos utilizados en medicina como anticolinérgicos. Su fuente de obtención son plantas de la familia Solanaceae debido a que su síntesis química es complicada y costosa. El cultivo *in vitro* es una alternativa interesante ya que permitiría un suministro sostenido y uniforme de las drogas de interés. En nuestro laboratorio, hemos obtenido raíces transformadas de *Brugmansia candida* (Solanaceae), planta sudamericana que produce ambos alcaloides, para la obtención de los mismos. Una de las principales limitaciones del cultivo *in vitro* son los bajos rendimientos obtenidos, que impide que se trate de una tecnología competitiva. A fin de incrementar los rendimientos las estrategias recomendables actualmente implican la manipulación del camino biosintético, por lo que es necesario ahondar en su conocimiento. Especial interés se focaliza en la regulación de las distintas rutas biosintéticas en plantas y en particular aquellos pasos que vinculan el metabolismo primario y secundario. La biosíntesis de hiosciamina y escopolamina utiliza como precursor la putrescina (poliamina), y compite por este compuesto con la biosíntesis de las poliaminas espermidina y espermina (metabolismo primario), involucradas en procesos de división y de crecimiento celular. Nuestro objetivo es estudiar el efecto de las giberelinas (AG₃, AG₇, AG₁₃) sobre el metabolismo primario (poliaminas: putrescina, espermidina y espermina) y secundario (alcaloides del tropano) en raíces transformadas de *B. candida* con el fin de conocer la regulación y la relación entre estas vías metabólicas, a fin de diseñar procesos productivos altamente eficientes.

**ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS PARA LA OBTENCIÓN DE
METABOLITOS SECUNDARIOS**

PICT0138

Marconi, P., Radice, S., Giulietti, A. M. y Caso, O.H.

Centro de Ecofisiología Vegetal, Serrano 669, (1414), Bs. As., Argentina y Facultad de Farmacia y Bioquímica de la UBA, Junin 956, (1113), Bs. As., Argentina

La presente colaboración se funda en el objetivo de obtener metabolitos secundarios de interés farmacológico a partir del cultivo de vegetales. Los modelos experimentales son *Berberis buxifolia* y *Ginkgo biloba*. El primero es productor de berberina, un alcaloide isobencilquinolínico suministrado a pacientes HIV. Esta droga parece controlar las infecciones gastrointestinales debido al amplio espectro antimicótico, antimicrobiano y por sus propiedades de antiespasmódico. Los extractos de ginkgo contienen una interesante mezcla de flavonoides glicosilados y derivados terpénicos, también con interés farmacológico. Se emplearán sistemas de cultivo *in vitro* (embriogénesis y organogénesis somática, cultivo de células y callos) para la obtención de plantas selectas de calidad controlada aptas para el cultivo agronómico.

Asimismo, se contemplará la producción *in vitro* de ambos metabolitos. Las ventajas del cultivo *in vitro* son: producción sistemática y regulada según la demanda, cultivo en condiciones controladas y óptimas que garantizan la producción constante en cantidad y calidad del metabolito de interés. En este caso, a fin de obtener la mayor producción se tiene planeado el empleo de estrategias no genéticas y genéticas. Dentro de las primeras centraremos nuestra atención en la diferenciación y elicitación. Para abordar las estrategias genéticas (ing. metabólica) se requiere el conocimiento de las vías metabólicas que conducen a la síntesis de ambos metabolitos.

ESTUDIO SOBRE LA BIOSÍNTESIS Y PRODUCCIÓN DE SOLASODINA

Juliana Parsons, Julián Rodríguez Talou y Ana María Giulietti.

En los últimos años, los avances en el estudio de la bioquímica y de la biología molecular han dado lugar a la caracterización y clonado de gran número de genes involucrados en la biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas. A través de la ingeniería metabólica podemos modular una determinada ruta biosintética, ya sea por la introducción de copias extra del gen deseado, por supresión de genes de las rutas catabólicas, uso de secuencias antisense, etc.. Sin embargo para hacer uso racional de estas herramientas, es necesario conocer las rutas metabólicas que se quieren modificar.

La solasodina es un esteroide sintetizado por Solanaceas, y constituye una fuente alternativa para la producción de drogas esteroideas.

Nosotros planteamos el estudio de la ruta biosintética de la solasodina con el fin de aplicar estrategias de ingeniería metabólica que conduzcan a una mayor producción de este alcaloide. Para ello utilizamos raíces transformadas de *Solanum eleagnifolium*, debido a su alta velocidad de crecimiento, su estabilidad genética, su fácil manipulación y su independencia del agregado de fitohormonas.

El principal objetivo es identificar las enzimas que regulan la síntesis de la solasodina. Para ello se deberá probar si este metabolito es sintetizado a través de la ruta tradicional del mevalonato para terpenos, o a través de la ruta que parte de gliceraldehído fosfato y piruvato descrita recientemente por los grupos de Croteau, Verpoorte y Lichtenthaler y que ocurre dentro de los plástidos. La metodología incluye el uso de elicitación e inhibidores específicos de las enzimas claves en la biosíntesis de los terpenos.

OBTENCIÓN DE ALCALOIDES DEL TROPANO A PARTIR DE CULTIVOS DE RAÍCES TRANSFORMADAS DE *BRUGMANSIA CANDIDA*: EFECTO DE DIFERENTES ELICITORES

Tatiana Spollansky, Sandra Pitta-Alvarez y Ana María Giulietti.

Microbiología Industrial y Biotecnología, Facultad de Farmacia y Bioquímica,

Universidad de Buenos Aires, Junín 956, Buenos Aires (1113), Argentina. E-mail: tspoll@ffyb.uba.ar

Los alcaloides del tropano hiosciamina y escopolamina son agentes anticolinérgicos empleados en medicina que se extraen de plantas de la familia Solanaceae ya que su síntesis química es complicada y costosa.

Con el objetivo de establecer un sistema *in vitro* de obtención de alcaloides del tropano, fueron obtenidas raíces transformadas de *Brugmansia candida* (Solanaceae), mediante la infección de explantos con *Agrobacterium rhizogenes* LBA 9402.

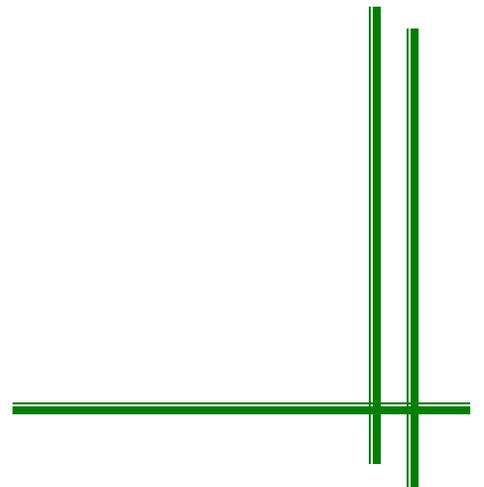
Con el fin de optimizar el sistema, se estudió el efecto de diferentes elicitores (bióticos y abióticos) sobre crecimiento, acumulación de hiosciamina y escopolamina en raíces y liberación al medio de cultivo.

En el proceso de optimización, se consideraron las siguientes variables: edad de los cultivos, concentración de elicitor y tiempo de exposición. Fueron analizados los alcaloides por HPLC en raíces y en medios y la biomasa como peso fresco.

Fueron seleccionados como elicitores *ácido jasmónico* y *tricloruro de aluminio*, ya que fue establecido previamente que tratamientos con jasmonatos exógenos incrementan la productividad de alcaloides en varias especies vegetales. Por otro lado, el Aluminio, metal tóxico del suelo, ha sido descrito como un elicitor que induce up-regulación de genes involucrados en defensa en especies tolerantes a dicho metal.

Sección IV

Transformación Genética



APLICACIÓN DE RECURSOS BIOTECNOLÓGICOS AL MEJORAMIENTO DE LA CEBOLLA
(*Allium cepa* L.)

I. Transformación genética de cebolla (*Allium cepa* L.) en busca de resistencia a patógenos

Director: Curvetto, Néstor

Integrantes: Marinangeli, Pablo; Zappacosta, Diego; Delmastro, Silvia

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y
CERZOS CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina
e-mail: ficurvet@criba.edu.ar

La productividad de la cebolla (*Allium cepa* L.), una de las especies hortícolas más importantes del país en producción y exportación, se ve limitada por varios factores bióticos y abióticos. La falta de resistencia o tolerancia a microorganismos patógenos es un problema que requiere urgente solución y que el mejoramiento tradicional no ha podido resolver.

Este proyecto pretende desarrollar un protocolo que permita la transformación genética estable de cebolla basado en la aplicación combinada de biotécnicas conocidas, con la finalidad última de introducir construcciones génicas que le confieran resistencia o tolerancia a los patógenos de mayor impacto en la producción.

En cultivo *in vitro* se han evaluado distintos explantos de varios cultivares ajustando el medio de cultivo para la inducción de callos y regeneración de vástagos, regeneración directa de vástagos, bulbificación y selección con antibióticos. También se ha ajustado un protocolo de aislamiento de protoplastos. En transformación, se ha obtenido muy buena expresión transiente con transformación mediada por distintas cepas de *Agrobacterium tumefaciens* (Agl1, C58 c1rif pMP90 y EHA 105) en: inflorescencias inmaduras de la variedad Valcatorce INTA; en embriones zigóticos y callos de varios cultivares, entre ellos Valcatorce, Norstar y T412. También se obtuvo muy buena expresión transiente en embriones y meristemas de Valcatorce por medio del cañón génico.

Actualmente se realizan transformaciones periódicas para ajustar algunos parámetros del proceso y se inició el cultivo *in vitro* con medios de selección, según los protocolos propios establecidos, para obtener callos y vástagos transgénicos. Los genes de interés agronómico que se pretende incorporar codifican para proteínas antimicrobianas (AceAMP1 y Chi6) que conferirían resistencia horizontal a los patógenos fúngicos y que han probado ser efectivos "in vitro" y en otras especies.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE CEBADA A TRAVÉS DEL MÉTODO BIOLÍSTICO

Díaz Paleo A.⁽¹⁾, Marrero R.⁽¹⁾, Acevedo A.^(2,3)
IGEAF, CNIA-INTA, 1712 Castelar. ⁽²⁾ IRB, CRN-INTA, 1712 Castelar. ⁽³⁾ Depto. de Ciencia y Tecnología, UNQ, 1876 Bernal.

Durante el desarrollo del proyecto “Biotecnología de la tolerancia a estrés abiótico en cebada (*H. vulgare* L.)” se puso énfasis en distintas actividades relacionadas con la finalización de la puesta a punto de un protocolo de transformación genética de cebada por el método biolístico utilizando el acelerador de microproyectiles PIG (Particle Inflow Gun). El protocolo se basa en el bombardeo de embriones inmaduros del cultivar Golden Promise –genotipo de alta potencialidad de regeneración in vitro- utilizando higromicina B como agente selectivo.

Se intentó asimismo la introducción de la secuencia codificante del gen *Catalasa1* (*Cat1*) de cebada regulado por el promotor constitutivo y primer intrón del gen *Act1* de arroz, presente en el plásmido pBTPaC. La imposibilidad de obtener plantas de cebada transgénicas para dicho gen se atribuye a la escasa expresión del gen seleccionable *hpt* de resistencia a higromicina B en cebada bajo el control del promotor del gen *nos*. Teniendo en cuenta estos resultados, se desarrollaron en nuestro laboratorio nuevas construcciones con la secuencia codificante del gen *Cat1* y las secuencias reguladoras 5' y primeros intrones de los genes *Ubi1* y *Act1* y la secuencia terminadora 3' del gen *rbcS*. Estas secuencias reguladoras garantizan de alta expresión génica en cebada, de acuerdo con ensayos previos de expresión transitoria con el gen marcador *gusA*. Estas nuevas construcciones serán utilizadas en ensayos de transferencia génica en combinación con el plásmido pACh1 (*Act1::hph::35S CaMV*) y pUbar (*Ubi1::bar::nos*).

El objetivo final es investigar la posible protección contra el daño ocasionado por el estrés abiótico en plantas que constitutivamente sobreexpresan *Cat1* de cebada.

BIOTECNOLOGIA PARA EL MEJORAMIENTO DE LA CALIDAD NUTRITIVA EN PASTO LLORON, *Eragrostis curvula* (SCHRAD.) NEES.

DIRECTOR: Dra. Viviana Echenique

e-mail: echeniq@criba.edu.ar

PARTICIPANTES: Lic. Marina Díaz, Lic. Pablo Polci

Dpto. Agronomía (UNS). San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca.

En un plan de mejoramiento pueden considerarse varias estrategias, como el mejoramiento convencional, la mutagénesis y la ingeniería genética. Para ser útil, el potencialmente nuevo cultivar debe ser superior en el carácter clave pero debe también estar adaptado en otros rasgos agronómicos importantes. En el caso de pastos apomícticos, donde hubiere formas sexuales, a menos que ambos progenitores estén relativamente bien adaptados, muchos cientos de híbridos deberían producirse para encontrar uno que fuera aceptable en todas las características importantes.

Para superar esta dificultad sería imprescindible obtener un cultivar apomíctico que reuniera las características deseadas, incorporando un gen capaz de introducir el carácter de interés, con la posibilidad de perpetuar el nuevo genotipo sin segregación ni recombinación.

El objetivo del presente proyecto es mejorar el valor nutritivo del pasto llorón desarrollando una metodología para la regulación negativa de alguna de las enzimas clave involucradas en el metabolismo de la lignina. Para lograrlo, se está trabajando en tres aspectos que son indispensables:

1- Establecer sistemas de cultivo *in vitro*.

2- Establecer condiciones de regeneración de plantas.

3- Poner a punto una metodología de transformación genética utilizando genes informadores y marcadores de selección.

En cuanto al primer punto, se ha logrado la obtención de cultivos celulares embriogénicos para diferentes cultivares de pasto llorón. Se encontró una fuerte influencia del explanto y del genotipo, siendo las inflorescencias el explanto más apropiado, y Kromdraai el cultivar que mejor respuesta posee al cultivo *in vitro*.

En cuanto al segundo punto, se encontró una metodología apropiada para regenerar plantas fértiles a partir de cuatro explantos diferentes y de cuatro cultivares de pasto llorón. En cuanto al tercer punto, si bien los resultados son aún preliminares, podemos considerar que se cuenta con un sistema de transformación transiente por métodos biolísticos utilizando el gen para β -glucuronidasa (*gusA*) como informador, conducido por el promotor de ubiquitina de maíz. Se bombardearon callos embriogénicos de los cultivares Morpa y Kromdraai y se registró el número de eventos de transformación por callo (aproximadamente 500). Se está trabajando en un protocolo de transformación estable, utilizando el gen *hph* conducido por el promotor *Act1*.

DESARROLLO, SUSTENTABILIDAD Y PLANTAS TRANSGÉNICAS

Elibio L. Rech

elbrech@cenargen.embrapa.br

EMBRAPA Recursos Genéticos e Biotecnología

Nuestro planeta posee actualmente una población de aproximadamente 6 mil millones de habitantes, la perspectiva de crecimiento indica que, en torno del próximo año 2030, la población será de alrededor de 13.000 millones de habitantes.

Si bien existe una heterogeneidad intrínseca en el desarrollo de cada país, hay alrededor de 5000 grupos étnicos distribuidos en 190 países. Esto no quizás no haya relevante en años pasados, pero ahora nos impone cuestiones básicas, que no fueron tratadas con la debida importancia en su momento, por numerosos motivos, de acuerdo con el contexto de la época.

Nuestro planeta, está configurado como un sistema finito desde el punto de vista físico y además es un sistema no lineal cerrado, o sea, donde las causas no poseen una proporcionalidad directa con los efectos.

Como consecuencia, las evaluaciones, análisis e interpretaciones de cualquier modificación genética efectuadas en nuestro ecosistema global, poseen características tan complejas, que hoy sería imposible predecir los efectos de carácter absolutos que podrían traer aparejados.

Existen evidencias de que casi la totalidad de nuestra biodiversidad, está concentrada en las regiones de los tropicales y subtropicales. Las selvas tropicales contienen por lo menos la mitad de todas las especies vegetales y animales existentes en nuestro planeta. El valor económico de esta biodiversidad es enorme, tanto en el área agrícola como farmacéutica. Este dato, nos sugiere la necesidad permanente de evaluar las cuestiones asociadas la sustentabilidad y a nuestro crecimiento económico, de forma racional y objetiva, evitando posiciones lineares. En suma, la sustentabilidad y el desarrollo económico, deberían estar en íntima relación con las regulaciones de los diferentes aspectos de la propiedad intelectual. No solamente, en relación con los conceptos formales de la legislación tradicional de la propiedad intelectual que incluyen derechos de los mejoradores, patentes, marcas y a los negocios confidenciales, sino también con una ley más amplia que regule el acceso a la diversidad biológica de los diferentes intereses y posibilite una protección efectiva de la misma.

Como modelo viable del crecimiento económico, la utilización de las llamadas nuevas tecnologías, como la biotecnología y microelectrónica, los nuevos materiales, la automatización y la información deberán formar la base sostenible del desarrollo en nuestro planeta.

Con relación a la biotecnología, especialmente en lo que se refiere a la tecnología del DNA recombinante -también denominada ingeniería genética- los resultados en el área agrícola están mostrando evidencia de que los productos vegetales genéticamente modificados, deberán contribuir en un aumento gradual del 15 a 20 % de nuestra productividad de alimentos en los próximos años.

La demanda por productos de biotecnología agrícola deberá aumentar significativamente con relación a la utilización de plantas transgénicas. Actualmente, los productos están más asociados a la producción de plantas transgénicas conteniendo características que confieren características endógenas, como tolerancia a herbicidas y resistencia a enfermedades, pero la tendencia es que avancen también para la generación de

plantas con características que confieran valores exógenos, como la manipulación en la composición de aceites o su utilización como biorreactores, para que produzcan, por ejemplo anticuerpos contra virus o a otras enfermedades, como el cancer.

Desde la manipulación de los genes en el laboratorio, hasta llegar al mercado, la obtención de una planta transgénica incluye, básicamente, las siguientes etapas: disponibilidad de la característica (del gen), introducción del gen en la planta de interés, obtención del evento (planta transgénica expresando la característica deseada); selección e introducción del nuevo genotipo en

un programa de mejoramiento y el lanzamiento de las semillas al mercado. Paralelamente a este desarrollo se van cumplimentando las etapas que involucran la afirmación de propiedad intelectual y los correspondientes controles de bioseguridad, tanto alimenticia como ambiental.

El costo para la ejecución de esas etapas varía principalmente en función de: el gen, de la planta y del tiempo que haya demandado la obtención del evento, pero puede ser estimado entre los seis y los diez millones de dolares en un tiempo medio de cinco 5 años. Dentro de este contexto y con una visión amplia del sistema productivo, el desarrollo de estas tecnologías pone a las plantas transgénicas como un producto desarrollado por una determinada tecnología.

Las plantas transgénicas están siendo citadas aquí apenas como ejemplo, ya que esas secuencias básicas pueden ser extrapoladas para la generación de otros productos que incluyan, con las adaptaciones necesarias, la utilización de la tecnología del DNA recombinante en otros sistemas.

Por lo tanto, necesitamos discutir no solamente la relación entre estructura y función de genes que transferimos de una especie a otra, con sin la utilización de la ingeniería genética, como también, hacer más eficiente el desarrollo de mecanismos para la utilización racional de nuestra biodiversidad, donde nuestro objetivo general no sea solamente la manipulación de la naturaleza, sino también la determinar y analizar conceptos básicos como las respuestas de los ecosistemas a la introducción de los organismos genéticamente modificados, por ejemplo: modificaciones genéticas que puedan ocurrir o sobre como afectarían los OGMs sobre la evolución de los organismos en nuestro planeta.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.): OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS UTILIZANDO ÁPICES DIVIDIDOS COMO EXPLANTO BLANCO DE *Agrobacterium*

Lewi Dalia ⁽¹⁾, Carrari Fernando ⁽²⁾, Maskin Laura ⁽²⁾, López Nilda y Escandón Alejandro

Instituto de Biotecnología, CICVyA, CNIA, INTA-Castelar

(1) Dirección actual: Instituto de Genética, CICVyA, CNIA, INTA-Castelar.

(2) Dirección actual: Facultad de Ciencias Exactas y Naturales.

El girasol es uno de los cultivos oleaginosos más importantes del mundo luego de la soja, la colza y el maní. En la Argentina se sembraron más de 4.000.000 has y la producción superó las 5.000.000 de toneladas en la campaña 98/99. Este nivel de producción coloca a nuestro país en un primer plano como productor de girasol y de sus derivados. Es de sumo interés contar con una tecnología de transformación genética de esta especie que posibilite la introducción y expresión de genes tanto de importancia agronómica (resistencia a insectos, a enfermedades fúngicas, tolerancia a herbicidas, a estrés hídrico, etc.) o de calidad (modificación en la composición de aceites, en las proteínas de reserva, etc.).

Con el objetivo de desarrollar un protocolo de transformación genética de girasol vía *Agrobacterium tumefaciens* se puso en ejecución, el PIE 80/002 (Proyecto de Interés Estratégico del INTA). En este marco se han ensayado diferentes estrategias de transformación (agroinfección por cocultivo, cañón génico, cultivo líquido), cepas de *Agrobacterium*, diversos genotipos y explantos (con las variantes en el cultivo *in vitro* de tejidos).

Se realizó un relevamiento de la capacidad de regeneración de diferentes genotipos de girasol cultivado y se seleccionaron aquellos de buen potencial morfogénico. Los mejores resultados de transformación se han obtenido exponiendo como blanco de infección por cocultivo a los meristemas preexistentes de embriones maduros. Se estableció un protocolo de regeneración, a partir de estos meristemas que consiste, básicamente, en una secuencia de diferentes relaciones de 6-bencil amino purina (BAP) y ácido giberélico (GA3).

Como agente selectivo se utilizó kanamicina 50 mg/l. Esta concentración del antibiótico permitió el desarrollo de los brotes quiméricos, pero también de escapes, lo que redundó en una disminución de la eficiencia de transformación. Los brotes finalmente recuperados y rusticados fueron injertados sobre pies jóvenes en condiciones de invernáculo.

Se han obtenido resultados positivos en plantas analizadas por PCR y por Southern blot y que expresan el transgén en la reacción histoquímica de β -glucuronidasa.

La eficiencia de transformación, medida como porcentaje de plantas con reacción PCR positiva en relación al número inicial de embriones tratados, varía entre 0.9 y 4.6 en los ensayos de cocultivo con *Agrobacterium* según la estrategia utilizada.

Actualmente se están analizando más familias en la generación T2.

Los resultados obtenidos muestran la incorporación efectiva de los transgenes al genoma de girasol, además de la actividad de los mismos y la factibilidad de obtener plantas de girasol transgénicas y viables por distintos métodos.

**TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE GIRASOL (*Helianthus annuus* L.):
“Estudios preliminares de la respuesta de embriones inmaduros como explanto blanco”**

Tejera, A⁽¹⁾, López, N. y Escandón, A.

Instituto de Biotecnología CICVyA. CNIA –INTA.

(1) Dirección actual: Universidad Nacional de Quilmes

La transformación genética de plantas ha realizado un importante progreso y lo que era una perspectiva promisoriosa a fines de los '80, es en estos momentos una realidad tangible con cultivos transgénicos ya liberados al medio como algodón, soja, maíz, papa, tomate y otros siguiendo, en breve, el mismo camino. En este contexto, en la Argentina, el girasol se encuentra en el grupo de cultivos a punto de ser liberados, con numerosas pruebas a campo efectuadas. A mediados de los '80 se produjeron las primeras plantas transgénicas de *Nicotiana tabacum* a partir de protoplastos transformados via *Agrobacterium tumefaciens*. A partir de los ensayos pioneros de Everett et al (1987) se han logrado importantes avances en la obtención de plantas transgénicas de girasol. De hecho en diferentes laboratorios del mundo se ha logrado este objetivo y el protocolo se ha convertido en rutina. Pero, a pesar de los progresos alcanzados, los protocolos de transformación que se aplican de girasol han mostrado ser muy poco eficientes, siendo su principal inconveniente el alto número de escapes que se registran. El alto porcentaje de plantas quimeras que se recuperan y la floración precoz acotan, en forma sustancial, la capacidad de selección “in vitro” de los protocolos, ya que no se puede aplicar una fuerte presión de selección sin riesgo de perder quimeras interesantes, además de no poder (debido a la floración precoz) prolongar durante largos períodos la etapa “in vitro”, esto tiene como consecuencia la obtención de un alto número de falsos positivos. La hipótesis del presente proyecto es que la utilización de embriones de girasol inmaduros como explanto blanco de la transformación. Una vez inducido y establecido el cultivo de callo, se subcultivarán porciones de callo ya sea sobre diferentes a fin de lograr la regeneración de plantas completas. Paralelamente a los ensayos de regeneración se determinará la sensibilidad de los callos cultivados a herbicidas y a otros fitotóxicos por medio de curvas dosis respuesta que permitan establecer la concentración adecuada de fitotóxico a aplicar en un sistema de selección del material transgénico. En lo que transformación se refiere se ensayarán adaptaciones de los diferentes protocolo de transformación ya probados en nuestro laboratorio, esto es: biobalística, *Agrobacterium* y la combinación de ambas alternativas.

IDENTIFICACION DE LINEAS DE MAIZ DE TIPO FLINT PARA LA REGENERACION
Y TRANSFORMACION GENETICA

Lewi, Dalia M.; Turica, M.; Allocati, J.P.; Salerno, J. C. y Franzone, P.
Instituto de Genética, CICVyA, CNIA INTA-Castelar.

El maíz duro argentino tipo flint o maíz "Plata" es apreciado en el mercado internacional debido entre otros factores a que posee un endosperma de mayor dureza que los maíces dentados. La industria de alimentos balanceados demanda para la actividad avícola, granos de este tipo debido a su dureza y alta proporción de pigmentos, sustancias esenciales en la alimentación avícola.

Es de interés obtener un protocolo de transformación de maíz tipo flint que permita obtener plantas que expresen genes para mejorar características como la calidad del grano o la resistencia a enfermedades (Mal de Río Cuarto).

Los protocolos de transformación de maíz utilizan en su mayoría el cañón génico y son de carácter genotipo-dependiente. En el caso de los maíces flint no se ha reportado aún un sistema de transformación.

En el Instituto de Genética, se han desarrollado líneas de maíz flint que poseen sistemas de genes letales balanceados las cuales están siendo estudiadas por sus respuestas a la regeneración y transformación.

La metodología utilizada aborda dos sistemas de transformación: la aceleración de partículas (cañón génico) sobre embriones inmaduros y el cocultivo de meristemas con *Agrobacterium*.

En el caso de los embriones inmaduros, se han ensayado tres líneas y un híbrido, y se han cuantificado los puntos azules observados como expresión estable en la reacción histoquímica de GUS. Se están llevando a cabo ensayos para ajustar las condiciones de regeneración en medio selectivo (higromicina) y de rustificación (pasaje a macetas en invernáculo).

Con respecto a la transformación mediada por *Agrobacterium*, se han tratado explantos extraídos de plántulas de entre 3 y 6 días de germinación. En estos ensayos se han observado reacciones de GUS positivas en tejidos de hojas, nervaduras y zonas próximas a la meristemática. Estos resultados, de tipo preliminar estarían indicando la posibilidad de transformar con *Agrobacterium* a células de tejidos provenientes de estas líneas de maíz, lo que resulta promisorio por tratarse de una monocotiledónea y de genotipos no usados como modelos en la bibliografía.

EXPRESIÓN DE PÉPTIDOS ANTIMICROBIANOS DE ANFIBIOS EN PLANTAS DE PAPA

Luppi, J.P., Barzola, K., Mentaberry, A.N.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular (INGEBI-CONICET-UBA)

La piel de los batracios es una fuente interesante de compuestos farmacológicamente activos, entre los que se cuentan numerosos péptidos antifúngicos y antibacterianos. Se conoce la estructura primaria de unos 20 péptidos de este tipo, los cuales ejercerían su acción perturbando las funciones normales de la membrana celular. Entre ellos, los péptidos dermaseptina, y magainina2 han resultado particularmente activos contra distintas especies fúngicas y bacterianas. El interés principal del presente proyecto es utilizar a la papa (*Solanum tuberosum*) como modelo para probar los efectos de estos péptidos, expresados en la forma de proteínas de fusión con la enzima glucanasa β 1-3, esperando obtener plantas con mayor resistencia a patógenos fúngicos y bacterianos. Para llegar a obtener la proteína de fusión, se ha procedido a realizar mutagénesis silente del gen de la glucanasa, y se han sintetizado las secuencias codificantes para los péptidos magainina y dermaseptina a partir de oligonucleótidos de cadena simple. La estrategia incluye la remoción opcional de los péptidos de tránsito intracelular de la glucanasa, de manera de obtener proteínas recombinantes que sean direccionadas al espacio vacuolar o al apoplástico. El efecto de estos transgenes se analizará en un marco genético silvestre o en plantas previamente transformadas con los genes que codifican la proteína inhibidora de ribosomas (RIP), la enzima quitinasa, -ambas provenientes de cebada-, o AP24, una proteína tipo osmotina proveniente de tabaco, con cuyos genes combinados de a pares se han transformado plantas de papa variedad Spunta, disponiéndose actualmente de más de 20 líneas transgénicas en distinto estado de caracterización. Por otra parte se está poniendo a punto un ensayo en placas de ELISA con el cual se podrá determinar la eficacia de los péptidos por separado o de la proteína de fusión, frente a distintos patógenos vegetales de origen bacteriano.

RESISTENCIA A PATÓGENOS EN TRIGO TRANSGÉNICO

Reggiardo, M.I., Permingeat, H.R., Detarsio, E., Guelman, S., López, M.E., Lustig, S., Romagnoli, M.V., Romo, C.L. y Vallejos, R.H.

Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI), Suipacha 531, 2000 Rosario, Argentina.

Fusarium graminearum es el agente causal del golpe blanco o fusariosis, una de las enfermedades más importantes que afectan el trigo cultivado. Las fuentes de resistencia genética son estrechas y en muchos casos de uso restrictivo. Sin embargo, la ingeniería genética permite la introducción de genes de resistencia como aquellos que codifican para proteínas relacionadas con la patogénesis (PR) de otras plantas, los que mostraron proteger a las plantas transgénicas contra patógenos fúngicos.

En el laboratorio hemos desarrollado un método eficiente para la transformación estable de trigo. Se realizaron experimentos de cotransformación que involucraron la introducción de genes reporteros y marcadores de selección en combinación con genes PR que codifican para glucanasas y/o quitinasas, con el objetivo de aumentar la tolerancia de trigos argentinos contra el golpe blanco y otras enfermedades fúngicas. Las plantas transgénicas regeneradas del cultivo in vitro se identificaron por PCR y dot blot. La presencia de los genes mencionados se confirmó por hibridación Southern.

Varios eventos transgénicos conteniendo hasta 4 transgenes se seleccionaron para estudiar la expresión de los mismos. La expresión de los genes marcadores de selección y reportero se confirmó por ensayos de toques con herbicida e histoquímica, respectivamente. La expresión de los genes de glucanasas y quitinasas se determinó por hibridación Northern, actividad enzimática y Western blot.

Los transgenes fueron transmitidos a la progenie siguiendo las proporciones mendelianas para genes simples dominantes. Líneas transgénicas homocigotas de la tercera generación están siendo analizadas respecto de la resistencia a la infección de patógenos. Ensayos in vitro preliminares sugieren que algunas de las plantas transgénicas muestran un aumento de la tolerancia a la infección fúngica.

OBTENCIÓN DE PLANTAS TRANSGÉNICAS DE CÍTRICOS EXPRESANDO GENES DE RESISTENCIA A CANCROSIS (*Xanthomonas axonopodis* pv *citri*)

(PROYECTO DE INVESTIGACION Y DESARROLLO CON ADOPTANTE PID-98 – FONCyT - Aprobado)

INTA – INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA
EEA-INTA Bella Vista (Ctes.). Laboratorio de Cultivo de Tejidos.

Héctor Miguel Zubrzycki; Alicia Diamante; Carlos Vera Bravo.

INSTITUTO DE BIOTECNOLOGÍA de INTA Castelar (Bs. As.)

Alejandro Escandón;

DIVISIÓN DE BIOLOGÍA MOLECULAR - PROMUBIE Facultad de Ciencia Bioquímicas y Farmacéuticas - UNR

Néstor Carrillo; María Rosa Marano; Jorgelina Ottado

FEDERACIÓN DEL CÍTRUS DE ENTRE RÍOS - FeCIEr (ADOPTANTES)

Resumen del proyecto

La Cancrosis de los cítricos presente en la región NEA, es causada por *Xanthomonas axonopodis* pv *citri*. La bacteria daña frutas y hojas de las variedades cítricas cultivadas, afectando la productividad de las plantaciones y el comercio de frutas en el mercado interno y externo. La enfermedad se controla con aplicaciones de agroquímicos (cúpricos) y otras prácticas culturales que incrementan costos de producción. La UE, destinataria del 90% de las exportaciones cítricas de Argentina, impuso barreras fitosanitarias a regiones con Cancrosis, dificultando o impidiendo la comercialización de frutas.

Los cítricos son plantas perennes, poliembriónicas y con elevada heterocigosis, lo que dificulta el mejoramiento genético por métodos convencionales. La aplicación de biotécnicas como la transformación de plantas para la obtención de variedades cítricas resistentes, sería el método más efectivo y económico para controlar la enfermedad. En cítricos se demostró la factibilidad de transformar y regenerar plantas con *Agrobacterium tumefaciens*, pero no la incorporación de genes de resistencia a Cancrosis. Con el fin de obtener plantas cítricas resistentes a Cancrosis se elabora éste proyecto cuyo objeto es lograr la metodología para obtener plantas transgénicas e identificar genes en especies cítricas que intervienen en la resistencia a la enfermedad y su incorporación a variedades de interés comercial.

TRANSFORMACIÓN GENÉTICA DE ALFALFA (*MEDICAGO SATIVA* L)

Rios, R.D.; Ardila, F.; Gómez, M.C.; Ferri, A.M.; Ciancio J.R.; Bonafede M.; Franzone P.M.

Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF), CICV y A, CNIA, INTA
CC 25 -(1712) Castelar, Argentina

En alfalfa, si bien hasta el presente varios laboratorios lograron obtener plantas transgénicas, la técnica no constituye una rutina. En el IGEAF se desarrolla una línea de investigación que tiene por finalidad la utilización de la transformación genética para el mejoramiento genético de esta especie. Por esta razón se realizan investigaciones tendientes a establecer protocolos eficientes y reproducibles para la transformación genética de genotipos locales de alfalfa, utilizando *Agrobacterium tumefaciens* como vector de transformación, así como bombardeo con microproyectiles. En esta comunicación se presenta el estado actual de desarrollo de metodología de transformación así como su utilización en estudios básicos y aplicados. Así, se mostrará el grado de avance en los temas siguientes:

- a) Aspectos básicos de la metodología de transformación genética.
- b) Resistencia a insectos lepidópteros.
- c) Manipulación de la biosíntesis de taninos por ingeniería genética para la obtención de alfalfa no productora de meteorismo.

EXPRESIÓN TRANSGÉNICA DE ISOCORISMATO SINTASA DE *Catharanthus roseus* EN CÉLULAS EN SUSPENSIÓN DE *Morinda citrifolia* Y *Rubia tinctorum*.

J. Rodríguez Talou^{1, 2}, M. Verberne², B. Gonsalvez-Bernal², H. Linthorst³, J. Bol³ y R. Verpoorte²

¹Biotecnología, Fac. Farmacia y Bioquímica, Univ. Buenos Aires, Junin 956 1113 Buenos Aires, Argentina, ² Division of Pharmacognosy, LACDR, ³ Institute of Molecular Plant Science, Leiden University, Gorlaeus Laboratories, P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden.

Las antraquinonas (AQs) son metabolitos secundarios y el grupo mas grande de quinonas naturales. Debido a sus características como ser resistencia a la luz y al calor poseen un importante potencial para su uso en la industria alimenticia, además de mostrar actividades antifúngicas y antimicrobianas (1).

La enzima isocorismato sintasa (ICS) es la primer enzima de la ruta metabólica que conduce a la síntesis de las antraquinonas (AQs.) a partir del ácido corísmico, conectando metabolismo primario y secundario. ICS ha sido caracterizada y clonada a partir de cultivos en suspensión de *Catharanthus roseus* (2). Con el objetivo de estudiar el efecto de la sobreexpresión de ICS en la biosíntesis de las AQs, el cDNA correspondiente ha sido clonado en un vector de expresión bajo el control del promotor 35S del CaMV para su expresión en plantas tanto en orientación sense como en antisense.

La transformación se realizó directamente sobre las suspensiones celulares a través de la infección con *Agrobacterium tumefaciens*, de esta manera se obtuvo una población de células transformadas heterogénea en términos de número de inserciones y localización cromosómica. Las suspensiones celulares *Rubia* mostraron una baja eficiencia de transformación (después del ensayo de GUS) seguido de un oscurecimiento de los cultivos (darkening) después de tres días de cocultivación con *Agrobacterium*. Con suspensiones celulares de *M. citrifolia* se establecieron seis líneas transgénicas, dos de ellas expresando el gen de la ICS en orientación sense (S 1 y 2), dos expresando ICS en antisense (AS 1 y 2) y dos transformadas con el vector sin ningún inserto (VO 9 y 10). La actividad de ICS y el contenido de AQs se analizaron en todas las líneas transgénicas obtenidas.

OBTENCIÓN DE PAPA TRANSGÉNICA RESISTENTE A MÚLTIPLES PATÓGENOS

C. Vázquez-Rovere, S. Asurmendi, V. Romero, A. Dengis, H.E. Hopp.

Instituto de Biotecnología, CICV- INTA Castelar.

El objetivo de este proyecto es introducir genes que confieran resistencia a patógenos fúngicos y virales en un cultivar de papa de interés comercial para la región (Kennebec), para incrementar el rendimiento económico por disminución de la incidencia de enfermedades y a la vez disminuir el impacto ambiental producido por el uso de agentes químicos como fungicidas y acaricidas. Para ello se ha empleado la estrategia de transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para obtener expresión simultánea de varios transgenes. En este trabajo se decidió utilizar genes con probada capacidad de conferir resistencia a hongos por su interacción sinérgica en la planta. Estos son, dos genes que codifican para enzimas capaces de degradar la pared de los hongos: un gen de quitinasa (CHI) de *Hordeum vulgare* y una β -1,3 glucanasa (GLU) de tabaco, y otros dos genes con capacidad inhibitoria de patógenos: el gen AP24 derivado de tabaco, una proteína similar a la taumatina capaz de alterar la permeabilidad de la pared celular de ciertos microorganismos y un gen que codifica para una proteína inhibitoria de ribosomas (RIP), proveniente de *Hordeum vulgare*, que solo es funcional ante ribosomas de microorganismos. Para conferir resistencia a virus se ha utilizado el gen de la proteína de cápside del virus del mosaico de lechuga (cpLMV) que confiere resistencia heteróloga al virus Y de la papa (PVY) y el gen de la replicasa del virus del enrollamiento de la hoja de la papa (rPLRV). En el laboratorio se han generado varias construcciones que contienen combinaciones de dos genes, bajo el control del promotor 35S del CaMV, las que han sido clonadas en vectores binarios pZP200 con los cuales se ha transformado la cepa LBA 4404 de *A. Tumefaciens*, utilizando diferentes marcadores de selección, para lo cual hemos optimizado el uso de kanamicina como agente selectivo primario e higromicina y fosfotricina como agentes selectivos secundarios para ensayos de co-transformación. Hasta el momento se han obtenido 155 plantas cpLMV-rPLRV, 108 plantas RIP-CHI, 32 plantas AP24-GLU, 10 plantas cpLMVrPLRV/RIP-CHI, y 2 plantas RIP-Chi/AP24-GLU. Las plantas obtenidas se están evaluando a nivel molecular (PCR) para confirmar la presencia de los transgenes. Posteriormente se evaluará el nivel de expresión de las proteínas antifúngicas para seleccionar las líneas más adecuadas, y se realizarán ensayos biológicos de resistencia frente a patógenos.

Este trabajo forma parte de un proyecto de la UE en el cual están involucrados laboratorios de varios países de Latinoamérica y Europa, cuyo objetivo final es la obtención de líneas transgénicas que retengan las características de interés comercial y agronómico y a su vez presenten un alto nivel de resistencia a múltiples patógenos.

PRODUCCIÓN DEL FACTOR DE CRECIMIENTO EPIDÉRMICO HUMANO (hEGF) EN PLANTAS TRANSGÉNICAS DE TABACO

Wirth, S.; Cabral, S.; Mentaberry, A.N. y Bravo Almonacid, F.

Instituto de Investigaciones en Ingeniería Genética y Biología Molecular.
INGEBI - UBA - CONICET. Obligado 2490 Buenos Aires.

La expresión de genes heterólogos en procariotas ha conducido en muchos casos a la producción y comercialización de proteínas recombinantes de uso industrial y farmacológico. Sin embargo la falta de las enzimas responsables de plegar correctamente un polipéptido e incorporar las modificaciones postraduccionales usuales en eucariotas, hechos que pueden restringir altamente su utilidad, han limitado el uso de estos sistemas y dirigido la investigación al uso de sistemas animales o vegetales.

Aunque existen diversos ejemplos de expresión de proteínas heterólogas en plantas, principalmente con fines agronómicos, el intento de utilizarlas como biorreactores es aún un campo en desarrollo. En este contexto, y utilizando como modelo la producción del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF), hemos transformado discos de *Nicotiana tabacum* var. Xanthi D8 con cuatro construcciones distintas. Dos de ellas, a las que llamaremos versiones citoplasmáticas, llevan el gen de hEGF bajo el control de un promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) en un caso y del promotor 35S duplicado, además de una secuencia enhancer traduccional () del virus del mosaico del tabaco (TMV), en el otro. Las otras dos construcciones permitirán analizar si existe alguna ventaja en enviar la proteína producida al espacio extracelular o apoplasto. A tal fin se fusionó, en marco de lectura la señal de tránsito a retículo endoplasmático del gen de la osmotina de tabaco al gen de hEGF. Al igual que en las versiones citoplasmáticas, las apoplásticas difieren entre sí en que una lleva el promotor 35S del CaMV y la otra el 35S duplicado y la secuencia del TMV.

Hasta la fecha, se han obtenido regenerantes de cada construcción y se está evaluando su carácter transgénico por ensayos de PCR y actividad de neomicina fosfotransferasa (marcador de selección utilizado), así como el nivel de hEGF producido en cada caso, lo que permitirá hacer un análisis estadístico a fin de comparar la efectividad de cada construcción.

UTILIZACIÓN DE GFP COMO MARCADOR DE EXPRESIÓN TRANSITORIA EN DISCOS BASALES DE AJO

Pablo ZALTZ, Silvia CABRAL y Alejandro N. MENTABERRY.

INGEBI-CONICET. Vuelta de Obligado 2490. 1428 Buenos Aires. amenta@dna.uba.ar

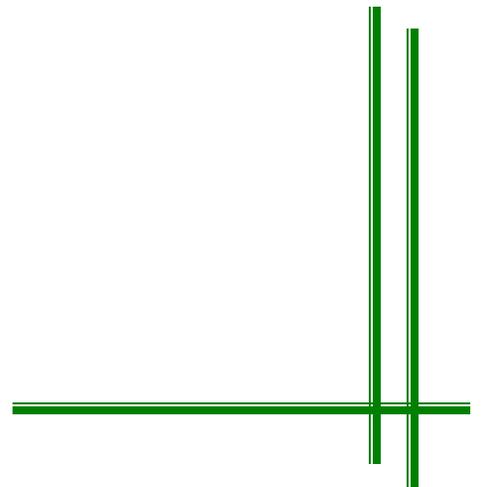
La transformación genética del ajo es una importante herramienta en el mejoramiento agronómico de la especie. Debido a la ausencia de floración en la mayoría de las variedades de ajo, el mejoramiento clásico no es posible. La introducción de genes mediante técnicas de ingeniería genética permitiría superar esta limitación. En el caso del ajo, se conoce el modo de regenerar una planta entera a partir de callos, meristemas y discos basales, entre otros explantos.

El proceso de transformación requiere contar con un gen marcador capaz de reportar la expresión transitoria del DNA introducido. Debido a la elevada actividad endógena beta-glucuronidasa presente en la mayoría de los tejidos de ajo, no es posible utilizar al gen uidA, que codifica para la enzima beta-glucuronidasa de *E. coli* (GUS) como marcador. Con el fin de encontrar un gen reportero adecuado se introdujo mediante bombardeo con micropartículas, el gen que codifica la proteína verde fluorescente de *Aequorea victoria* (GFP) en discos basales de ajo.

Se aislaron discos basales de bulbillos de ajo variedad "colorado". Una parte de éstos fueron bombardeados con partículas recubiertas con el plásmido pGEMGUS (35S::uidA) (control negativo); otra parte fueron bombardeados con el plásmido pBSGFP5 (35S::gfp5). Se evaluó la expresión de GFP a las 24, 48 y 72 horas observando los explantos bajo el microscopio de epifluorescencia. Los componentes de la pared celular presentan una elevada fluorescencia que en muchos casos pueden dificultar la observación de otras estructuras fluorescentes. En los explantos bombardeados con pGEMGUS se observaron estructuras que presentaban fluorescencia amarilla, la cual se atribuye a las autofluorescencia antes descrita. A pesar de esto, entre las 24 y 48 horas, en los discos bombardeados con pBSGFP, se observó fluorescencia verde en el interior de varias células, la cual se mantiene a las 72 horas. Esto nos permite concluir que GFP es un marcador adecuado para evaluar la expresión transitoria en discos basales de ajo, como parte del procedimiento para generar plantas transgénicas de ajo.

Sección V

Biología Molecular



SILENCIAMIENTO DE LOS GENES ENDOGENOS DE LAS SUBUNIDADES DE GLUTENINAS DE ALTO PESO MOLECULAR INDUCIDO POR LA INTRODUCCIÓN DE TRANSGENES HOMÓLOGOS EN TRIGO

M.L. Alvarez¹; S. Guelman¹; N. Halford²; S. Lustig¹; M.I. Reggiardo¹; N. Ryabushkina¹; P. Shewry²; J. Stein¹; R.H. Vallejos¹

¹Centro de Estudios Fotosintéticos y Bioquímicos (CEFOBI). Suipacha 531, (2000) Rosario, Argentina. (cefobi@arnet.com.ar)

²Department of Agricultural Sciences, University of Bristol, AFRC Institute of Arable Crops Research, Long Ashton Research Station, Long Ashton, Bristol, BF18 9AF, U.K.

Las diferencias observadas entre la calidad panadera de distintos cultivares de trigo se hallan estrechamente correlacionadas con variaciones alélicas en el número y/o estructura y propiedades de las subunidades de gluteninas de alto peso molecular (APM), una familia de proteínas sintetizadas en el endosperma en desarrollo. Con el objeto de mejorar la calidad panadera, las subunidades de gluteninas de APM 1Ax1 y 1Dx5, asociadas con buena calidad panadera, fueron introducidas por biolística y expresadas o sobreexpresadas en variedades comerciales de trigos argentinos que ya expresaban 5 subunidades.

Se analizaron 6 eventos transgénicos, tres de los cuales resultaron en un silenciamiento parcial o completo de genes endógenos. En dos de estos eventos, la introducción en un bajo número de copias y la expresión del gen 1Ax1 fue asociada con una completa inactivación de su gen alélico 1Ax2*, pero sólo cuando el transgén fue homocigota, sugiriendo un efecto de dosis del transgén. En el tercer evento, se observó un silenciamiento de todas las subunidades de glutenina de APM endógenas, junto con la expresión del gen 1Ax1 y la sobreexpresión del 1Dx5. En este caso el silenciamiento fue asociado con alto número de copias y múltiples sitios de inserción de los transgenes.

Los transgenes y su patrón de expresión fueron establemente transmitidos a la progenie en todos los eventos, menos en uno, en el cual, el silenciamiento de todas las subunidades de gluteninas endógenas se revirtió debido a una drástica pérdida de número de copias de los transgenes. Este fenómeno confirma el hecho de que la integración de un alto número de copias aumenta la eficiencia de silenciamiento.

Un aspecto común de muchos casos de silenciamiento inducido por transgenes es la presencia de homología entre las secuencias de los mismos y los genes endógenos. El silenciamiento observado podría estar operando tanto a nivel transcripcional como postranscripcional ya que los transgenes introducidos tiene homología con la región promotora y codificante de algunos de los genes silenciados.

CLONADO Y EXPRESIÓN DE UN GEN DE SORGO INVOLUCRADO EN LA RESISTENCIA AL BROTADO PRE COSECHA.

F. Carrari, L. Perez-Flores, D. Lijavetzky, R. Benech-Arnold y N. Iusem.

LFBM, FCE y N Universidad de Buenos Aires. Argentina.

El brotado pre-cosecha (BPC) es una de las causas de pérdidas de cosecha en los cereales. En sorgo granífero, este problema se encuentra asociado a la falta de dormición de las semillas durante su desarrollo, lo cual está determinado genéticamente. Trabajos recientes han demostrado que la falta de dormición de semillas de genotipos susceptibles al BPC se encuentra asociada a una baja sensibilidad de los embriones al ácido abscísico (ABA). Por otro lado, plantas de maíz mutantes para el gen *vp1* presentan este mismo fenotipo.

En este trabajo, utilizando oligonucleótidos heterólogos clonamos el gen de sorgo homeólogo a *vp1* de maíz, determinamos la secuencia genómica y analizamos la expresión durante la ontogenia de los embriones y germinación de las semillas.

El análisis de la expresión durante la ontogenia mostró un patrón diferencial entre el genotipo resistente y el susceptible al BPC. Mientras que la cantidad de mRNA cae durante el desarrollo de los embriones susceptibles, en el genotipo resistente el pico de expresión de *Sbvp1* (*Sorghum bicolor vp1*) se encuentra a los 30 días después de la floración, momento en el cual se observan la mayores diferencias de germinación entre ambos genotipos. Por otro lado, durante la germinación de las semillas, los niveles de *Sbvp1* caen rápidamente después que las semillas son embebidas; sin embargo la tasa de caída de dichos niveles resulta mayor en los genotipos susceptibles al BPC.

Estos resultados apoyan la hipótesis de la participación de este gen en el control de la resistencia al BPC en sorgo granífero.

SEMILLAS DE GIRASOL: FUENTE DE PÉPTIDOS ACTIVOS CONTRA HONGOS PATÓGENOS DE PLANTAS

Regente, M., Espinosa Vidal, E., de la Canal L.

Instituto de Investigaciones Biológicas – UNMdP – C.C. 1245 – 7600 – Mar del Plata – E-mail: ldelacan@mdp.edu.ar

Este proyecto encaró el aislamiento de péptidos antifúngicos analizando extractos de semilla de girasol por su capacidad de inhibir la germinación de esporas fúngicas.

Uno de los péptidos aislados, PA10 (10 kDa), pertenece a la familia de las “lipid transfer proteins” (LTPs), conocidas por su capacidad de transferir lípidos entre membranas *in vitro* y por su actividad antimicrobiana. PA10 actúa sobre *Fusarium solani* como agente fungistático, produciendo una reducción del 50% del crecimiento en una concentración de 6.5 µg/ml, valor comparable a los descriptos para las LTPs más potentes. En cuanto a su modo de acción, se determinó que PA10 se une a las esporas fúngicas e interacciona con membranas para ejercer su actividad. Además, se detectó su presencia en el fluido extracelular de la semilla, localización compatible con la limitación del ataque fúngico.

Otra proteína aislada e identificada, PA15 (15 kDa), pertenece a la familia de las 2S albúminas, proteínas de reserva cuya actividad antifúngica se ha descrito para algunas especies. PA15 es activa contra *Sclerotinia sclerotiorum* en concentraciones superiores a 100 µg/ml, sugiriendo una baja potencia antifúngica. Sin embargo, su participación en la defensa no debe ser descartada por su alta abundancia relativa en semillas de girasol y por su potencial sinergismo con otro tipo de proteínas antifúngicas, como se ha descrito para las 2S albúminas de la familia *Brassicaceae*.

Estudios futuros tenderán a completar la caracterización y clonado de las proteínas aisladas, como así también identificar y caracterizar otras proteínas antifúngicas detectadas en semillas de girasol, que podrían constituir en forma conjunta una barrera de protección contra patógenos microbianos.

EL CLOROPLASTO COMO BLANCO DE LA BIOTECNOLOGÍA

Diéguez, María José; Colombo, Noemí; Arias, M. del Carmen; Saione, Héctor; Manghers, Luis; Ríos, Raúl y Prina, Alberto

Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF) CYCVyA-CNIA-INTA

El cloroplasto, además de dar base estructural a la fotosíntesis, es portador de genes involucrados en la regulación de caracteres de gran interés agronómico-comercial como la tolerancia a herbicidas y la eficiencia fotosintética. La genética cloroplástica es altamente conservativa y la mutagénesis preferencial del genoma cloroplástico ha sido habitualmente poco exitosa. Sin embargo, se ha descrito en cebada un gen mutador de cloroplastos *Cpm/cpm* que permite generar en forma simple y eficiente variabilidad genética en el plastoma sin afectar el núcleo y las mitocondrias. Inicialmente se observó que este gen nuclear, al estado homocigota recesivo, produce un amplio espectro de deficiencias clorofílicas de herencia materna cuya expresión, una vez inducida, es independiente de la constitución nuclear. Además, a partir de este genotipo mutador se aislaron dos mutantes de cebada con tolerancia al herbicida atrazina que presentaron una mutación de punto en el gen cloroplástico *psbA*, responsable de la tolerancia a este herbicida en otras especies.

El aislamiento molecular del gen *Cpm/cpm*, permitiría su uso en una estrategia antisentido en otras especies de importancia agronómica con el fin de generar variabilidad genética en los cloroplastos de las mismas y así obtener alelos de utilidad agronómica (resistencia a herbicidas, tolerancia a estrés abiótico, etc.). A su vez, el genoma cloroplástico se presenta actualmente como un blanco clave para la transformación genética pues presenta numerosas ventajas con respecto a la integración de transgenes en el genoma nuclear (niveles de expresión, no existe silenciamiento, bioseguridad, reemplazo génico, transcritos policistrónicos, etc.). La caracterización de los efectos del mutador sobre el ADN del cloroplasto de líneas selectas, algunas de las cuales poseen expresión termosensible, temporal, tejido-específica o de alta frecuencia de reversión haría disponibles herramientas potencialmente útiles para el desarrollo de las construcciones necesarias (vectores y señales regulatorias). Por otro lado, también se están seleccionando mutantes con tolerancia a salinidad, temperatura y diversos herbicidas.

SONDAS MOLECULARES PARA VIROIDES EN CITRICOS

M.I. Plata¹, N.B. Costa¹, L. Semorile² y N. Durán-Vila³

¹Estación Experimental Agropecuaria Concordia, INTA, Concordia, E. R. ,
Email:plata@concordia.com.ar ²Universidad Nacional de Quilmes, ³Instituto Valenciano de
Investigaciones Agrarias (IVIA), Valencia, España

Las enfermedades causadas por viroides en el cultivo de los cítricos (exocortis y cachexia) causan daños económicos importantes y se difunden fácilmente a través de material de propagación (injerto de yemas) y mecánicamente (por medio de herramientas). Este proyecto nos permitirá poner a punto un método de diagnóstico más sensible y rápido (3 meses) que el actualmente en uso (con plantas indicadoras) que es lento (1 ó 2 años según el viroide a diagnosticar, poco sensible (no manifiesta todos los viroides presentes) y errático (muchas veces el indicador biológico no manifiesta el viroide que se está analizando). Esta puesta a punto se realizará a través de:

- i- Determinar los viroides que se encuentran en las plantas madres, proveedoras del material de propagación
- ii- Relacionar los viroides con los síntomas en el indicador biológico (cidra Etrog)
- iii- Caracterización molecular de los viroides encontrados
- iv- Obtención de sondas moleculares específicas

Esta metodología (hibridación de impresiones) está recomendada para los programas de certificación de Plantas Madres Cítricas "libres de enfermedades", e.g. España.

Este proyecto ha sido presentado al Fondo de la Comisión Mixta de la Cooperación Hispano-Argentina para su aprobación.

USO DE TECNICAS DE BIOTECNOLOGIA EN EL SANEAMIENTO Y CERTIFICACION DE CITRICOS EN ARGENTINA

M.I. Plata, N.B. Costa y C.M. Anderson

Estación Experimental Agropecuaria Concordia, Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria,
C.C. 34, 3200 Concordia, Entre Ríos, Email:plata@concordia.com.ar

PROCITRUS, el programa de mejora genética y sanitaria de material cítrico de Argentina, tiene como objetivo principal proveer a los viveristas con clones selectos libres de enfermedades para la producción comercial de plantas de vivero en todo el país. El material introducido al Programa es sometido a microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para la obtención de plantas libres de patógenos. Se utilizan diversos métodos de detección de patógenos basados en la serología [Inmunoimpresión-ELISA para el virus de la tristeza de los cítricos (CTV), ELISA-DAS para *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (cancrosis) y *Xylella fastidiosa* (clorosis variegada de los cítricos)] y en técnicas moleculares para el análisis de ácidos nucleicos (hibridación de impresiones para exocortis y cachexia-xiloporosis), las cuales se están poniendo a punto en el Laboratorio de Protección Vegetal y Biotecnología de la EEA Concordia. Estas nuevas técnicas tienen varias ventajas sobre el uso de plantines indicadores: sencillez, rapidez, y especificidad lo que permite procesar un mayor número de muestras en menor tiempo con resultados altamente confiables. En el caso de las técnicas mencionadas el tiempo de diagnóstico se reduce a 3 meses. Con estos avances se puede acortar considerablemente el período total que lleva liberar un cultivar para estar disponible para su propagación. Actualmente este Programa tiene 102 cultivares “libres de enfermedades”.

PROYECTO: PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EN LA SUPERFICIE DEL VIRUS X DE LA PAPA

F. Verna¹, G. Calamante²⁻³, C. Tami², O. Taboga², F. Bigi², K. Kobayashi¹, A. Cataldi² y A. Mentaberry¹⁻³

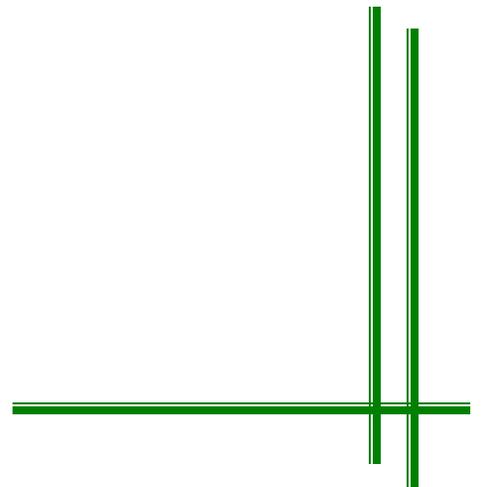
(¹) INGEBI-CONICET, Bs. As. (²) Inst. de Biotecnología, CICVyA-INTA, Castelar, Bs. As., (³) FCEyN-UBA

La utilización de los virus vegetales como presentadores de epitopes de virus animales y humanos posee un gran potencial para el desarrollo de vacunas efectivas, económicas y seguras. El objetivo de nuestro proyecto es la obtención de virus X de la papa (PVX) quimérico que exprese en su superficie antígenos derivados del virus de la fiebre aftosa (VFA). En una colaboración INGEBI-INTA se ha diseñado un sistema de presentación de antígenos foráneos en la superficie de PVX, con el que se ha construido el virus quimérico PVX-2a-sitioA. Este virus presenta en su superficie el sitioA del VFA, infectó sistémicamente plantas de *N. Benthamiana* y la proteína de fusión CP-2a-sitioA se detectó tanto en hojas inoculadas como en las hojas superiores a las mismas. Tomando como partida los resultados obtenidos con PVX-2a-sitioA, se obtendrán virus PVX quiméricos que presenten las proteínas estructurales VP1 y P1 del VFA en su superficie (PVX-2a-VP1 y PVX-2a-P1 respectivamente). A su vez, se obtendrán vectores de inserción derivados de PVX para expresar las proteínas estructurales del VFA antes mencionadas. Posteriormente, se evaluará la respuesta inmune inducida y el grado de protección conferido por los virus quiméricos PVX-2a-A, PVX-2a-VP1 y PVX-2a-P1 y por los vectores de inserción PVXVP1 y PVXP1, utilizando para ello el modelo experimental murino.

En una segunda instancia, dado que en nuestro país no se vacuna contra la tuberculosis bovina, el desarrollo de métodos sensibles para el serodiagnóstico de la misma es de gran importancia. En el INTA Castelar se han identificado y clonado diversos antígenos de *Micobacterium bovis*, entre los cuales se encuentran las proteínas P36 y ESAT-6. Se obtendrán virus PVX quiméricos que presenten dichas proteínas en su superficie (PVX-2a-P36 y PVX-2a-ESAT-6), los cuales serán utilizados para el desarrollo de un sistema de diagnóstico por ELISA.

Sección VI

Marcadores Moleculares



PROYECTO: PRESENTACIÓN DE ANTÍGENOS EN LA SUPERFICIE DEL VIRUS X DE LA PAPA

F. Verna¹, G. Calamante²⁻³, C. Tami², O. Taboga², F. Bigi², K. Kobayashi¹, A. Cataldi² y A. Mentaberry¹⁻³

(¹) INGEBI-CONICET, Bs. As. (²) Inst. de Biotecnología, CICVyA-INTA, Castelar, Bs. As., (³) FCEyN-UBA

La utilización de los virus vegetales como presentadores de epitopes de virus animales y humanos posee un gran potencial para el desarrollo de vacunas efectivas, económicas y seguras. El objetivo de nuestro proyecto es la obtención de virus X de la papa (PVX) quimérico que exprese en su superficie antígenos derivados del virus de la fiebre aftosa (VFA). En una colaboración INGEBI-INTA se ha diseñado un sistema de presentación de antígenos foráneos en la superficie de PVX, con el que se ha construido el virus quimérico PVX-2a-sitioA. Este virus presenta en su superficie el sitioA del VFA, infectó sistémicamente plantas de *N. Benthamiana* y la proteína de fusión CP-2a-sitioA se detectó tanto en hojas inoculadas como en las hojas superiores a las mismas. Tomando como partida los resultados obtenidos con PVX-2a-sitioA, se obtendrán virus PVX quiméricos que presenten las proteínas estructurales VP1 y P1 del VFA en su superficie (PVX-2a-VP1 y PVX-2a-P1 respectivamente). A su vez, se obtendrán vectores de inserción derivados de PVX para expresar las proteínas estructurales del VFA antes mencionadas. Posteriormente, se evaluará la respuesta inmune inducida y el grado de protección conferido por los virus quiméricos PVX-2a-A, PVX-2a-VP1 y PVX-2a-P1 y por los vectores de inserción PVXVP1 y PVXP1, utilizando para ello el modelo experimental murino.

En una segunda instancia, dado que en nuestro país no se vacuna contra la tuberculosis bovina, el desarrollo de métodos sensibles para el serodiagnóstico de la misma es de gran importancia. En el INTA Castelar se han identificado y clonado diversos antígenos de *Micobacterium bovis*, entre los cuales se encuentran las proteínas P36 y ESAT-6. Se obtendrán virus PVX quiméricos que presenten dichas proteínas en su superficie (PVX-2a-P36 y PVX-2a-ESAT-6), los cuales serán utilizados para el desarrollo de un sistema de diagnóstico por ELISA.

UTILIZACIÓN DE MARCADORES RAPDs EN ALFALFA (*Medicago sativa* L.)

¹ Marcos D. Bonafede, Raúl D. Ríos, Claudio G. Robredo, ²Daniel Basigalup

¹ Instituto de Genética "Ewald A. Favret", CICVyA, CNIA, INTA, C.C. 25 (1712) Castelar, Argentina.

²INTA EEA-Manfredi, Ruta Nac. N°9 Km 636, Manfredi, Córdoba.

La alfalfa (*Medicago sativa* L) es una leguminosa forrajera de amplia importancia mundial, constituyendo en nuestro país uno de los pilares más destacados de la ganadería argentina.

En el presente trabajo se realizó la puesta a punto de la técnica de RAPDs en esta especie.

Esta metodología se está aplicando a la evaluación de la variabilidad genética de dos poblaciones comerciales del programa de mejoramiento del INTA, de diferente latencia invernal.

Hasta el presente se evaluaron 27 individuos de cada una de las dos poblaciones con 30 "primers".

De ellos se seleccionaron 15, que mostraron mayor número de bandas polimórficas nítidas y repetibles en distintas reacciones, para realizar el correspondiente análisis de variabilidad. Cabe destacar que se han encontrado "primers" que amplifican bandas específicas para cada población.

Con estos mismos "primers" se evaluarán otras poblaciones de dicho programa del INTA Manfredi.

APROXIMACIÓN BIOTECNOLÓGICA PARA LA SELECCIÓN DE VARIEDADES ARGENTINAS DE FRUTILLA E IDENTIFICACIÓN DE PROTEÍNAS/GENES Y COMPUESTOS NATURALES PARA LA DEFENSA VEGETAL.

Castagnaro A, Diaz Ricci JC, Zembo JC, Mroginski L, Filippone P, Ontivero M, Arias M, Mamani de Marchese A, Salazar S, Aprea A, Coll García Y, Vellicce G, Terada G, Kirschbaum D, Gamboa S, Brandán E, Martínez Novillo J y Bulacio E.

Instituto Superior de Investigaciones Biologicas (INSIBIO), Conicet-UNT.

Este proyecto interdisciplinario e interinstitucional, incluye aspectos básicos y tecnológicos del cultivo de la frutilla. Desde un punto de vista básico:

- i) Se caracterizan especies silvestres relacionadas con la cultivada *Fragaria ananassa* y se estudian las relaciones evolutivas entre ellas: se describió botánicamente una nueva especie vegetal que denominamos *Potentilla tucumanensis*.
- ii) Tomando como modelo la enfermedad de la antracnosis, se investiga la interacción patógeno/planta bajo condiciones controladas y se identifican proteínas (genes) y compuestos de defensa: se purificaron compuestos antimicrobianos de hojas de frutilla que fueron llamados Fragarinas.
- iii) Se estudian cultural, morfológica y genéticamente las cepas de patógenos: sobre distintas variedades y en diferentes zonas frutilleras del país, se han aislado tres especies de *Colletotrichum* (*C.fragariae*, *C.acutatum* y *C.gloeosporioides*) causantes de la antracnosis.
- iv) A través de rastreo genómico molecular y de BSA ("Bulked Segregant Analysis"), se desarrollan marcadores moleculares para identificar fondos genéticos y para seguir caracteres de interés en descendientes de cruza intra e interespecíficas: se han detectado marcadores RAPD ("Random Amplified Polymorphic DNA") específicos de especies.
- v) También se evaluará el nivel de protección que confieren y los mecanismos de acción de genes de defensa, transferidos por ingeniería genética vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Toda la información básica es aprovechada en una aproximación biotecnológica que combina el mejoramiento genético clásico con el molecular, para:

- vi) La obtención de cultivares de frutilla con un nivel de productividad competitivo y con resistencia genética a factores de estrés biótico: se dispone de selecciones avanzadas más resistentes a enfermedades que sus progenitores comerciales, usados como testigos.
- vii) Evolucionar hacia sistemas de producción sin bromuro de metilo, que minimizan la utilización de agroquímicos y que integran el uso de nuevas variedades, la producción de plantines en viveros y el manejo agronómico del cultivo.

APLICACIÓN DE MARCADORES AFLP EN EL ANÁLISIS GENÓMICO Y MEJORA DE ESPECIES LEÑOSAS. AVANCES EN LA VITICULTURA MOLECULAR

M.T. Cervera, J.A. Cabezas J.M. Martínez-Zapater

Departamento de Genética Molecular de Plantas, Centro Nacional de Biotecnología (CSIC).
Campus Universidad Autónoma de Madrid, Cantoblanco 28049 Madrid

Tradicionalmente, la mejora genética se ha basado en el análisis de caracteres morfológicos. El éxito de este enfoque depende, en gran medida, de la heredabilidad de los caracteres, y del tiempo requerido para completar un ciclo de mejora. Pese a que la vid es uno de los cultivos frutícolas de mayor importancia mundial, el conocimiento de su genética es pobre fundamentalmente debido a que esta especie leñosa muestra largos tiempos de generación, elevada heterozigosidad, depresión por consanguinidad y largos periodos de juvenilidad por lo que muchos caracteres de interés agronómico se expresan de forma tardía en el desarrollo. Sin embargo, el desarrollo de nuevas técnicas moleculares ha facilitado el análisis genético de la vid permitiendo el desarrollo de la mejora molecular.

Entre las nuevas técnicas de análisis molecular, AFLP y técnicas derivadas (SAMPL, SSAP, MSAP) destacan por su elevada razón múltiple y reproducibilidad. Además no requieren información de la secuencia previa al análisis. Estos marcadores se muestran como herramientas muy útiles en estudios de diversidad, identificación y discriminación de genotipos, permitiendo la caracterización genética de variedades y clones de interés. Asimismo, los marcadores moleculares permiten la rápida construcción de mapas genéticos en los que podemos identificar regiones que controlan caracteres de interés agronómico mediante la asociación de marcadores con dichos caracteres. Los proyectos de mejora genética asistida por marcadores en especies leñosas se basan en la canalización de la información de ligamiento entre marcadores asociados a caracteres de interés, permitiendo la selección precoz para caracteres de difícil evaluación. Durante la presentación discutiremos nuevos abordajes moleculares en el análisis genético y mejora de la vid.

**DESARROLLO DE VARIEDADES DE ARROZ CON RESISTENCIA DURABLE A
PYRICULARIA GRISEA.**

Consolo, Fabiana¹, Cordo, Cristina², Giarrocco, Laura¹ y Graciela Salerno¹.

¹ Centro de Investigaciones Biológicas-FIBA-INBIOP (CONICET)-Vieytes 3103. 7600. Mar del Plata. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. E-mail: fibamp@mdq.com.ar

² Universidad Nacional de La Plata. Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales. Calle 60 y 119. 1900. La Plata.

El arroz es la principal fuente de alimentación de más del 50% de la población mundial. En nuestro país es un componente fundamental en la economía de las provincias de Entre Ríos, Corrientes, Santa Fe, Chaco y Formosa. Su producción pasó en los últimos cinco años de 400.000 a 1.200.000 toneladas. Para satisfacer la demanda de nuevos mercados internacionales y sostener los niveles de producción ya obtenidos es imprescindible contar con variedades de alto rendimiento que sean resistentes al ataque de insectos y enfermedades.

Una de las principales enfermedades que ataca a los cultivos de arroz es el "quemado" o "bruzone" causada por el hongo *Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc que se encuentra muy difundida a nivel mundial. En la Argentina se ha detectado la presencia del patógeno en todas las campañas, por lo cual es necesario contar con variedades de arroz resistentes a *P. grisea* para evitar un ataque que resulte en pérdidas importantes en la producción. La caracterización biológica de los aislamientos de *P. grisea* utilizando metodologías y enfoques modernos permitirá analizar la estructura de la población e identificar las familias genéticas presentes en nuestro país.

El objetivo de este proyecto es realizar una caracterización exhaustiva y sistemática a nivel de ADN de la población nativa de *P. grisea* para detectar e incorporar resistencia a las familias genéticas del patógeno presentes en nuestro país en variedades comerciales de arroz.

La detección de marcadores moleculares fuertemente ligados a genes de resistencia al patógeno proveerá una herramienta fundamental para acelerar la selección de genotipos resistentes con el fin de desarrollar nuevas variedades de arroz con resistencia durable a *P. grisea*.

CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE PLANTAS MICROPROPAGADAS DE PARAÍSO GIGANTE (*Melia azedarach* L. var *gigantea*).

DIRECTOR: Dra. Viviana Echenique

e-mail: echeniq@criba.edu.ar

PARTICIPANTES: Ing. Sofía Olmos, Ing. Luis Mroginski

Dpto. Agronomía (UNS). San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca

IBONE – UNNE – Sgto. Cabral 2131- 3400 Corrientes

Cuando se micropropagan especies forestales es fundamental evaluar la estabilidad de las plantas regeneradas en etapas tempranas debido a las posibles alteraciones fisiológicas y/o genéticas inducidas por el cultivo *in vitro*. De esta manera es posible determinar el momento adecuado para volver a establecer los genotipos selectos.

El objetivo de este proyecto es analizar las posibles alteraciones a nivel cromosómico, isoenzimático y molecular producidas en plantas micropropagadas de paraíso gigante a fin de determinar el número de subcultivos a realizar sin riesgos de variación somaclonal cuando se realiza la micropropagación a nivel comercial.

Inicialmente se estudiaron RAPD's e isoenzimas como marcadores para detectar cambios en etapas tempranas del cultivo.

Se utilizaron 20 plantas provenientes de semillas que fueron establecidas *in vitro* siguiendo la metodología de cultivo que se utiliza a nivel comercial. Se realizaron perfiles isoenzimáticos y moleculares (RAPD's) de estas 20 plantas a fin de usarlas como control. Se probaron 8 sistemas isoenzimáticos diferentes (ACP, PGD, PGM, MDH, SKDH, PX, EST y PGI).

Para el análisis de RAPD's se utilizaron 12 primers (serie U, G y P de OPERON TECHN). Los resultados se analizaron con el programa NTSYS para obtener los coeficientes de similitud genética de Jaccard.

Del análisis isoenzimático se obtuvieron 16 bandas totales, con un promedio de 3 bandas por sistema, de las cuales 10 resultaron polimórficas y permitieron encontrar un perfil único para 4 plantas. Se obtuvo un rango de similitud entre 0,5 a 1,0. El análisis de RAPD's detectó 102 bandas totales definidas, un promedio de 8 bandas por primer y 70 bandas polimórficas que posibilitaron la caracterización de 16 plantas. El rango de similitud estuvo entre 0,4 y 0,9. La mayor variación en los perfiles de RAPD's fue suficiente para caracterizar la mayoría de los genotipos analizados. En ninguna de las comparaciones de a pares se observó una similitud de 1,0, evidenciando la variabilidad que no había sido detectada por isoenzimas.

Los RAPD's son marcadores polimórficos adecuados para caracterizar genotipos de paraíso gigante que permitirían detectar cambios genéticos en las plantas micropropagadas. Las isoenzimas brindan un nivel de polimorfismo menor, sin embargo, pueden ser útiles para complementar los análisis.

CULTIVO DE ANTERAS APLICADO AL MEJORAMIENTO DE TRIGO

DIRECTOR: Dra. Viviana Echenique

e-mail: *echeniq@criba.edu.ar*

CODIRECTOR: Ing. Rubén Miranda

PARTICIPANTES: Ing. G. Aldao Humble, Lic. Pablo Polci y Srta. Verónica Conti.

Dpto. Agronomía (UNS). San Andrés 800 – 8000 Bahía Blanca
Asociación de Cooperativas Argentinas (ACA).

La producción de doble haploides representa un acortamiento del período total de producción y un incremento de la eficiencia del proceso de selección sobre materiales con todos sus loci en homocigosis. Fuera de lo informado por Ortiz y Mroginski (1991) no se han realizado estudios para caracterizar variedades nacionales de trigo en función de su capacidad androgénica, ni se ha intentado incorporar la técnica como herramienta complementaria en planes de mejoramiento, tal vez debido a la falta de información concreta del potencial de respuesta de los genotipos utilizados en los bloques de cruzamiento de las compañías mejoradoras de trigo.

El objetivo de este proyecto es poner a punto una técnica de cultivo de anteras para materiales del Criadero de Cereales ACA y estimar la capacidad androgénica de las líneas parentales intervinientes a fin de utilizar esta técnica en planes de mejoramiento.

Se utilizaron semillas de 17 filiales F3 segregantes del Criadero. Las F3 se seleccionaron en función de los antecedentes de respuesta al cultivo de anteras de los padres involucrados en las cruces, siendo estos en su gran mayoría, líneas nacionales con antecesores introducidos respondedores muy remotos en la genealogía. La selección más concreta fue la de las líneas 2186 y 2152, con Buck Ombú como padre y madre respectivamente, respondedor informado por Ortiz y Mroginski (1991).

Las anteras se inocularon en diferentes medios de inducción y se cultivaron en oscuridad a 25°C hasta la aparición de estructuras embriogénicas (45 días). Para la regeneración se aplicó un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad, a 26°C.

Se lograron estructuras (embrioides) comparables a las documentadas en la bibliografía, resultando significativamente superior el medio MN6mod líquido para este propósito. Los genotipos Buck Ombu y F3 2103-5 regeneraron un 100% de plantas verdes. En cuanto a los materiales del bloque de cruzamiento: CB-113 y Coop. Liquen produjeron 0,3% de plantas verdes. La alta inducción registrada en dos de las tres filiales 2186-x hermanas de 2186-3 confirmó la hipótesis de mayor probabilidad de éxito para materiales relacionados cuando uno de ellos presenta respuesta. Los resultados sugieren mayor eficiencia del proceso induciendo con el medio NM6mod, pretratando con frío, y chequeando previamente los materiales.

APLICACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN LA CARACTERIZACIÓN DE GERMOPLASMA Y EN EL MEJORAMIENTO DE ARROZ

Laura E. GIARROCCO y Graciela L. SALERNO.

Centro de Investigaciones Biológicas. Fundación para Investigaciones Aplicadas (FIBA).
Vieytes 3103. 7600. Mar del Plata. Argentina.
e-mail: fiba@mdq.com.ar

El desarrollo y aplicación de la tecnología de Marcadores Moleculares en plantas ha permitido un considerable avance en la realización de mapas genéticos, la evaluación de la variabilidad genética, el clonado de genes y el análisis de caracteres cuantitativos, convirtiéndose en una herramienta fundamental para genetistas y mejoradores. Los progresos en el mejoramiento de plantas dependen de la variabilidad genética disponible. Los marcadores moleculares permiten obtener una medida cuantitativa de la variabilidad genética de una colección de germoplasma lo que conduce a un mejor aprovechamiento de la misma.

Esta información tiene importantes aplicaciones como: identificación varietal, verificación de pedigree, determinación de grupos heteróticos para el desarrollo de híbridos; en los Bancos de Germoplasma permite: identificar material duplicado en la colección, establecer una colección de referencia, determinar los grados de similitud entre especies cultivadas y salvajes y establecer prioridades para la adición de material nuevo a la colección. Los marcadores Microsatélites se basan en la amplificación específica por PCR de repeticiones en "tandem" de dos a cuatro nucleótidos y su polimorfismo se debe a la variabilidad en el número de repeticiones.

Estos marcadores son técnicamente simples, económicos, altamente reproducibles, automatizables y muy informativos (por ser codominantes, multialélicos e hipervariables).

En arroz se han desarrollado mapas genéticos basados en microsatélites con buena cobertura del genoma. El objetivo general de nuestra línea de trabajo es la aplicación de marcadores microsatélites en la caracterización de germoplasma y en la asistencia de programas de mejoramiento de arroz. Como primera etapa se está realizando la caracterización de la variabilidad genética existente en el germoplasma de arroz utilizado en Argentina y el desarrollo de un fingerprinting genético para la identificación de las mismas. Los resultados obtenidos indican que el nivel de polimorfismo detectado es adecuado para los fines propuestos.

APLICACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN EL MEJORAMIENTO DE SOJA

L. Giarrocco¹, J. Lúquez², M.E.Weilenmann de Tau² y G. L. Salerno¹.

1- Centro de Investigaciones Biológicas. Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas. Vieytes 3103. (7600) Mar del Plata.

2- Unidad Integrada Balcarce. Ruta 226, km 73,5, cc 276. (7620) Balcarce.

E-mail: fiba@mdq.com.ar; jluquez@balcarce.inta.gov.ar

El grano de soja y sus subproductos constituyen uno de los rubros más significativos de las exportaciones agrícolas de Argentina. Los objetivos de los programas de mejoramiento de soja en el mundo enfatizan la obtención de cultivares con contenidos específicos de aceite y proteína en el grano, acorde con la demanda de los mercados.

El mapeo molecular de los genomas y la tecnología de marcadores moleculares asociada ha permitido importantes avances en el mejoramiento y genética de plantas. Los microsatélites son marcadores de ADN altamente polimórficos especialmente adecuados para análisis genéticos en cultivos como la soja cuya base genética es estrecha. La disponibilidad de mapas genéticos de soja basados en marcadores microsatélites con una adecuada cobertura del genoma, hace posible utilizar dichos marcadores en: caracterización de germoplasma, estudios genéticos, clonado de genes de interés, mapeo de caracteres cuantitativos, así como en mejoramiento asistido por marcadores moleculares para acelerar y mejorar la eficiencia en la selección de genotipos con características de interés.

El objetivo general de esta línea de trabajo es asistir mediante la aplicación de marcadores microsatélites distintos proyectos de mejoramiento de soja. Particularmente en el mejoramiento de la calidad de soja tendiente a obtener granos con altos contenidos de aceite y/o proteína los objetivos planteados fueron: i) Caracterizar con marcadores microsatélites una población de líneas de soja con altos contenidos de proteína en el grano, ii) detectar asociaciones entre marcadores microsatélites y contenido de aceite y proteína y iii) determinar los parentales más adecuados para mapear QTL's (*loci* de caracteres cuantitativos) de interés en el marco del programa de mejoramiento para calidad de soja. Los resultados obtenidos constituyen la base para futuros estudios sobre ligamiento genético entre marcadores microsatélites y QTLs de interés agronómico.

CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LA POBLACIÓN DE *Pyricularia grisea* DE LATINOAMÉRICA

Livore Alberto, B.^A, Carlos Dezar^A, Maria I. Plata^D and Stella Avila^B Morris Levy^C.

A EEA INTA Concepcion del Uruguay, E.R. Argentina. econcep@inta.gov.ar

B EEA del Este INIA, Treinta y Tres, Uruguay. savila@iniae.org.uy

C Purdue University, Dept. of Biol. Sciences levym@bilbo.bio.purdue.edu

D EEA INTA Concordia, E.R. Argentina

La sonda MGR586 fue usada para generar los "fingerprints" sobre ADN digerido con ECO RI de aislamientos monoconidios recolectados sobre cultivares y líneas endocriadas de arroz durante los años 1994, 1997 y 1998. Los patrones MGR/RFLP del ADN digerido con ECO RI de los aislamientos monoconidios realizados sobre el cultivar El Paso 144 fueron idénticos en todas las muestras de toda la región y en todos los años. Los aislamientos realizados sobre otros cultivares estrechamente relacionados al cultivar mencionado, como IRGA 409, RP2, y EPAGRI 107, mostraron el mismo patrón. Un total de 5 patrones diferentes basados en esta sonda fueron encontrados en la región muestreada pero tan solo uno de ellos ha sido aislado sobre los cultivares de tipo de planta tropical como El Paso 144. Aún en viveros con alta variabilidad de hospedantes como los campos experimentales de mejoramiento, donde otros aislamientos diferentes fueron identificados, solo un tipo de linaje (un patrón de MGR/ ECO RI RFLP) fue aislado sobre los materiales de origen tropical. Esto sugeriría una susceptibilidad específica de esos cultivares al aislamiento particular que posee ese patrón de MGR, y al mismo tiempo sugeriría que los mismos cultivares contienen una resistencia a los otros linajes (representados por los otros patrones MGR/ ECO RI RFLP) presentes en esta región.

Comparaciones hechas con los patrones MGR de otros aislamientos de Latinoamérica indicaron una alta similitud entre el linaje predominante sobre El Paso 144 y un linaje identificado en Colombia para el cual se conoce la fuente de incompatibilidad (gen de resistencia) en el arroz. Se propone que la adición de esta fuente de resistencia al cultivar El Paso 144 podría completar el espectro de resistencia (excluyendo todos los linajes presentes) y proveer una protección más durable.

CARACTERIZACIÓN E IDENTIFICACIÓN DE GERMOPLASMA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

M.M. Manifesto^{1,2}, S. Marcucci Poltri¹, Ornella L¹, A.R. Schlatter¹, S.Torales¹, F. von Haneil-Niethammer¹, H.E. Hopp², E.Y.Suarez¹ y J. Dubcovsky³

¹ Instituto de Recursos Biológicos CIRN-INTA.

² Instituto de Biotecnología CICV-INTA (1712) Castelar, Buenos Aires, Argentina

³ Dept. of Agronomy & Range Science, University of California, Davis, CA, 95616. USA

La caracterización e identificación de germoplasma actualmente está basada en características morfológicas y fenológicas. Si bien estos descriptores son útiles, son limitados en número y son afectados por el ambiente. La utilización de marcadores moleculares permite la identificación del germoplasma en estadios tempranos del desarrollo de la planta y la estimación de relaciones genéticas entre los materiales analizados. Asimismo constituye un elemento clave en decisiones judiciales sobre propiedad intelectual. Nuestro laboratorio está desarrollando matrices de identificación en diferentes cultivos mediante la utilización de microsatélites de dominio público.

En Trigo, se analizaron 105 cultivares de trigo pan (*Triticum aestivum*) mediante 30 microsatélites. Se seleccionó un subgrupo de diez microsatélites, de alto contenido polimórfico y/o claridad en sus patrones de bandas. Los microsatélites seleccionados permitieron discriminar variedades que presentan un coeficiente de similitud de 0,90 y establecer patrones diferenciales para cada una de las variedades estudiadas dando lugar a la construcción de una Matriz de Identificación de los cultivares inscriptos. El Índice de Contenido Polimórfico (PIC), osciló entre 0,85 y 0,40. En Girasol, se analizaron 26 líneas endocriadas públicas y 4 híbridos comerciales mediante 13 microsatélites. Los valores de PIC de la población estudiada variaron entre 0.84 y 0.43.

En Maíz se evaluaron 79 líneas, mediante 30 microsatélites distribuidos a intervalos regulares en el genoma de maíz. Se seleccionó un grupo de 18 microsatélites, con altos valores de PIC para la identificación de las líneas. Los PIC oscilaron entre 0.89 y 0.41.

En Eucalipto Se evaluaron 14 individuos de *Eucalyptus dunnii* por medio de ocho microsatélites, revelando 91 alelos diferentes, cuyo valor de contenido polimórfico varió entre 0.88 y 0.34. También se evaluaron 40 individuos de *Eucalyptus grandis* mediante tres microsatélites, siendo los PIC 0.90, 0.89 y 0,87.

MAPEO DEL GEN DE RESISTENCIA EXTREMA A PVX, *Rxcmm*, MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES .

Martínez, María Carolina; Lucca, M. Florencia; Lijavetzky, Diego; Hopp, H. Esteban y Tozzini, Alejandro C.

Instituto de Biotecnología, INTA-Castelar. CC 77, Morón (1708), Argentina.

El clonado de genes de plantas que confieren resistencia a patógenos es un área de estudio de suma importancia actual, tanto desde el punto de vista científico como por su posible aprovechamiento. Más de una docena de genes han sido clonados en los últimos años. Estos confieren resistencia a distintos fitopatógenos (virus, bacterias, hongos, nematodos, y áfidos) pero sin embargo presentan molecularmente una estructura similar. Solo dos genes de resistencia a virus han sido clonados, el gen N de tabaco que confiere resistencia a TMV y el *Rxadg* de resistencia a PVX. Hemos identificado en el germoplasma de *Solanum commersonii* un gen, denominado *Rxcmm*, que confiere resistencia extrema a todas las cepas de PVX, incluyendo las cepas hipervirulentas HB y MS. Nuestros estudios en protoplastos sugieren que el mecanismo de resistencia es inducible y sus efectos se manifiestan a las 10-15 h post-infección. Con el objetivo de clonar este gen asistidos por marcadores moleculares, se generó y caracterizó una población segregante de 300 individuos. En esta se aplicaron marcadores AFLP en combinación con el análisis de segregantes en masa (*bulk segregant analysis*), obteniéndose marcadores ligados al alelo de resistencia y al de susceptibilidad. El más próximo se halla a 10% de recombinación del alelo de resistencia.

El presente proyecto propone: a) la creación y caracterización de una nueva población segregante de más de 1000 individuos, b) la obtención de nuevos marcadores moleculares ligados a menos de un cM del alelo de resistencia, c) la obtención de una genoteca en vector BAC de *S. commersonii*, d) el clonado posicional del gen *Rxcmm*, f) la caracterización molecular del gen *Rxcmm*.

**BUSQUEDA DE MARCADORES MOLECULARES LIGADOS A CARACTERES DE
IMPORTANCIA AGRONÓMICA EN GIRASOL**

M.Poverene, A. Carrera, G. Pizarro.

Dpto. Agronomía UNS, San Andrés 800. 8000 Bahía Blanca. E-mail: poverene@criba.edu.ar

R.Rodríguez, T. Salaberry, F. Castaño, M. Echeverría.

Unidad Integrada Balcarce, (UNMdP-INTA) 7620 Balcarce

En este proyecto se buscan marcadores moleculares asociados a variables agronómicas relevantes para seleccionar genotipos de girasol de mejor comportamiento: fertilidad, ausencia de ramificaciones, calidad del aceite y resistencia a enfermedades. Estos caracteres cualitativos no se expresan en el mismo momento y algunos de ellos sólo pueden ser evaluados al final del ciclo de cultivo (ej: ácido oleico). La detección de genotipos resistentes supone, asimismo, la utilización del patógeno en cada ciclo de selección y la realización de una serie de manipulaciones, tendientes a obtener infecciones exitosas. Los marcadores moleculares asociados con el rasgo de interés pueden convertirse en herramientas útiles de selección por su capacidad de detectar los caracteres deseados en forma precoz y sin influencias ambientales. Se analizan marcadores moleculares (isoenzimas, RAPD y AFLP) asociados a los caracteres restauración de la fertilidad genética-citoplasmática, número de capítulos, porcentaje de oleico y resistencia a mildiu en girasol. Estos cuatro caracteres son heredados cualitativamente. La detección de ligamiento entre marcadores y el rasgo de interés comprende las siguientes etapas: 1. Evaluación fenotípica y caracterización de los materiales. 2. Búsqueda de marcadores polimórficos en la colección de genotipos a utilizar. 3. Obtención de poblaciones segregantes (F2). 4. Análisis de poblaciones segregantes. Análisis de cosegregación. Determinación de relaciones de ligamiento. El presente proyecto se encuentra en la segunda etapa. Se dispone de doce líneas endocriadas caracterizadas previamente para restauración, nº de capítulos y % de oleico. Se está evaluando la resistencia a mildiu. Los mismos genotipos han sido analizados para marcadores isoenzimáticos y RAPD y se han observado numerosos polimorfismos, aún cuando varios de los materiales presentan relaciones cercanas de parentesco. En base a los resultados obtenidos, se realizarán los cruzamientos entre líneas contrastantes para obtener F1 y luego F2 por autofecundación. Cinco de los loci isoenzimáticos han sido asignados a grupos de ligamiento en el mapa RFLP de girasol.

POLIMORFISMOS MOLECULARES ASOCIADOS A GENES DE TOLERANCIA AL MAL DE RIO CUARTO EN MAÍZ (*Zea mays* L.)

C.G. Robredo¹, D.I. Puecher¹, D.G. Díaz¹, N.C Bonamico², M. A. Di Renzo², J.C. Salerno¹.

1 Instituto de Genética "Ewald. A. Favret" CNIA-INTA-Castelar. Argentina.

2 Facultad de Agronomía y Veterinaria - Universidad Nacional de Río Cuarto - 5800 - Río Cuarto – Argentina.

El Mal de Río Cuarto (MRC) es una enfermedad del maíz endémica de la República Argentina, causada por un fijivirus de la raza del Maize Rough Dwarf Virus. La tolerancia a este virus se comporta como un carácter cuantitativo y estaría controlado por pocos genes con efectos aditivos. En el IGEAF se desarrolla una línea de investigación que tiene por finalidad estudiar las bases genéticas de la tolerancia frente a esta enfermedad. Para ello se trata de identificar polimorfismos moleculares de microsatélites asociados a la tolerancia en maíz. En esta comunicación se presenta el estado actual del desarrollo de este proyecto.

CARACTERIZACION DE POBLACIONES CLONALES DE AJO MEDIANTE MARCADORES RAPDs

Maritza Vacca Molina^{1,2} y H.E. Hopp^{1,3,*}

¹Instituto de Biotecnología, CCVyA-CNIA INTA Castelar, CC 77, 1708 Morón.

²Universidad Nacional de Salta. ³Dep. Biología FCEyN-UBA, Buenos Aires

El ajo, *Allium sativum* L., es un cultivo estéril, que se propaga por vía vegetativa, y que muestra una considerable variabilidad en caracteres de importancia agronómica como el tamaño y color de los bulbos. Las descripciones de germoplasma son generalmente ambiguas, incompletas o realizadas con distintos criterios, lo que crea situaciones confusas en la identificación de poblaciones clonales. En nuestro país es ampliamente utilizada la clasificación efectuada por J. L. Burba., la cual según criterios de: duración de ciclo del cultivo, dormición, fotoperiodo y requerimientos de frío para bulbificación, a organizado el germoplasma en cuatro grupos: Grupo I (Violetas o Asiáticos), Grupo II (Rosados), Grupo III (Blancos) y Grupo IV (Colorados). El presente trabajo tiene como propósito la caracterización y cuantificación de la variabilidad genética del germoplasma de ajo, utilizado en el país, mediante el uso de marcadores moleculares, RAPDs, a fin de establecer la distancia genética entre entradas y cuantificar la variabilidad. Con 11 "primers" se procedió a amplificar los ADNs genómicos de 42 entradas ("accesiones") de ajo representativas, fundamentalmente, de la Argentina, pero también de Brasil, Estados Unidos, Francia, Hungría, España, Checoslovaquia y China. Los productos de amplificación se sembraron en geles desnaturizantes de poliacrilamida al 6% del tipo de los utilizados en secuenciación nucleotídica. Este tipo de geles permiten visualizar muchas más bandas y permiten identificar productos de menor tamaño molecular. Cada sistema de "primers" genera un promedio de 50 bandas claras y reproducibles de las que aprox. 10 evidencian variabilidad. De esta manera, se evaluaron un total de aprox. 550 loci, de los cuales 114 revelaron variabilidad. Los fenogramas analizados muestran que existen al menos 2 agrupamientos importantes de genotipos, ubicándose en los extremos de los árboles generados, clones pertenecientes al Grupo III y IV y entre ambos grupos, clones pertenecientes a los grupos I y II. La clasificación en grupos de Burba concuerda, al menos en las poblaciones analizadas, con las asociaciones obtenidas en los fenogramas. Los resultados demuestran que los RAPD constituyen una herramienta útil para revelar la variabilidad genética existente en los cultivares argentinos

USO DE MARCADORES MOLECULARES EN MEJORAMIENTO DE CULTIVOS

Darío Bernacchi - Monsanto - Estacion Camet, Ruta Nacional 226, Km7
Mar del Plata, (7600) Argentina - Tel/Fax:(54-223)- 4642827

Las técnicas de marcadores moleculares ya se utilizan de manera rutinaria como herramienta adicional para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento de distintos cultivos. Los procedimientos más utilizados en la faz aplicada son: "backcross" asistido por marcadores, conversión de líneas transgénicas, introgresión de genes específicos, "fingerprinting", análisis de pureza híbrida, control de pureza transgénica, test de homocigocidad, y selección recurrente para caracteres cuantitativos asistida por marcadores. En la faz de desarrollo o descubrimiento, los marcadores se utilizan fundamentalmente para identificación y marcación de genes simples de interés e identificación de QTLs de caracteres de interés. También los marcadores moleculares de ADN se utilizan como herramienta para permitir en mapeo fino de genes de interés para su posterior clonado. Tecnológicamente, la búsqueda de marcadores más eficientes es constante, apuntándose a marcadores de menor costo por "datapoint" informativo generado. Algunos pasos para lograr esto pueden ser simplificar protocolos, automatizar, o simplemente reducir el volumen de reacciones

CLONADO Y CARACTERIZACION DE GENES DE RESISTENCIA A PATOGENOS EN GIRASOL UTILIZANDO UNA GENOTECA DE CROMOSOMAS ARTIFICIALES BACTERIANOS (BAC)

Diego Lijavetzky, Alejandro Tozzini, Norma Paniago, M. Carolina Martínez, Ruth Heinz, Esteban Hopp.

Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina.
(dlijave@cicv.inta.gov.ar)

El girasol (*Helianthus annuus* L.) es uno de los principales cultivos anuales destinados para aceite comestible y es uno de los más importantes de la Argentina dado la superficie bajo producción y el volumen de exportación. Pese a la importancia económica del girasol a escala mundial, son muy limitados los estudios genéticos y genómicos que se han llevado a cabo. Esta situación se agrava debido a que no existen, en el ámbito público y de libre acceso, desarrollo de herramientas genéticas o genómicas (i.e. microsatélites, ESTs, genotecas de BAC). La mayoría de los marcadores moleculares asociados a caracteres de importancia agronómica, potencialmente utilizables para mejoramiento o investigación, se encuentran bajo la órbita de empresas semilleras privadas. Por otro lado, los programas de mejoramiento han sido principalmente focalizados en la calidad y el contenido de aceite y no tanto en lo que hace a la resistencia a enfermedades.

Recientemente se han publicado varios trabajos en los que, basándose en la conservación a nivel de secuencia en los motivos estructurales de distintos genes clonados, se diseñaron oligonucleótidos degenerados para amplificar y clonar por PCR, análogos de genes de resistencia (RGAs). Muchos de los RGAs clonados en diferentes especies han sido mapeados, habiéndose demostrado en algunos casos, una cosegregación entre los RGAs y genes de resistencia a enfermedades. A partir de estos hallazgos se desprende la potencialidad de los RGAs para lograr el clonado de genes de resistencia a patógenos, lo que en última instancia requiere la identificación de los correspondientes clones genómicos y de cDNA y pruebas de complementación por transformación genética.

El objetivo principal del presente proyecto generar la información y las herramientas necesarias para lograr el clonado de genes, completos y funcionales, de resistencia a patógenos del girasol. Para ello se proponen los siguientes pasos: i) clonar y caracterizar RGAs de girasol; ii) localizar por medio de mapeo molecular de los RGAs caracterizados; iii) construir un genoteca de Cromosomas Artificiales de Bacterias (BAC) de girasol; iv) identificar clones de BAC conteniendo RGAs por medio de PCR e hibridación; v) identificar clones de cDNA correspondientes a RGAs que se expresen usando como sondas los clones de BAC seleccionados.

**DESCRIPCIÓN DE ACTIVIDADES EN EL LABORATORIO DE BIOTECNOLOGÍA
EN LA EEA INTA BALCARCE**

Sergio Feingold, Sonia Distel, Silvia Capezio y Marcelo Huarte

El laboratorio de Biotecnología utiliza marcadores moleculares (microsatélites, AFLP y otros) con el objeto de:

a.- caracterizar e identificar cultivares de papa comercial y silvestre

b.- localizar en mapas genéticos, regiones que codifiquen para caracteres de interés agronómico.

Dentro de este punto, se destina especial importancia a la construcción de poblaciones diploides segregantes, y ya se cuenta con una población F1 entre genotipos diversos de Solanum chacoense, con resistencia horizontal a tizón tardío.

c.- evaluar la diversidad presente en patógenos (v.g. Phytophthora infestans) complementando a los métodos tradicionales.

d.- establecer metodologías (cuali y cuantitativas) para la detección de patógenos en papa semilla utilizando la reacción en cadena de la polimerasa.

GENOMIC ANALYSIS OF SUNFLOWER: DEVELOPMENT OF MOLECULAR MARKERS AND GENETIC MAPS

Paniego, N. B., Lijavetzky D.C., Echaide M*, Lopez Bilbao, Muñoz M., Fernandez L., Fernandez P, Nishinakamasu V. and Hopp E.H.

Instituto de Biotecnología, CICVyA-INTA Castelar, Buenos Aires, Argentina. (paniego@inta.gov.ar)

* Lab. de Marcadores Moleculares, Instituto Nacional de Semillas.

Sunflower is the Argentina's second oilseed crop with an annual production of approximately 6.000.000-ton. A strong seed market that commercializes 12.000 ton per year supports this high production. Concerning the last one, a reliable system for the protection of plant varieties is indispensable to ensure return on research investment for public and privately institution.

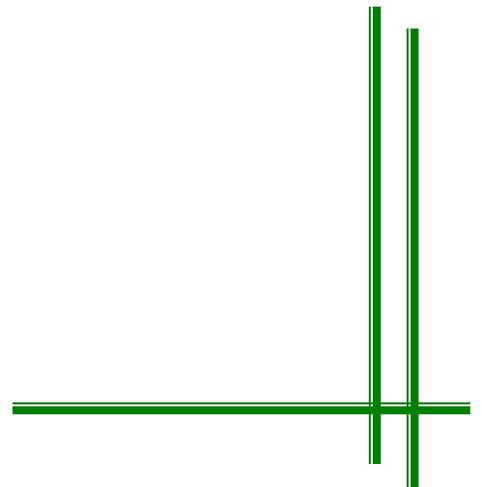
The identification of plant varieties for purposes of patenting is based on a number morphological data such as flower colors, plant morphology and disease resistance. Nowadays, the increment of commercialized varieties of particular species has limited the capacity of the conventional descriptors for the unambiguously identification of new accessions. In this context, DNA based markers have begun to provide a promising alternative to supplement and refine the morphological-based classification. Nevertheless, the potentially utility of molecular markers for varietal description and judication of plant infringement is still controversial. International debate revolves around the use of neutral and selectable markers in the field of plant variety identification.

In order to provide public and private sectors the modern technologies that have been developed and applied at international level, we propose the present project which principal outputs involve the acquisition of a set molecular tools potentially useful for the complementation of the conventional system for variety identification. The set referred above comprise Express Sequence Tags (ESTs) as neutral and selectable markers. ESTs, they can be considered as selectable markers as regard they are the DNA copies of the mRNAs present in the studied species and eventually the responsiveness for the morphological characters which are currently used in varieties identification.

Finally, the other goal of this project that is to build a genetic map for cultivated sunflower of selected EST coding loci, will be useful for the standpoint of understanding genome organization, as a platform for map-based cloning, and for quantitative trait locus (QTL) detection.

Sección VII

Tipos de Estrés



**SEÑALIZACIÓN DEL ÁCIDO SALICÍLICO Y COMPORTAMIENTO AGRONÓMICO DE
CEBADAS NORMALES Y DEFICIENTES EN CATALASA CRECIDAS BAJO CONDICIONES
ALTAMENTE FOTORRESPIRATORIAS**

Acevedo A.^(1,2), Díaz Paleo A.⁽³⁾, Fayos J.⁽⁴⁾, Belles J.M.⁽⁴⁾, Conejero V.⁽⁴⁾

⁽¹⁾ IRB, CRN-INTA, 1712 Castelar.

⁽²⁾ Depto. de Ciencia y Tecnología UNQ, 1876 Bernal.

⁽³⁾ IGEAF, CNIA-INTA, 1712 Castelar.

⁽⁴⁾ IBMCP-UPV, Valencia, España.

Durante el desarrollo del proyecto “Biotecnología de la tolerancia a estrés abiótico en cebada (*H. vulgare* L.)” se evaluó la función fotorrespiratoria del peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y señalizadora del ácido salicílico (SA) en plántulas de cebada normales y deficientes en catalasa (CAT) crecidas bajo régimen hídrico normal y deficitario. Como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2) es sustrato de la enzima CAT y la mutante de cebada *RPr79/4* es deficiente en CAT, se monitorearon los niveles de H_2O_2 y ácido salicílico (SA) en ausencia de sequía, mostrando *RPr79/4* mayores valores de H_2O_2 y SA que su línea madre *Maris Mink*. Contrariamente, el nivel de H_2O_2 decreció en ambas cebadas bajo condiciones de sequía. Los valores de SA libre (600-700 ng/g) determinados en *RPr79/4* antes, durante y después de la sequía, serían los encargados de señalar el estrés por sequía. Estos datos no son consistentes con la idea de que el rol señalizador del SA se ejerce a través de la inhibición de CAT, dado que altos valores de SA libre se correlacionan con una disminución de H_2O_2 .

Dado que a campo, las plantas de *RPr79/4* exhiben manchas necróticas en hojas y difícilmente originan macollos fértiles, se analizó si el efecto de los diferentes niveles de CAT incidía en el comportamiento agronómico y la viabilidad de cebada. En progenies crecidas a campo, derivadas de cruzamientos entre *RPr79/4* y distintas líneas de cebada, se observó que sólo el 16% de las familias homocigotas necróticas, que cosegregan con deficiencia de CAT, fue viable. Esto indica que niveles normales de CAT contribuirían a que plantas de cebada crecidas en condiciones fotorrespiratorias exigentes exhiban fenotipos viables. También se demostró que todas las familias homocigotas necróticas exhibían bajo rendimiento.

SEÑALES MOLECULARES EN LA ASOCIACIÓN SIMBIÓTICA ENTRE RHIZOBIUM Y LEGUMINOSAS

O. Mario Aguilar

Instituto de Bioquímica y Biología Molecular, Facultad de Ciencias Exactas, Universidad Nacional de La Plata, 1900-La Plata, Argentina.

Las bacterias del suelo pertenecientes al género *Rhizobium* tienen la capacidad de asociarse simbióticamente con leguminosas formando nódulos radiculares fijadores de nitrógeno, el cual es convertido en productos asimilables por la planta. El reconocimiento entre los rizobios y las distintas leguminosas es muy específico, implicando en general la síntesis de moléculas señales que disparan los procesos de infección, invasión y formación del nódulo. La activación de genes de rizobio requeridos para la nodulación depende de flavonoides secretados por la planta y el producto del gen regulador *nodD*. El resultado de la actividad de los genes de nodulación es la síntesis de una molécula identificada químicamente como quitolipooligosacáridica que induce la división meristemática de la raíz. El conjunto de productos génicos de la planta cuya expresión aparece o se incrementa en el proceso de nodulación por rizobio es conocido como nodulinas. Se han identificado varias nodulinas con funciones asignadas diversas, e inducidas en etapas tempranas o tardías de la nodulación (early and late nodulins). El interés en aumentar el conocimiento de los mecanismos básicos de la simbiosis *Rhizobium*-leguminosas se hallan ampliamente justificados: - la fijación biológica de nitrógeno representa una alternativa a la fertilización química que depende de recursos renovables, con potencialidades para contribuir sustancialmente a sostener una agricultura en armonía con el medio ambiente. - desde el punto de vista del conocimiento de la biología, representa un proceso de diferenciación celular con la participación de moléculas señales en un diálogo entre ambos simbioses. - en el caso particular de nuestro país, el cultivo de leguminosas tales como soja y poroto, es altamente significativo para la economía y actividades regionales. La fijación simbiótica de nitrógeno en leguminosas es sensible a perturbaciones ambientales incluyendo acidez, estrés hídrico, altas temperaturas, los cuales afectan la persistencia de los rizobios en el suelo y el proceso de infección de la planta, e inducen la senescencia prematura de los nódulos radiculares.

En nuestro laboratorio estamos interesados en investigar los factores genéticos y bioquímicos del rizobio determinantes de la tolerancia intrínseca a estreses ambientales en algunas cepas de rizobios. Usando mutagénesis con el transposon *Tnr-luxAB* hemos aislado mutantes sensibles, a partir de los cuales hemos clonado e identificado genes requeridos para la tolerancia. En el curso de esta presentación se discutirán el significado de la producción endógena de glutatión para la tolerancia a acidez a través de un mecanismo que implicaría el transporte del ion potasio, y la necesidad de una vía biosintética de guanina funcional para tolerar estrés térmico y lograr una asociación simbiótica exitosa con poroto. Mutaciones en el gen *guaA* afectan al rizobio en la etapa de liberación en el interior de las células del nódulo.

USO DE *Bacillus thuringiensis* EN EL CONTROL DE INSECTOS PLAGA DE CULTIVOS DE INTERÉS AGRONÓMICO.

Corina Berón¹; Jorge Arcas² y Graciela Salerno¹

¹ Centro de Investigaciones Biológicas - FIBA - INBIOP (CONICET) - Vieytes 3103. 7600 Mar del Plata - CONICET - Universidad Nacional de Mar del Plata. E-mail: fiba@mdq.com.ar. ² Centro de Investigación y Desarrollo en Fermentaciones Industriales. CONICET - UNLP. Facultad de Ciencias Exactas. 50 y 115. 1900 La Plata - CONICET.

Bacillus thuringiensis, bacteria Gram +, del suelo, posee la capacidad de formar, durante el proceso de esporulación, una inclusión proteica cristalina, la cual es tóxica contra insectos de diversos órdenes.

Las líneas de investigación en el Centro de Investigaciones de FIBA comprenden: a) desarrollo de bioinsectidas a base de *B. thuringiensis* para el control de plagas de la Provincia de Buenos Aires, para lo que se realizan aislamiento, selección y caracterización morfológica, bioquímica, genética y toxicológica de nuevas cepas de dicha bacteria

b) Uso de *B. thuringiensis* en el control del picudo del algodónero (*Anthonomus grandis*). Dicho insecto provoca importantes pérdidas en la producción algodonera de Brasil, y es un riesgo en Argentina, ya que es una plaga cuarentenaria, que se puede convertir en un problema importante para las economías regionales en un futuro próximo, dada la gran capacidad expansiva de este insecto en el campo. Para el desarrollo de este proyecto será empleada una cepa recientemente aislada en nuestro laboratorio, que posee características propias en cuanto al tipo de cristal que produce, el patrón proteico de dicho cristal y a su toxicidad contra lepidópteros (*Anticarsia gemmatalis* y *Spodoptera frugiperda*) y coleópteros (*Diabrotica speciosa* y *Tenebrio molitor*) (en colaboración con CENARGEN, EMBRAPA, Brasilia).

La importancia de este tipo de investigaciones radica en la posibilidad de obtener aislados más potentes que los disponibles y que se emplean comercialmente en la actualidad, así como aumentar el espectro insecticida contra insectos resistentes o contra insectos no blanco de las cepas ya descritas. Asimismo permitirán la implementación de una alternativa nueva de control dentro del marco de un Manejo Integrado de Plagas en los cultivos de interés comercial. Por otro lado la obtención y caracterización de nuevos genes de toxinas serán aportes de gran utilidad que podrían ser utilizadas en una segunda etapa para producir plantas transgénicas, resistentes a los ataques de insectos plaga.

CARACTERIZACIÓN DE GENES DE PAPA INDUCIDOS POR ESTRÉS BIÓTICO

Godoy V, Zanetti ME, Zazzaro A, San Segundo B y Casalongué C.

Solanum tuberosum L. es una planta cultivada a nivel comercial que se ve afectada entre otras enfermedades por la fusariosis. Esta enfermedad se manifiesta, en general, como la podredumbre seca de los tubérculos cosechados y/o el marchitamiento de hojas y tallo. Hasta el momento su control se realiza mediante la combinación de las siguientes medidas: uso de cultivares tolerantes, tratamiento de semillas con benzoimidazoles, rotación con gramíneas y leguminosas y utilización de papa conservada a bajas temperaturas, turgentes y sin brotar. Ninguno de estos métodos solos o en combinación garantizan el control de la enfermedad. Por otra parte, el conocimiento de los mecanismos de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos ha surgido del estudio de diferentes patosistemas y utilizando diversas aproximaciones experimentales. La activación transcripcional que ocurre en el huésped durante una interacción planta-patógeno involucra numerosos genes.

El presente plan de trabajo pretende ahondar en el conocimiento de dichos mecanismos para lo cual nos hemos planteado la identificación y caracterización de genes de papa relacionados con la respuesta de defensa frente a *Fusarium eumartii*.

La estrategia utilizada para el clonado e identificación de genes ("screening" diferencial de una biblioteca de ADNc construida a partir de tubérculos de papa inoculados con *Fusarium eumartii*) permitió aislar trescientos treinta y nueve clones. Hasta el momento hemos identificado 3: *StCyP*, *StMBF-1* y *St 9.3.6.1*. los cuales tienen alta homología con ciclofilinas citosólicas, adaptadores transcripcionales del tipo MBF-1 y un ESTs de *Arabidopsis thaliana*, respectivamente.

Cabe destacar que el presente proyecto aportará datos de interés tanto al conocimiento básico como a proyectos de investigación con aplicaciones agronómicas. Más concretamente, el disponer de clones que codifiquen para proteínas relacionadas con la respuesta de defensa permitirá evaluar su potencialidad para ser aplicados en la obtención de plantas transgénicas resistentes al ataque por patógenos.

ESTUDIO FISIOLÓGICO-MOLECULAR DE LA INTERACCIÓN PAPA-*Phytophthora infestans*

R.O. Cassia, V. Fernández-Maillot, E.A. Madrid, R. Paris, L. Lamattina

Instituto de Investigaciones Biológicas, F.C.E. y N., UNMdP.

CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina.

Fax: 54 223 475 3150; e-mail: lolama@mdp.edu.ar

En la última década, se ha observado un resurgimiento, con características de epidemia, de la enfermedad del tizón tardío de la papa (*Solanum tuberosum*), generada por el oomicete *Phytophthora infestans*. Esto se debe al esparcimiento del tipo A2 del hongo en el mundo y su consecuente cruzamiento con el tipo A1 y, a la aparición de nuevas razas resistentes a los fungicidas comunmente utilizados. Una pérdida estimada en el 30-40% de la producción de papa puede deberse al tizón tardío, si no se realiza una intensiva utilización de fungicidas. En los últimos 5 años, nuestro laboratorio ha descrito cambios en el metabolismo primario del hospedador frente al ataque de *P. infestans* y caracterizado algunos componentes de la matriz extracelular-membrana plasmática de la papa, que podrían estar involucrados en la interacción con el hongo.

Actualmente, tres aspectos de la interacción papa-*Phytophthora infestans* están siendo estudiados e integrados a partir de un análisis fisiológico-molecular: 1) La composición del sistema proteolítico extracelular secretado por las estructuras infectivas del hongo y su rol en el reconocimiento patógeno-hospedador y en la inducción de la respuesta hipersensible (RH). Se ha detectado actividad de serín proteasas con capacidad inductora de necrosis sobre hojas de papa; 2) El rol del hierro y la expresión de ferritina en papa, relacionados con la generación de especies reactivas de oxígeno durante las respuestas de defensa de la planta y además, en el control del crecimiento del patógeno. Se ha clonado la ferritina de papa y se ha observado un aumento en el contenido de su transcrito en el transcurso de la infección. Una colaboración con el grupo del Dr. Mentaberri (INGEBI) buscará obtener plantas de papa que sobreexpresen ferritina con el objeto de contar con otra herramienta que contribuya a dilucidar el rol del Fe en este pato-sistema; y 3) La expresión y regulación génica de proteínas mitocondriales y su relación con la inducción de RH y de muerte celular durante el desarrollo de las respuestas de defensa de la planta.

EFFECTOS DEL OXIDO NITRICO EN PLANTAS

M.V. Beligni, C. García-Mata, A.M. Laxalt, M. Graziano, L. Lamattina

Instituto de Investigaciones Biológicas, F.C.E. y N., UNMdP.

CC 1245, 7600 Mar del Plata, Argentina.

Fax: 54 223 475 3150, e-mail: lolama@mdp.edu.ar

El óxido nítrico (ON) es una molécula bioactiva con muchas funciones muy bien descritas en animales. Ha probado ser tóxico contra microorganismos en células del sistema inmune, combatiendo así procesos infecciosos. Estas evidencias nos indujeron a probar los efectos del ON como molécula señal y en la prevención y/o control de las enfermedades en plantas. Trabajando sobre el pato-sistema papa-*Phytophthora infestans*, descubrimos que el ON no era capaz de detener la infección, pero los niveles de clorofila eran fuertemente protegidos en las hojas infectadas. La hipótesis planteada consideró al ON como una molécula capaz de capturar las especies reactivas de oxígeno (ROS) que son producidas durante procesos patogénicos y que poseen efectos tóxicos sobre las plantas, entre ellos la pérdida de clorofila. Para testear dicha hipótesis, se buscaron otros modelos en que hubiese una superproducción de ROS. Los herbicidas de la familia de los metilviológenos (Diquat y Paraquat) son generadores de radical superóxido en cloroplastos y debido a ellos, rápidamente producen una rotura de las membranas cloroplásticas y una consecuente pérdida de clorofila. También se probó el peróxido de hidrógeno como otra fuente de ROS. En todos los casos, el ON fue capaz de disminuir los efectos tóxicos generados por las ROS, preservando los niveles de clorofila. Cuando se realizaron análisis bioquímico-moleculares, se encontró que el ON fue capaz de prevenir las consecuencias tóxicas generadas por el estrés oxidativo como degradación del ADN y ARN; peroxidación de lípidos; degradación de la Ribulosa, 1-5 bifosfato carboxilasa; pérdida de iones y muerte celular. En otra serie de experimentos, también pudimos demostrar que en plantas, el ON puede estimular procesos mediados por luz como reverdecimiento, elongación de hipocótilo y germinación de semillas en condiciones que son luz-dependientes. Nuestros proyectos mediatos se dirigen a confirmar la capacidad anti-oxidante del ON frente a diferentes situaciones de estrés ambiental en plantas.

ESTUDIO DE LA EXPRESIÓN DE UNA FAMILIA DE GENES DE TOMATE BAJO CONDICIONES DE ESTRÉS HÍDRICO.

L. Maskin, F. Carrari, J. Romero y Norberto Iusem.

Laboratorio de Fisiología y Biología Molecular. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, U.B.A., Buenos Aires, Argentina.

Frente a la deficiencia de agua las plantas responden de manera muy compleja, disparando mecanismos metabólicos que le permiten adaptarse a esta situación ambiental. Estas respuestas se manifiestan en cambios a niveles morfológico, fisiológico y de desarrollo. Pero antes de que el daño sea evidente, el estrés hídrico causa alteraciones en la expresión de ciertos genes.

Asr1, *Asr2* y *Asr3* son genes de tomate que responden a situaciones de estrés hídrico. Estos genes son miembros de la familia multigénica *Asr*, están localizados en el cromosoma 4 y son inducidos además por ácido abscísico y maduración.

Con el objetivo de establecer cómo responden estos genes en cada tejido de la planta a la falta de agua, se diseñaron oligonucleótidos específicos que permitieran identificar a cada ARN mensajero por separado mediante la técnica de RT-PCR. De esta manera se determinó la existencia de una expresión basal de los tres genes en hojas y raíces de plantas no estresadas. Al analizar su expresión en plantas sometidas a estrés hídrico durante 24 hs., se observó que los tres genes eran inducidos en las hojas, siendo la expresión de *Asr2* la más afectada, ya que aumentó 7 veces respecto a su expresión basal. Sin embargo la situación en el caso de las raíces mostró una drástica disminución en la expresión de los tres *Asr*, en donde *Asr1* decayó en un 90%.

Asimismo estudios preliminares de la expresión de estos genes en fruto, demostró un incremento de los tres transcritos durante la maduración del mismo.

Los resultados obtenidos aportan evidencias de una expresión diferencial de cada gen de la familia en respuesta al estrés y de que esta respuesta es además específica de tejido.

PASADO Y PRESENTE DE LAS INVESTIGACIONES RELACIONADAS CON ROYA DE LA HOJA DEL TRIGO EN EL INSTITUTO DE GENÉTICA DEL INTA CASTELAR.

Francisco Sacco. Instituto de Genética Ewald A Favret. CNIA. INTA Castelar.

Las primeras investigaciones sobre roya de la hoja del trigo, causada por *Puccinia recondita tritici*, estuvieron relacionadas con la determinación de razas fisiológicas del hongo mediante la utilización de variedades diferenciales, portadoras de genes conocidos de resistencia a este parásito. Este tipo de investigaciones estaban orientadas a brindar información sobre la variabilidad genética de las poblaciones

patógenas y su relación con las fuentes de resistencia disponibles. Estos estudios dieron origen al Ensayo Territorial de Resistencia a Enfermedades (ETRE), que durante 50 años suministró información a los fitomejoradores de trigo del país sobre el comportamiento de sus materiales frente a roya de la hoja, entre otros parásitos, y asesoró a la SAGyP con la evaluación de líneas a ser inscriptas como cultivares. Posteriormente los estudios se fueron diversificando, abarcando distintas facetas de la enfermedad entre las que pueden destacarse las relacionadas con la inducción de variabilidad genética, tanto en el hongo como en el hospedante, mediante la mutagénesis inducida. En esta etapa se avanzó en el conocimiento de las bases genéticas de la interacción hospedante patógeno, permitiendo redefinir conceptos como dominancia y recesividad en enfermedades, estimar tasas de mutaciones en roya y elaborar una nueva hipótesis de la teoría gen por gen para explicar la relación

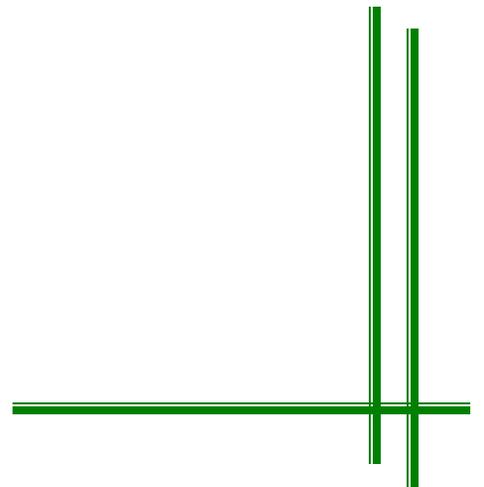
genética entre hospedante y patógeno. Las mutaciones inducidas en el patógeno permitieron también aclarar aspectos de la resistencia durable a la roya de la hoja.

Se realizaron estudios citogenéticos que permitieron localizar y mapear genes de resistencia a roya de la hoja, y establecer la importancia del dosaje génico en la interacción trigo-*Puccinia recondita*. Se aislaron también líneas de trigo con deleciones espontáneas en el cromosoma 6B de tamaños variables que han permitido formar un stock de líneas experimentales y se usan actualmente para localizar y mapear, tanto genética como físicamente, marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a roya de la hoja en ese cromosoma.

Una parte de los estudios actuales están orientados no sólo al análisis, de la variabilidad patógena en *Puccinia recondita*, sino también al análisis de la variabilidad genómica mediante el uso de marcadores moleculares. Mediante la técnica de "ARN differential display", se han aislado y clonado fragmentos de ADN expresados diferencialmente en líneas isogénicas resistentes y susceptibles a *P. recondita*. Estos estudios tienen por objetivo el conocimiento de la naturaleza de los genes de resistencia a roya y de las regiones cromosómicas portadoras de los mismos, tanto desde un punto de vista genético como molecular.

Sección VIII

PERCEPCIÓN PÚBLICA



PERCEPCIÓN PÚBLICA SOBRE CULTIVOS TRANSGÉNICOS EN MAR DEL PLATA.

Graziano, Magdalena,¹ Lanfranconi, Mariana,¹ Fabiana Consolo² y Graciela Salerno².

¹ Universidad Nacional de Mar del Plata. Funes 3350. 7600. Mar del Plata.² Centro de Investigaciones Biológicas-FIBA-INBIOP (CONICET)-Vieytes 3103. 7600. Mar del Plata. Universidad Nacional de Mar del Plata. Argentina. E-mail: fibamp@mdq.com.ar .

El crecimiento demográfico mundial crea una demanda sostenida de alimentos. Debe tenerse en cuenta que el 90% de la alimentación mundial es de origen vegetal y que la superficie cultivable actualmente será limitante para satisfacer la demanda futura. La biotecnología vegetal permitiría obtener mayores rendimientos de cultivos en igual superficie cultivable. Mediante la transformación genética de plantas se podrá mejorar alguna de sus características o añadirles nuevas propiedades comercialmente valiosas.

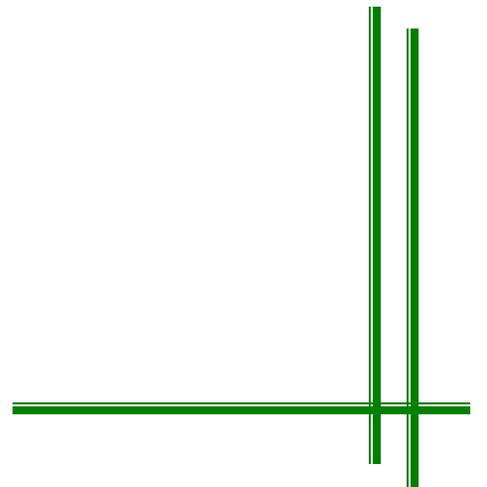
Países como EEUU, China, Canadá, Australia y Argentina han sustituido algunos cultivos tradicionales por cultivos transgénicos. Sin embargo la aceptación pública de alimentos transgénicos es un punto de controversia entre grupos ecologistas, empresas productoras e instituciones gubernamentales en países consumidores europeos y asiáticos. En la opinión pública, la percepción del riesgo es sobreestimada por la falta de conocimiento.

La Argentina ocupa el segundo lugar en el mundo con mayor cantidad de tierras destinadas a cultivos transgénicos y algunos de los productos de éstos cultivos ya están en el mercado. Se ignora cuál es el conocimiento público respecto a las plantas transgénicas y si existe aceptación del consumo de productos derivados de éstas.

Nuestro trabajo se basó en la realización de una encuesta dirigida hacia el público en general teniendo en cuenta parámetros como sexo, edad y estudios realizados, para evaluar la percepción pública sobre este tema, en Mar del Plata. De acuerdo a los resultados obtenidos será posible desarrollar actividades de extensión para el próximo año orientadas a dar información objetiva y actual hacia la comunidad sobre los cultivos transgénicos y los productos derivados de éstos.

Sección IX

Biorremediación



FITORREMEDIACIÓN: ESTUDIO DE LA DEGRADACIÓN DE COMPUESTOS AROMÁTICOS EN SISTEMAS VEGETALES

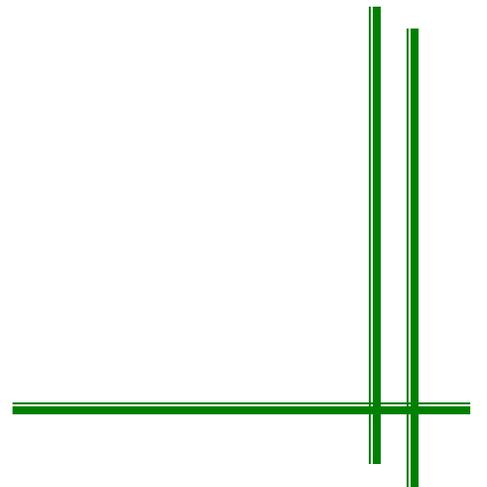
Cecilia G. Flocco & Ana María Giulietti.

Cátedra de Microbiología Industrial y Biotecnología. Facultad de Farmacia y Bioquímica, Universidad de Buenos Aires. Junín 956 6 ° (1113) Buenos Aires, Argentina. e-mail:flocco@ffyb.uba.ar

La remediación de ambientes contaminados con compuestos orgánicos es un problema global. Los compuestos fenólicos derivados de la actividad industrial y del uso de pesticidas constituyen un caso de contaminación frecuente. El rol de los vegetales en los procesos de biorremediación es cada vez más significativo. Entre los diversos mecanismos de detoxificación que poseen los mismos se encuentran las enzimas con capacidad degradativa. Entre estas se han caracterizado oxidorreductasas (peroxidasas, lacasas, tirosinasas) que son capaces de polimerizar compuestos fenólicos ya sea sobre la superficie de la raíz o en la fracción húmica del suelo. Los contaminantes quedan unidos de manera tal que no se encuentran biodisponibles y no pueden ser extraídos por procesos convencionales. El objetivo de este proyecto es estudiar los mecanismos físicos y biológicos de remoción de compuestos fenólicos en sistemas vegetales. Para ello se realizarán estudios cinéticos de remoción de los mismos, evaluando el rol de oxidorreductasas involucradas en el proceso. Asimismo se analizará la estructura de los productos formados. En una primera instancia se realizaron ensayos *in vitro* de remoción de fenol con raíces transformadas de *Azorella lappaceae* y con plántulas de alfalfa, caracterizando el rol de peroxidasas. Por otro lado se ha diseñado y optimizado el cultivo hidropónico de alfalfa. Este sistema permitirá estudiar el rol del vegetal en los procesos de degradación con una estructura vegetal completa, diferenciándolo a su vez de la acción degradadora de microorganismos.

Sección X

MISCELÁNEAS



BIOTRANSFORMACIÓN DE CÁSCARA DE GIRASOL POR HONGOS LIGNOCELULOLÍTICOS COMESTIBLES Y MEDICINALES

Director: Curvetto, Néstor

Integrantes: Figlas, Débora; Delmastro, Silvia; Devalis, Ricardo; Torrea, María; González Matute, Ramiro

Laboratorio de Fisiología Vegetal, Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur y CERZOS CONICET, 8000 Bahía Blanca, Argentina
e-mail: ficurvet@criba.edu.ar

La cáscara de girasol (18-20% de la semilla) es un residuo lignocelulósico abundante de la industria aceitera nacional y debido a su alto contenido en lignina (ca. 28%) es difícilmente degradable por microorganismos, excepto por hongos superiores que poseen ligninasas (lacasas, peroxidasas, peroxidasas dependientes de Mn) además de celulasas, y otras enzimas hidrolíticas. La posibilidad de obtener un producto de alto valor agregado tanto por su valor nutricional como por sus interesantes propiedades farmacológicas, era atractiva para proponer a un sector prácticamente inexistente de la horticultura argentina. Entonces comenzamos la investigación con hongos del complejo *Pleurotus*, Shiitake y *Ganoderma spp* con aquella finalidad.

Con este sustrato hemos propuesto un método efectivo de bajo costo para la decontaminación en masa e inoculación homogénea de semilla y demostrado la factibilidad de producir fructificación con *Pleurotus spp*, con un método particular de corrida de micelio, así como con Shiitake y *Ganoderma* . La optimización de la producción ha involucrado la prueba de corrida de micelio de distintas cepas de *Pleurotus* con nitrógeno sólo o combinado con Mn(II) y la búsqueda de cepas eventualmente más productivas usando cultivos monoesporas de *Pleurotus ostreatus* en un medio de selección con deoxiglucosa y subsiguiente apareamiento para producir a la fecha 11 cepas de oxiglucosa resistentes. La metodología de producción de "spawn" G1 en medios de cultivo líquido agitado también fue encarada como una forma de incrementar su eficiencia, en unión al estudio de producción de polisacáridos bioactivos de valor farmacológico en el caso de *Ganoderma lucidum* y *Ganoderma oregonense*. Asimismo se encontró que la colonización del sustrato con cepas de *Pleurotus spp* mejoró marcadamente la digestibilidad in vitro de la cáscara. Los resultados emergentes se han volcado en dos cursos de post-grado (UNS y CABBIO) y en un curso para emprendedores. Tenemos en formación un banco de germoplasma.

ACTIVIDAD DE EXOENZIMAS EN EL SUELO Y SU EFECTO SOBRE PLANTAS DE IMPORTANCIA AGRÍCOLA.

1Gloria Zulpa de Caire*, Rosa M. Palma**, María Cristina Zaccaro*, Mónica M. Storni de Cano*

*Facultad de Ciencias Exactas y Naturales y **de Agronomía-Universidad de Buenos Aires. E-mail: cyanob@bg.fcen.uba.ar

La actividad de las exoenzimas β -glucosidasa, ureasa, proteasa, fosfomonoterasa y arilsulfatasa producido por el agregado de biomasa y exopolisacáridos (EPS) de las cianobacterias *Tolypothrix tenuis* y *Microchaete tenera*, fue determinado en un suelo Argialboll Típico en experimentos de invernáculo.

La biomasa y EPS de *M. tenera* aumentaron la actividad de la β -glucosidasa en 4-40%. El aumento de actividad de ureasa producido por ambas cepas fue muy bajo; el de proteasa fue de 100-230%; el de fosfatasa fue de 13-27%; el de arilsulfatasa de hasta un 400% y el de la deshidrogenasa de 16-43%.

Los efectos de la biomasa son menores debido a que ésta debe sufrir lisis celular y mineralización para poder liberar endoenzimas al medio ya que los resultados mostraron una muy baja excreción de exoenzimas. La solución de EPS contenía proteínas con probable actividad exoenzimática, además de otras sustancias que tal vez se comportaron como moléculas disparadoras que estimulan la producción de exoenzimas por otros microorganismos del suelo.

En otra experiencia de invernáculo se determinó que la incorporación de EPS de ambas cepas al suelo produjo un incremento en porcentaje en el peso seco de las plántulas de maíz (vástago-raíz) a los 30 días. Similares resultados se detectaron en los contenidos de nitrógeno y fósforo del material vegetal.

BIOTECNOLOGIA DE CIANOBACTERIAS

María Cristina Zaccaro; Gloria Zulpa y Mónica Storni.

Laboratorio de Fisiología Vegetal y Laboratorio de Cianobacterias. Depto. de Cs. Biológicas, FCEN.UBA. Int. Güiraldes 2620. Pab II. 4º P (1428) Argentina. E-mail cyanob@bg.fcen.uba.ar

Nuestro grupo de investigación se formó en la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) en 1969. Con la Dra. Delia R. de Halperin, iniciamos en nuestro país varias líneas de investigación de importancia en el campo de la biotecnología, utilizando principalmente cepas que aislamos de distintos hábitats de Argentina. a) Cianobacterias en la alimentación. En la búsqueda de nuevas fuentes de proteínas, seleccionamos cepas con alto contenido proteico a fin de incorporarlas a dietas balanceadas. Dada la importancia a nivel mundial de *Spirulina* como complemento dietario, hemos determinado que puede reemplazar totalmente a un producto comercial como alimento proteico de peces. Su agregado a una ración de alimento comercial produce en la sangre de roedores un descenso en glucosa y en ácido úrico, así como un aumento del HDL, sin variar el colesterol total. b) Sustancias bioactivas. Hemos obtenido productos intra y extracelulares que: 1- inhiben el crecimiento de bacterias patógenas (*Staphylococcus aureus*) y hongos patógenos humanos (*Candida albicans*), fitopatógenos productores de damping-off (*Sclerotinia sclerotiorum* y *Rhizoctonia solani*) así como hongos del suelo (*Cunninghamella blakesleana*), 2- inducen el crecimiento de bacterias importantes en la industria láctea (*Lactococcus lactis*), la regeneración de plantas de arroz y 3- producen distintos efectos sobre semillas y/o plántulas de arroz, maíz, mijo, espinaca, soja, etc. c) Biofertilización. Se estudió la flora diazotrófica de arrozales de Entre Ríos, de biodermas algales de Chaco y Formosa y de aguas residuales de biodigestores con el objeto de obtener un fertilizante algal de bajo costo y ecológicamente seguro. Se comparó la fertilización cianobacterial con la fertilización inorgánica sobre plántulas de arroz. d) Conservación de suelos. 1- Biodermas algales, su incidencia en la consolidación y el contenido de N del suelo. A partir de biodermas naturales obtuvimos biodermas en el laboratorio sobre distintos suelos, a fin de implementar su manejo y aplicación en suelos deteriorados y 2- La adición de cianobacterias y sus exopolisacáridos a suelos erosionados aumentó de la estabilidad de los agregados como consecuencia de una mayor actividad microbiana. e) Tratamiento de aguas. El cultivo de algas en aguas residuales adquirió importancia por: la producción de biomasa a bajo costo y la purificación de las aguas por remoción asimilativa de los nutrientes. La capacidad para remover N y P de un medio mineral completo fue estudiada en cepas aisladas de aguas residuales de un biodigestor, a fin de usarlas como un paso en la purificación de aguas.

INDICE GENERAL POR EXPOSITORES

- Abedini, W. 11-12-13-38
Acevedo, A. 38-73-75
Aguilar, M. 76
Alvarez, M. L. 52
Allocati, J. P. 43
Anderson, C. M. 29
Aparicio, J. 22
Apóstolo, N. 14-31
Aprea, A. 61
Arana, M. 59
Arcas, J. 77
Arena, M. E. 15
Arias, M. 55-61
Ardila, F. 47
Asurmendi, S. 49
Avila, S. 67
Barzola, K. 44
Basigalup, D. 60
Beligni, M. V. 81
Belles, J. M. 75
Benech-Arnold, R. 53
Bernacchi, D. 72'
Berón, C. 75-77
Bigi, F. 58
Billard, C. 16
Bol, J. 48
Bonafede, M. 47-60
Bonamico, N. C. 71
Brandán, E. 61
Bravo, C. A. 14-31
Bravo Almonocid, F. 50
Brutti, C. B. 14-31
Bulacio, E. 61
Cabezas, J. A. 62
Cabral, S. 1-50-51
Calamante, G. 58
Capezio, S. 74'
Cardone, S. 7
Carletti, S. M. 14
Caro, L. A. 17
Carrari, F. 41-53-81
Carrera, A. 70
Carrillo N. 46
Carrizo de Bellone, S. 24
Carrizo, C. 32
Casalangué, C. 76-78
Caso, O. H. 30-34
Cassia, V. 79
Castagnaro, A. 61-33
Castro, P. 10
Cataldi, A. 58
Cervera, M. T. 62
Ciancio, J. R., 2-47
Coll García, Y. 61
Colombo, N. 55
Conejero, V. 75
Consolo, F. 63-83
Conti, V. 6
Corbino, G. 19
Cordo, C. 63
Costa, N. B. 56-57
Cucco, M. F. 9
Curvetto, N. 3-4-17-18-37-77-85
Daorden, M. E. 19
De la Canal, L. 54
Delhey, R. 3
Delmastro, S. 4-37-77-79-85
Dengis, A. 49
Dessy, S. 12
Detarsio, E. 45
Devalis, R. 77-79-85
Dezar, C. 67
Di Renzo, M. A. 71
Diamante, A. 5-20-21-22-46
Díaz, D. G. 2-71
Díaz, L.. 23-24
Díaz, M. 39
Díaz Paleo, A. 38-75
Diaz Ricci, J. C. 33-61
Diéguez, M. J. 55
Digonzelli, P. 23-24
Distel, S. 74'
Divo de Sesar, M. 0-25-26-27
Dubcovsky, J. 68
Durán-Vila, N. 56

Echaide, M. 74
Echenique, V. 6-7-8-17-39-64
Escandón, A. 41-42-46
Espinosa Vidal, E. 54
Espósito, J. 26
Fabiani, A. 29
Farías, R. 33
Fayos, J. 75
Feingold, S. 74'
Fernandez, L. 74
Fernandez, P. 74
Fernández-Maillot, E. A. 79
Ferri A.M. 47
Figlas, D. 77-79-85
Filippone, M. P. 33-61
Flocco, C. 84
Franzone, P. 2-43-47-59
Galliussi, E. 13
Gamboa, S. 61
García-Mata, C. 80
Giarrocco, L. 63-65-66
Giulietti, A. M. 25-32-34-36-84
Godoy, V. 78
Gomez, M. C. 2-47
Gonsalvez-Bernal, B. 48
González Matute, R. 79-85
Graziano, M. 80.83
Guelman, S. 45-52
Guido, A. 13
Halford, N. 52
Heinz, R. 73
Hernández, L. F. 17
Hopp H.E. 49-68-69-72-73-74
Huarte, M. 00-74'
Humble, A. 6
Iusem, N. 53-81
Kato, A. E. 25-26-27
Kiehr, M. 3
Kirschbaum, D. 61
Kobayashi, K. 58
Lallana, V. H. 15
Lamattina, L. 79-80.
Lanfranconi, M. 83
Laxalt, A. M. 80
Lede, S. 11
Lewi, D. 41-43
Lijavetzky, D. 53-69-73-74
Linthorst. H. 48
Livore, A. B. 67
López Bilbao, M. 74
López, N. 41-42
López, M. E. 45
Lucca, M. F. 69
Luciani, G. 4-18
Luppi, J. P. 44
Lúquez, J.
Lustig, S. 45-52
Llorente, B. E. 14-31
Madrid, E. A. 79
Mamani de Marchese, A. 33-61-64
Manghers, L. 55
Manifesto, M. M. 68
Marano M.R. 46
Marconi, P. 34
Marcucci Poltri, S. 68
Marinangeli, P. 3-4-17-18-37
Marinucci, L. 11-13
Marrero, R. 38
Martínez, M. C. 59-69-73
Martinez Arias, F. 23
Martínez Novillo, J. 61
Martínez-Zapater, J. M. 62
Maskin, L. 41-81
Mattia, V. 12
Melito, V. 25
Mentaberry, A. 1-44-50-51-58
Miranda, R. 6
Mockel, G. 4
Molina, N. 20-21
Morris, L. 67
Mroginski, L. 7-61-64
Muñoz, M. 74
Nishinakamasu, V. 74
Noguera, A. 23
Olmos, S. 64
Ontivero, M. 61
Ornella, L. 68
Osorio, R. H. 10
Ottado, J. 46
Palma.M. 86
Paniego, N. 73-4
Paris, R. 79
Parsons, P. 35
Perez-Flores, L. 53

Permingeat, H. R. 45
Pitta-Alvarez, S. 32-36
Pizarro, G. 70
Plata, M.I. 28-29-56-57-67
Polci, P. 6-7-8-17-39
Portas de Zamudio, A. 23-24
Poverene, M. 70
Prina, A. 55-59
Puecher D. 59-71
Radice, S. 34
Rech, E. 40
Regente, M. 54
Reggiardo, M. I. 45-46-52
Rigato, S. 00
Ríos, R. 2-47-55-59-60
Rivas, C. 13
Rivera, S. 13
Robredo, C. G. 2-59-60-71-77
Rodriguez Talou, J. 32-35-45-48
Romagnoli, M.V. 45
Romero, J. 81
Romero, M. 12
Romero, V. 49
Romo, C. L. 45
Rossi Jaume, A. 9.
Ruscitti, M. 11-13
Ryabushkina, N. 52
Sacco, F. 82
Saione, H. 55
Salazar, S. 61
Salerno, G. 61-62-63-65-66-77-83
Salerno, J.C. 2-71-43
San Segundo, B. 78
Schlatter, A. R. 68
Semorile, L. 56
Sergeren, M. 4
Sharry, S. 11-12-52
Shewry, P. 52
Sosa, S. 23
Spollansky, T. 36
Stein, J. 52
Stella, A. M. 0-25-27
Storni de Cano, M. 0-86
Suarez, E. Y. 68
Taboga, O. 58
Tami, C. 58
Tejera, A. 42
Terada, G. 61
Tesón, N. 28
Torales, S. F. 68
Torrea, M. 79-85
Torres, R. 12
Torroba, M. C.
Tozzini, A. C. 69-73
Traversaro, M. 12
Turica, M. 43
Ulanovsky, S. 10
Vacca Molina, M. 72
Valdez, J. G. 10
Vallejos, R. H. 45-52
Vázquez-Rovere, C., 49
Vellicce, G. 61
Vera Bravo, C. 5-20-21-22-46
Verpoorte, R. 48
Verna, F. 58
Veberne, M. 48
Vilella, F. 25-26-27
von Haneil-Niethammer, F. 68
Weilenmann de Tau, M. E. 66
Zaccaro, A. 0-86
Zaltz, P. 1-51
Zanetti, M. E. 78
Zappacosta, D. 3-37
Zazzaro, A. 78
Zembo, J. C. 61
Zubrzycki, H. 5-46
Zulpa de Caire*, G. 0-86