

E. Tabares, L. Fory, L. Duque, F. Angel, G. Delgado, and Z. Lentini
CIAT. A.A. 6713. Cali, Colombia. E-mail: Z.Lentini@cgiar.org

Introducción

Durante la última década se han desarrollado métodos eficientes de transformación genética de arroz; incluyendo biolística y *Agrobacterium*. Reportes recientes han mostrado igualmente una alta eficiencia de transformación con estos métodos en otros cereales económicamente importantes tales como maíz, trigo, y cebada.

El sistema de transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* es utilizado en la actualidad como consecuencia de su eficiencia de transformación, sus modelos simples de integración y una mayor fertilidad en las plantas regeneradas comparado con el sistema de biolística. El CIAT esta adoptando esta tecnología para la transformación de variedades locales de arroz tales como el arroz *indica* (riego) adaptado a las condiciones de inundación y el arroz *japónico* adaptado a suelos ácidos (sabana) y ambientes de ladera. La investigación fue iniciada en 1998 revisando los protocolos establecidos para arroz (Hiei et al., 1994-1997; Aldemita y Hodges, 1996; Toki, 1997) e introduciendo las modificaciones necesarias para la transformación de los genotipos seleccionados por el programa de mejoramiento de arroz.

Objetivo

El principal objetivo de este trabajo es establecer un análisis comparativo en la eficiencia de transformación de arroz adaptado a diferentes ecosistemas de América latina, mediante las técnicas de biolística y *Agrobacterium*.

Metodología

Material vegetal

Callos embriogénicos derivados de semilla madura e inmadura de las variedades *indica* Cica-8, IR-72, INIAP 12, Palmar, Cimarrón, Fundarroz PN1, y *japónica* CT-6241-17-1-5-1, CT10069 y Lastisday Fofifa, fueron utilizados en el presente estudio.

Transformación y Regeneración de planta

La transferencia directa de los genes *gus* e higromicina fue realizada utilizando el sistema de bombardeo de partículas. Experimentos de co-transformación fueron realizados utilizando el constructo *pAct1D* (McElroy et al., 1990) que contiene el gen reportero *gus* bajo el control del promotor actina-1 del arroz, y un vector constituido por el gen *hph* el cual codifica para la resistencia a higromicina (Hyg). Este gen esta dirigido por el promotor 35S del CaMV (Fig.1A- y 1B). Así mismo se empleo la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens* que contiene el plásmido *pTOK233* con los genes 35S-hph-35S-Gus intron (Hiei et al., 1997). También fue empleada la cepa Agl1 (Wang et al., 1997) que contenía el plásmido *pCambia 1301* o *pWBCVec8*. El plásmido *pCambia 1301* contiene los genes 35S-hph-35S-Gus intron mientras el plásmido *pWBC Vec8* contiene el gen 35S-hph cat intron (Wang et al., 1997). Varias modificaciones del protocolo original para *Agrobacterium* descrito para la transformación de arroz, fueron introducidas para optimizar la eficiencia de transformación de los genotipos seleccionados (Hiei et al., 1994-1997; Aldemita y Hodges, 1996; Toki., 1997). Las plantas fueron regeneradas después de la selección en 30-50 mg/L de higromicina B y desarrolladas en el invernadero de bioseguridad hasta su evaluación agronómica (Fig. 2A)

Análisis Molecular de la herencia

La herencia de los genes *gus* e *hph* fue determinada en las generaciones de plantas T0, T1 y T2. La prueba histoquímica para la expresión del gen *gus*, se realizó en las raíces y hojas de las plantas T0 provenientes de diferentes eventos de transformación, así como en las progenies T1 y T2 provenientes de la autopolinización (Fig. 1C). Para el gen *hph*, las semillas derivadas de plantas T0 fueron germinadas durante tres semanas en el medio de selección NB-A que contenía higromicina 50mg/L. En este período las plantas no transformadas murieron (Fig.1D). Para determinar la integración de los transgenes en el genoma del arroz, las plantas fueron analizadas mediante la prueba de Southern blot.

Resultados y Discusión

Plantas transgénicas de arroz tipo *indica* y *japónica* fueron obtenidas mediante la técnica de biolística o de *Agrobacterium*. No se observaron mayores diferencias en el porcentaje de callos resistentes a higromicina (Cuadro 1). En contraste, comparando los dos sistemas de transformación, se observó un incremento en la regeneración de plantas resistentes a higromicina de 6-9 veces. Por ejemplo la eficiencia de transformación para el arroz tipo *indica* fue 14-17 veces más alta utilizando *Agrobacterium* comparado con biolística (Cuadro 1). La eficiencia de transformación para *indica* con *Agrobacterium* es similar al de *japónica* con bombardeo de partículas. La integración de los transgenes en el genoma tipo *indica* y *japónica* se determinó mediante el análisis de Southern blot, la cual osciló entre el 50% y 100% de las plantas regeneradas, dando una eficiencia de transformación de 13 a 26% (Cuadro 1). En general las plantas obtenidas mediante transformación con *Agrobacterium*, mostraron inserciones simples mientras que con el sistema de biolística presentaron inserciones múltiples (Figura 3, Cuadro 1). Los análisis de la herencia para el gen *gus* y el gen *hph* indicaron que al utilizar el sistema de transformación por biolística entre 40% y 60% de las plantas T1 mostraron segregación desviada de los transgenes, mientras que con el sistema de *Agrobacterium* entre 70% y 100% de las plantas T1 mostraron herencia Mendeliana. Patrones de herencia similar fueron observados en las generaciones T2 y T3. En las líneas transformadas por biolística la co-expresión de resistencia a higromicina (Hyg^r) y *gus* fue registrada en 50% de las plantas, mientras las de *Agrobacterium* fue del 80%. Las evaluaciones agronómicas y moleculares en las plantas de las generaciones T2 y T3 mostraron la expresión y estabilidad de la herencia de los genes. Igualmente se han identificado líneas con un alto potencial de rendimiento.

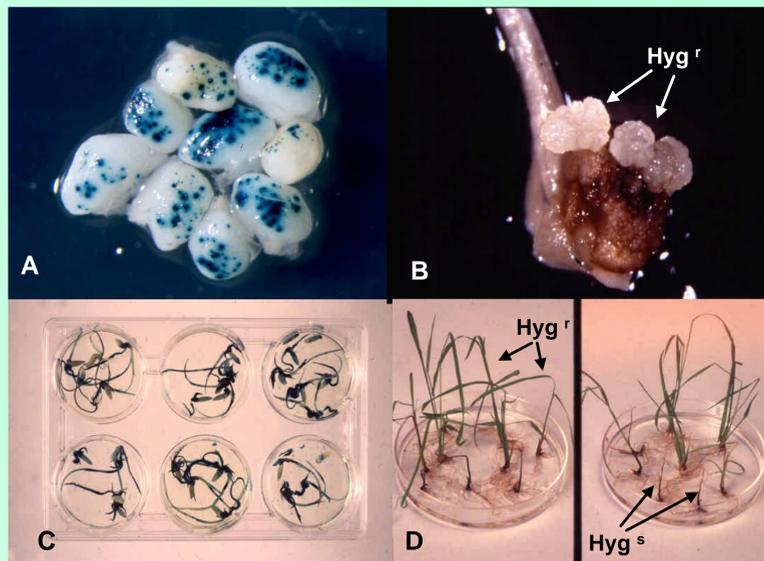


Figura 1. (A) Expresión de *gus* en callos derivados de semilla madura. (B) Callos resistentes formados después de la selección en 50 mg/L de higromicina. (C) Expresión del gen *gus* en plántulas T1. (D) Análisis de la herencia Mendeliana en plántulas T1 resistentes al gen de higromicina (Hyg^r = resistente; Hyg^s = susceptible).

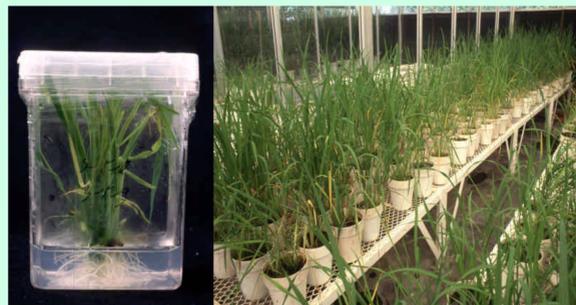


Figura 2. (A) Plantas transgénicas de arroz regeneradas en higromicina (50 mg/l). (B) Desarrollo de plantas transgénicas T2 y T3 en el invernadero de Bioseguridad.

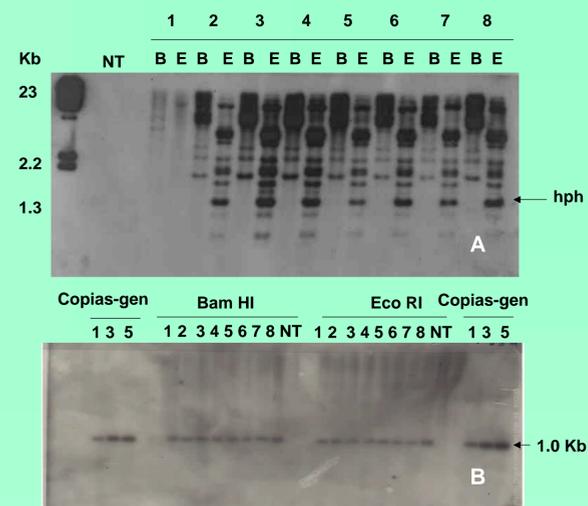


Figura 3. Southern blot de plantas transgénicas de la variedad Cica-8 que contienen los genes *gus* e *hph* utilizando (A) Bombardeo de partículas E= DNA cortado con EcoRI (fragmento del gen *hph*, 1.3 Kb), B =DNA digerido con Bam HI (plásmido linearizado); o (B) Transformación por *Agrobacterium*. NT= control no transgénico.

Table 1.- Eficiencia en la Transformación de Arroz Usando *Agrobacterium tumefaciens* o Bombardeo de Partículas

Método/ Genotipo	Cepa/ plásmido	Callos Hyg ^r (%)	Plantas/ Callos Hyg ^r (%)	Plantas/ Explanje	Plantas Southern* (%)	Eficiencia (%)	Patrón Integración
Agrobacterium							
<i>Indica</i>	LBA4404 pTOK233	60 (33)	43 (17)	26	50-100	13-26	simple
<i>Indica</i>	Agl1 pCambia 1301	39 (5)	57 (18)	22	80-100	18-22	simple
<i>Indica</i>	Agl1 pWBCVec8	60 (20)	32 (24)	19	ND	ND	ND
Biolística							
<i>Indica</i>	NA	58 (9)	5 (1)	3	30-60	0.9-1.8	múltiple
<i>Japónica</i>	NA	74 (12)	68 (11)	50	30-60	15-30	múltiple

Los números en paréntesis se refieren al error estándar. (NA) no aplicable. Southern* se refiere al porcentaje de plantas que muestran integración de los transgenes. (ND) no determinado. (Hyg^r) resistente a higromicina.

Conclusiones

- Se observó un incremento en la eficiencia de transformación de 14 a 17 veces para el arroz tipo *indica*, cuando se utilizó el sistema de transformación por *Agrobacterium* respecto al de biolística.
- La eficiencia de transformación para *indica* con *Agrobacterium* es similar a la *japónica* con biolística.
- En general las plantas obtenidas con *Agrobacterium* muestran modelos simples de integración del gen, mientras con biolística se observan patrones múltiples.
- Se observó una herencia Mendeliana y alta estabilidad en la expresión de los transgenes en las plantas transgénicas obtenidas por *Agrobacterium*.
- La fertilidad fue usualmente mejor en las plantas transgénicas obtenidas por *Agrobacterium* con respecto a biolística.
- Adicionalmente estas plantas presentaron buenas características agronómicas para ser empleadas en un programa de mejoramiento o para estudios en investigación básica.

Referencias

- Aldemita, R.R. and Hodges, T.K. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Japonica* and *Indica* rice varieties. Plant. 199:612-617.
- Hiei, Y., Komari, T. and Kumashiro, T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. Planta J. 6: 271-282.
- Hiei, Y., Komari, T. and Kubo, T. 1997. Transformation of rice mediated *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Mol. Biol. 35: 205-218.
- McElroy, D., Zhang, W., Cao, J., Wu, R. 1990. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. Plant Cell. 2: 163-171.
- Toki, Seiichi. 1997. Rapid and efficient *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. Plant Mol. Biol. Rep. 15(1), p 16-21.
- Wang, M.B., Upadhyaya, N.M., Bretell, R.I.S. and Waterhouse, P.M. 1997. Intron-mediated improvement of a selectable marker gene for plant transformation using *Agrobacterium tumefaciens*. J. Genetics and Breed 51: 325-334.