

# Efecto de la kanamicina en la germinación y desarrollo de la boca de dragón (*Antirrhinum majus*)

(Recibido: 29/04/2016; Aceptado: 06/06/2016)

Terry López M.I.; Weiss J.; Egea-Cortines M.  
 Universidad Politécnica de Cartagena, Instituto de Biología Vegetal, Genética Molecular.  
 Plaza del Hospital Plaza del Hospital s/n, 30202  
 Teléfono de contacto: 868071085  
 Email: mitl0@alu.upct.es

**Resumen.** Los organismos modificados genéticamente (GMO, en inglés) son de gran importancia en investigación. En plantas, se utilizan ciertas bacterias que transfieren un plásmido capaz de silenciar un determinado gen y además confiere resistencia a un antibiótico haciendo posible la selección de estos GMO; sin embargo el uso de estos antibióticos puede alterar y retrasar la germinación y el desarrollo de estas plantas, aún en aquellas que son resistentes a dicho antibiótico.

**Palabras clave.** LHY; reloj circadiano; silenciamiento.

**Abstract.** Genetically modified organisms (GMO) are important in research. In plants, certain bacteria transferring a plasmid capable of silencing a particular gene are used and confers resistance to an antibiotic enabling the selection of these GMO; however the use of these antibiotics can modify and delay germination and development of these plants even those that are resistant to that antibiotic.

**Keywords.** Circadian clock; LHY; silencing.

## 1. Introducción

Los organismos modificados genéticamente ofrecen una herramienta importante en investigación, mediante su uso, es posible mutar, insertar o silenciar genes. En plantas es muy común utilizar bacterias fitopatógenas, como *Agrobacterium tumefaciens* [1] para silenciar o sobreexpresar un determinado gen; en la transformación de estas plantas se suele usar además un gen que confiere resistencia a un determinado antibiótico de manera que se pueda utilizar dicho antibiótico para seleccionar aquellas plantas que han sido transformadas correctamente [2].

La boca de dragón (*Antirrhinum majus*), es una planta de interés ornamental y modelo en diversos estudios, como el desarrollo floral [3], la síntesis de pigmentos [4] o la emisión de compuestos orgánicos volátiles [5].

El objetivo del presente trabajo es determinar los posibles efectos sobre la germinación y el crecimiento derivados del uso de antibióticos, kanamicina en este caso, en la selección de plantas transgénicas.

### 1.1. Abreviaturas y Acrónimos

kan: kanamicina, LHY: late elongated hypocotyl, T1: primera generación, T2: segunda generación, S50: Sippe 50

## 2. Materiales y métodos

Semillas de boca de dragón de una línea silvestre (Sippe 50, control), tres (primera generación, T1) y

dos (segunda generación, T2) líneas transgénicas independientes fueron sembradas en placas Petri. Estas placas contenían medio MS (control) y medio MS con kanamicina (50 mg/ litro) (Tabla 1). En estas plantas transgénicas, se silenció el gen *LHY*, éste forma parte del bucle central del reloj circadiano. Las placas se mantuvieron con fotoperiodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Tras 5 días, se inició el recuento para determinar cuántas de estas semillas iban germinando y se repitió el conteo a lo largo de dos semanas. Tres semanas después se trasladaron parte de estas plántulas a macetas con turba, el resto se dejaron en las placas.

Se midieron las plantas que quedaron en estas placas (longitud total) y las plantas trasladadas a maceta (número de entrenudos, altura hasta el primer entrenudo y distancia entre los dos primeros entrenudos) en las fechas indicadas (Tabla 2).

Tabla 1. Semillas totales sembradas.

	Sippe 50	T1	T2
MS	15	23	59
MS kan	10	27	24

Tabla 2. Número de semillas sembradas (columna izquierda) y mediciones realizadas (columnas central y derecha).

	22/12/2015	11/01/2016	10/02/2016
Placas	181	10	-
Macetas	-	28	28
Medidas	-	Plantas en placa	Plantas en maceta

### 3. Resultados

#### 3.1. Germinación

El porcentaje de germinación fue similar en las líneas transgénicas en ambos medios, exceptuando algunas semillas de la T2 que probablemente no estaban en buenas condiciones; en cambio la germinación fue menor en la línea silvestre en medio con kanamicina en comparación con el medio control (Tabla 3) [6]. Por otro lado, la germinación fue ligeramente más rápida en los medios controles, tanto para las plantas silvestres como para las transgénicas.

Tabla 3. Porcentaje de germinación. Se muestran los resultados de Sippe 50 y las tres líneas independientes (T1).

	S50	T1-14	T1-26	T1-27
MS	80	100	100	85,71
MS kan	50	100	100	80

#### 3.2. Crecimiento

Las plantas que germinaron en el medio con kanamicina, tanto las que se quedaron en placas como las trasplantadas a macetas mostraron un desarrollo menor [7, 8].

En el caso de las plantas mantenidas en medio de cultivo, exceptuando la línea 27, la longitud total fue hasta 10 veces menor en medio con kanamicina (Fig. 1).

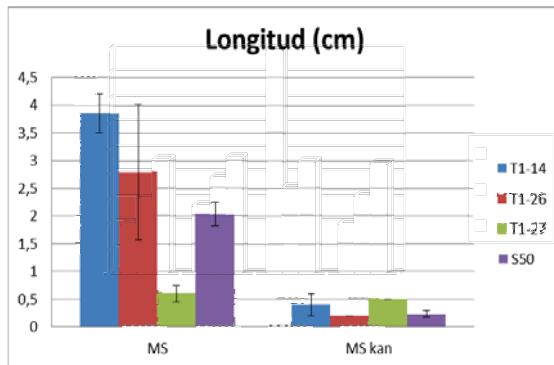


Fig. 1. Longitud total. Cada barra representa el promedio de 3 plantas  $\pm$  SD.

Las plantas trasplantadas mostraron una diferencia en el desarrollo tras un mes en maceta, dependiendo de si germinaron en medio con kanamicina o no. Además, algunas de las plantas trasplantadas desde el medio con kanamicina se secaron (Fig. 2).

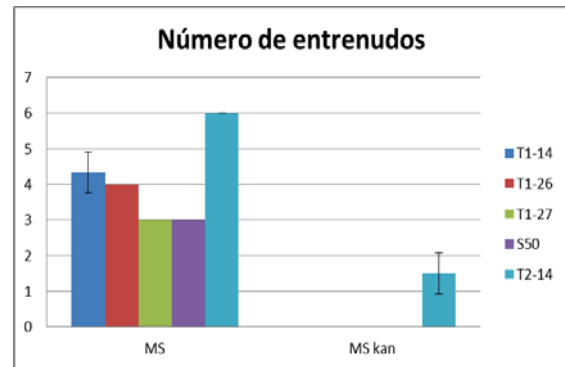


Fig. 2. Número de entrenudos. Cada barra representa el promedio de 3 plantas  $\pm$  SD.

### 4. Conclusiones

Una baja concentración de antibióticos, aunque no inhiba por completo la germinación y el desarrollo en plantas no transformadas, es suficiente para retardar el crecimiento.

Estos efectos sobre el crecimiento deben de tenerse en cuenta a la hora de caracterizar una población transgénica. Por otro lado el menor tamaño de las plantas que han sobrevivido a KAN podría deberse a la inhibición del gen *LHY*.

### Referencias

- [1] De Block, M., De Brouwer, D., & Tenning, P. (1989). "Transformation of Brassica napus and Brassica oleracea using Agrobacterium tumefaciens and the expression of the bar and neo genes in the transgenic plants". Plant Physiology, pp. 694-701, vol. 91(2).
- [2] Vittorioso, P., Cowling, R., Faure, J. D., Caboche, M., & Bellini, C. (1998). Mutation in the Arabidopsis PASTICCINO1 Gene, Which Encodes a New FK506-Binding Protein-Like Protein, Has a Dramatic Effect on Plant Development. Molecular and cellular biology, 18(5), 3034-3043.
- [3] Sommer, H., Beltran, J. P., Huijser, P., Pape, H., Lönnig, W. E., Saedler, H., & Schwarz-Sommer, Z. (1990). "Deficiens, a homeotic gene involved in the control of flower morphogenesis in Antirrhinum majus: the protein shows homology to transcription factors". EMBO Journal, pp. 605-613, vol. 9(3).
- [4] Jackson, D., Roberts, K., & Martin, C. (1992). "Temporal and spatial control of expression of anthocyanin biosynthetic genes in developing flowers of Antirrhinum majus". The Plant Journal, pp. 425-434, vol. 2(4).
- [5] Dudareva, N., Martin, D., Kish, C. M., Kolosova, N., Gorenstein, N., Fäldt, J., ... & Bohlmann, J. (2003). "(E)- $\beta$ -ocimene and myrcene synthase genes of floral scent

- biosynthesis in snapdragon: function and expression of three terpene synthase genes of a new terpene synthase subfamily". *The Plant Cell*, pp. 1227-1241, vol. 15(5).
- [6] Liu, F., Ying, G. G., Tao, R., Zhao, J. L., Yang, J. F., & Zhao, L. F. (2009). "Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities". *Environmental Pollution*, pp. 1636-1642, vol. 157(5).
- [7] Yepes, L. M., & Aldwinekle, H. S. (1994). "Factors that effect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis". *Plant cell, tissue and organ culture*, pp. 257-269, vol. 37(3).
- [8] Fatta-Kassinos, D., Meric, S., & Nikolaou, A. (2011). "Pharmaceutical residues in environmental waters and wastewater: current state of knowledge and future research". *Analytical and bioanalytical chemistry*, pp. 251-275, vol. 399(1).