

## Comportamiento de diferentes explantes de arroz (Variedad IACuba-28) en la transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens*

Maylin Pérez\*, Daymi Abreu, Annerys González, Julio Alfonso y Raúl Armas. \*Autor para correspondencia.

Grupo de Plantas y Enzimas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus.  
e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

### RESUMEN

En este trabajo se describe el comportamiento de cuatro tipos de explantes de arroz: coleoptilos, callos embriogénicos, callos primarios y embriones maduros, en la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*. Como parámetro para evaluar la eficiencia de transformación se utilizó la actividad GUS. Los mejores resultados se obtuvieron con los callos embriogénicos, con un 37% de eficiencia de transformación y un promedio de 11.20 puntos azules por callo transformado. En los callos primarios y los coleoptilos también fue detectada la expresión de la  $\beta$ -Glucuronidasa, pero no fue así en los embriones, donde la infección bacteriana causó daños tisulares importantes. Se demuestra la versatilidad del procedimiento de transformación aplicado en diferentes tejidos de la variedad de arroz IACuba-28.

Palabras clave: actividad transitoria,  $\beta$ -Glucuronidasa, callos embriogénicos

### ABSTRACT

The present work describes the behavior of four rice explants: coleoptiles, embryogenic calli, earliest calli and mature embryos, in genetic transformation via *Agrobacterium tumefaciens*, applying the protocol established for Cuban rice cultivar in our laboratory. We used GUS activity as a signal for measuring transformation efficiency. The best results were obtained with embryogenic calli, in which transformation efficiency was 37 %, and an average of 11.20 blue spots per transformed calli was obtained. In coleoptiles and earliest calli was detected  $\beta$ -Glucuronidase expression, but it was not detected in mature embryos, whose tissues were affected seriously by bacterial infection. We demonstrated the versatility of this transformation procedure in different tissues of IACuba-28 rice cultivar.

Key words:  $\beta$ -Glucuronidase, embryogenic calli, transient activity

### INTRODUCCIÓN

Debido a su sencillez y bajo costo, en comparación con los métodos de transformación directa, la transformación genética de plantas mediante *Agrobacterium tumefaciens* ha sido un método de extensa aplicación. Los numerosos eventos de transformación de especies monocotiledóneas logrados por esta vía han despertado la atención de los investigadores, en su afán de desarrollar métodos de transformación estable en especies de interés agronómico. Dentro de estas una de las más importantes es el arroz, el principal cereal cultivado en el mundo, y del que se han referido evidencias irrefutables de transformación genética mediante *Agrobacterium tumefaciens* (Rainieri *et al.*, 1990; Hiei *et al.*, 1994; Rashid *et al.*, 1996).

Hasta la fecha se ha establecido con éxito el cultivo *in vitro* varios explantes de variedades cubanas de arroz, especificando los procedimientos para la regeneración y propagación eficiente de las plantas en estas condiciones (Coll *et al.*, 1996, 1997, 1998), siendo este el punto de partida para la aplicación de protocolos de transformación genética que permitan introducir genes de importancia agrícola en estas variedades.

El presente trabajo se refiere al uso de *Agrobacterium tumefaciens* para la transformación genética de diferentes explantes de arroz (variedad IACuba-28): coleoptilos, callos embriogénicos, callos primarios y embriones maduros, con el objetivo de determinar la eficiencia de transformación en cada uno de ellos y seleccionar el más factible a utilizar en el mejoramiento por ingeniería genética de esta importante especie cultivable.

### MATERIALES Y METODOS

Los explantes utilizados fueron: coleoptilos, callos embriogénicos, callos primarios y embriones maduros, todos obtenidos a partir de semillas maduras de arroz (variedad IACuba-28), de acuerdo con los siguientes procedimientos:

Los coleoptilos fueron inducidos en medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con 3 g.l<sup>-1</sup> de Phytigel (Sigma, S.A.) en condiciones de oscuridad a  $27 \pm 1$  °C. A los tres días se cortaron asépticamente las regiones basales de los coleoptilos y se utilizaron para la infección con *A. tumefaciens*.

Los callos embriogénicos se formaron en medio de cultivo N6 (Chu *et al.*, 1975) modificado (medio N6-2), que contenía 2 mg.l<sup>-1</sup> de 2,4-D, 1 g.l<sup>-1</sup> de hidrolizado de caseína, 30 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa y solidificado con 3 g.l<sup>-1</sup> de Phytigel. A los 20 días de cultivo se seleccionaron para la transformación genética las regiones con estructuras globulares de 2-3 mm de diámetro, embriogénicas y fácilmente disgregables.

Para la inducción de los callos primarios, se incubaron las semillas en medio de cultivo N6-2 con 0.112 g.l<sup>-1</sup> de vitaminas Gamborg y se utilizó 4.5 g.l<sup>-1</sup> de agarosa como solidificante. A los cuatro días se escogieron para la transformación las estructuras típicas en forma de concha y muy compactas y duras.

Los embriones maduros fueron inducidos en el medio de cultivo MS utilizado para los coleoptilos, durante 30 horas a 28°C en la oscuridad. Al cabo de ese tiempo los embriones fueron separados cuidadosamente de la semilla, para ser sometidos al proceso de transformación.

Para la transformación genética se utilizó la cepa EHA105 de *Agrobacterium tumefaciens*, portando el vector pCAMBIA1301 que contiene al gen GUS bajo el promotor CaMV 35S. El cultivo de la bacteria se estableció en 50 ml de medio de cultivo AB líquido (Hiei *et al.*, 1994) que contenía los antibióticos apropiados y 100 mM de acetosiringona, y se mantuvo durante tres días a 28°C.

El pellet bacteriano obtenido fue resuspendido en medio de cultivo MS líquido, con 68.6 g.l<sup>-1</sup> de sacarosa, 36 g.l<sup>-1</sup> de

glucosa, 0.5 g.l<sup>-1</sup> de hidrolizado de caseína, y los aminoácidos del medio de cultivo AA (Hiei *et al.*, 1994). En esta suspensión se embebieron los explantes durante diez minutos.

En todos los casos el cocultivo bacteria-explante transcurrió durante tres días a 20°C, en medio de cultivo N6-2 con 100 mM de acetosiringona. Al cabo de este tiempo, se lavaron los explantes tres veces con agua destilada estéril, agitando suavemente, y se les aplicó un lavado final incluyendo 500 mg.l<sup>-1</sup> de cefotaxima para eliminar la bacteria remanente.

Los explantes lavados se sometieron inmediatamente al ensayo de actividad transitoria GUS, según Jefferson (1987). Los puntos azules se observaron con la ayuda de un microscopio estereoscópico Kyowa.

De esta forma se realizaron tres transformaciones por variante, con 100 explantes cada una.

Se evaluó la eficiencia de transformación, referida al porcentaje de explantes con al menos un punto azul respecto al total cocultivado con *A. tumefaciens*, y se determinó el promedio de puntos por explante y el porcentaje con regiones azules.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la tabla 1 se observa que fue detectada la actividad transitoria GUS en los coleoptilos y en los dos tipos de callos después del cocultivo tres días con *Agrobacterium tumefaciens*, no siendo así en los embriones maduros, en los que no fue visualizado ningún punto azul que indicara actividad transitoria.

Tabla 1. Resultados de actividad transitoria GUS en diferentes explantes de arroz (Variedad IACuba-28) cocultivados con *Agrobacterium tumefaciens*.

Tipo de explante	(*)Eficiencia de transformación (%)	(*) Promedio de puntos azules por explante transformado	Explantes con regiones azules (%)
Coleoptilos	19.11(±0.53)	6.45 (±0.66)	1.08
Callos embriogénicos	37(±0.81)	11.20 (±1.12)	23.92
Callos primarios	10.24(±1.06)	1.83 (±0.48)	0
Embriones maduros	0	0	0

(\*) Los datos representan las medias ± error standard de tres réplicas experimentales.

En los coleoptilos se observó la expresión transitoria del gen foráneo principalmente en la región cercana al corte basal, donde se produjo la herida que favoreció la penetración del *Agrobacterium* en el tejido. En este tipo de explante se logró una eficiencia de transformación de un 19.11 %.

En los callos embriogénicos se alcanzó un 37% de eficiencia, la mayor de todos los experimentos realizados. En algunos callos se percibieron a simple vista regiones azules, se conoce que estas son más frecuentes cuando se realiza la tinción histoquímica varios días después de la transformación, al ocurrir

la división celular. El hecho de encontrar regiones teñidas en estadios tempranos de la transformación, sugiere que este tipo de explante puede aportar una cantidad significativa de células susceptibles a ser transformadas por *Agrobacterium tumefaciens* para producir la expresión transitoria de la proteína  $\beta$ -Glucuronidasa en arroz. Estas células transformadas se multiplican rápidamente para formar grupos que colorean de azul amplias regiones del callo luego de la tinción histoquímica.

El valor promedio de eficiencia de transformación en los callos embriogénicos fue comparable con los referidos por otros investigadores en otras variedades (Hiei *et al.*, 1994; Rashid *et al.*, 1996). En correspondencia con la mejor eficiencia, se lograron en los callos embriogénicos los promedios más altos de puntos azules por callo transformado (Tabla 1).

En los callos primarios también se observó la expresión de la  $\beta$ -Glucuronidasa pero con una eficiencia mucho menor. En este caso no se formaron regiones azules, por lo que los eventos de transformación ocurrieron en células aisladas y con una baja frecuencia. La estructura compacta y endurecida que caracteriza este tipo de callos puede limitar la penetración de la suspensión bacteriana en el tejido, y esto explica el comportamiento observado, por lo que se ha recomendado la transformación de estos callos por métodos directos como el microbombardeo, teniendo en cuenta la ventaja que tienen de ser inducidos de forma rápida y con gran capacidad para regenerar plantas (Alfonso-Rubí, 1999).

En los embriones se observó que la infección bacteriana causaba daños tisulares visibles, con coloración oscura y escaso crecimiento. No se detectaron puntos azules en ningún caso, probablemente por la necrosis de la gran parte del tejido embrionario. En próximos experimentos podría manipularse la concentración de bacteria y el tiempo de infección y cocultivo, entre otros factores incidentes, a fin de establecer las condiciones particulares de transformación de este explante.

Con este trabajo se demostró que los callos embriogénicos constituyen el explante de elección para la transformación genética de la variedad IACuba-28 de arroz, vía *Agrobacterium tumefaciens*, por lo que es factible la utilización de los mismos en el protocolo de transformación con miras a obtener un mayor número de células transformadas que sean capaces de regenerar plantas transgénicas portadoras de genes de interés agrícola.

## REFERENCIAS

- Alfonso Rubí J (1999) Transformación biobalística de cultivares Indica y Japónica de *Oryza sativa L.* Selección en higromicina y expresión estable del inhibidor de tripsina de cebada BTI-Cme (Gen Itr1). Tesis para optar por el Título de Doctor Ingeniero Agrónomo. Universidad Politécnica de Madrid. España
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Chu CY, Bin FY (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Scient. Sin.* 18: 659-668
- Coll Y, González A, Alfonso J, Armas R, Pujol M (1996) Improvement of Indica rice plant regeneration from callus through manipulation of culture conditions. *Biotechnología Aplicada*. 13:4
- Coll Y, González A, Alfonso J, Armas R, Pujol M (1997) Callus induction from indica rice coleoptiles. *International Rice Research Notes*. 22:17
- Coll Y, González A, Alfonso J, Armas R, Pujol M (1998) Improvement of indica rice (*Oryza sativa L.*) *in vitro* regeneration efficiency from callus mediated by stress. *Cereal Research Communications*. 6(2):153-160
- Hiei Y, Ohta S, Komary T, Komashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa L.*) mediated by *Agrobacterium* sequence analysis of the boundaries of the T-ADN. *Plant J*. 6:271-282.
- Jefferson RA (1987) Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system. *Plant Mol. Biol. Rep.* 5:387-405
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15:473-479
- Raineri DM, Bottino P, Gordon MP, Nester EW (1990) *Agrobacterium*-mediated transformation of rice. *Bio/Technology* 8:33-38
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K, Hinata K (1996) Transgenic plants production mediated by *Agrobacterium* in Indica rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727-730