

Optimización de condiciones de cultivo de tejidos y transformación *in vitro* e *in planta* de la variedad local de arroz Don Justo FCAyF

Optimization of tissue culture conditions and *in vitro* and *in planta* transformation of the local variety of rice Don Justo FCAyF

Martín Andrés Duhalde

Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM). Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM), Argentina

Rodolfo Bezus

Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales, Universidad Nacional de La Plata, Argentina

Andrés Alberto Rodríguez

Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM). Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM), Argentina

Santiago Javier Maiale

Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM). Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM), Argentina

Fernando Matias Romero*

Instituto Tecnológico de Chascomús (CONICET-UNSAM). Escuela de Bio y Nanotecnologías (UNSAM), Argentina

Revista de la Facultad de Agronomía

Universidad Nacional de La Plata, Argentina

ISSN: 1669-9513

Periodicidad: Semestral

vol. 121, (Num. Esp. 2), 2022

redaccion.revista@agro.unlp.edu.ar

Recepción: 31/07/2022

Aprobación: 22/09/2022

URL: <http://portal.amelica.org/ameli/journal/23/233546004/>

DOI: <https://doi.org/10.24215/16699513e100>

*Autor de correspondencia: mromero@intech.gov.ar



Resumen

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales de mayor importancia económica debido a que provee alimento a más de la mitad de la población mundial. El mejoramiento de este cultivo mediante ingeniería genética requiere poner a punto procesos como el cultivo de tejidos y la transformación. En este trabajo se optimizaron los métodos de cultivo *in vitro* y transformación de la variedad local de alto rendimiento Don Justo FCAYF. Con respecto al cultivo de tejidos se determinó que la concentración óptima de 2,4D para la calogénesis fue de 3 mg.l⁻¹ con un 42%. La regeneración de parte aérea mostró un 77% de eficiencia con una combinación de 4 mg.l⁻¹ BAP y 0,8 mg.l⁻¹ ANA. En relación a la transformación mediante *Agrobacterium tumefaciens* se obtuvieron diferentes porcentajes de eficiencia dependiendo del plásmido utilizado para transformar como también del explanto. En el caso de la transformación *in vitro* de callos embriogénicos se obtuvieron valores entre 14-29% dependiendo del plásmido. Mientras que el método *in planta* de transformación de embriones presentó una eficiencia entre 3-28%. En conclusión, en este trabajo se puso a punto los métodos de cultivo y transformación de una variedad local de arroz que facilitará el mejoramiento genético de la misma mediante distintas técnicas como transgénesis convencional o edición génica.

Palabras clave: biotecnología, *Oryza sativa*, transformación *in planta*, cultivo *in vitro*

Abstract

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most economically important cereals because it provides food for more than half of the world's population. Improving this crop through genetic engineering requires fine-tuning processes such as tissue culture and transformation. Here, we optimized tissue *in vitro* culture and transformation methods of the local premium cultivar Don Justo FCAYF. Regarding tissue culture, the optimal 2,4D concentration was 3 mg.l⁻¹ showing 42% of callogenesis. Shoot regeneration showed 77% efficiency using a combination of 4 mg.l⁻¹ BAP and 0.8 mg.l⁻¹ NAA. About *Agrobacterium tumefaciens* transformation we obtained variable results depending on the plasmid as well as the explant used. In the case of *in vitro* transformation of embryogenic calli, values between 14-29% were obtained depending on the plasmid. While, *in planta* methods of embryo transformation presented an efficiency between 3-28%. In conclusion, in this work the methods for tissue cultivation and *Agrobacterium* transformation of a local variety of rice were fine-tuned. These results will facilitate its genetic improvement through different techniques such as conventional transgenesis or gene editing.

Keywords: biotechnology, *Oryza sativa*, *in planta* transformation, *in vitro* culture

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales de mayor importancia económica debido a que provee alimento a más de la mitad de la población mundial, especialmente en aquellos países de menores ingresos como en Asia oriental y meridional, Oriente Medio y América Latina (FAO, 2002). Este cereal pertenece a la familia de las gramíneas (fam: Poaceas), es diploide ($2n=24$), anual, de días cortos y autógamo (Smith & Dilday, 2002) y debido a su importancia económica fue una de las primeras plantas en ser completamente secuenciada. En los últimos años, se han desarrollado herramientas muy eficientes (como el estudio de asociación de genoma completo) para encontrar genes asociados a caracteres de importancia agronómica, tolerancia a estreses bióticos y abióticos y de calidad de granos, que pueden ayudar a los mejoradores a obtener nuevos cultivares (Sasaki & Burr, 2000; Shimamoto & Kyojuka, 2002; McCouch et al., 2016).

Dentro de los métodos de mejora más utilizados actualmente se encuentran los cruzamientos y retrocruzamientos intervarietales, seguidos de selección masal, genealógica o una combinación de ambas que son muy útiles para objetivos generales, pero presentan dificultades para mejorar caracteres específicos dominados por pocos genes o bien para caracteres que no se encuentran en la misma especie. En los últimos años han surgido diferentes herramientas biotecnológicas que permiten acelerar los procesos de mejoramiento principalmente mediante la edición génica (Malzahn et al., 2017) que permite realizar modificaciones puntuales en sitios específicos, acelerando notablemente los tiempos necesarios para obtener los fenotipos esperados (Romero & Gatica-Arias, 2019). Sin embargo, estas metodologías implican optimizar las técnicas de transformación de tejidos de plantas como electroporación, microinyección, bombardeo de partículas o el uso de bacterias como *Agrobacterium tumefaciens*. Todas estas técnicas implican ventajas y desventajas dependiendo de la especie vegetal, explanto utilizado, etc. (Husaini et al., 2010). Una de las técnicas más utilizada es la transformación mediante *A. tumefaciens*, si bien esta bacteria no es patógeno natural de monocotiledóneas, se han generado múltiples herramientas que permitieron transformar exitosamente maíz, trigo y arroz entre otras (Sood et al., 2011). En el caso del arroz, esta metodología es una de las más utilizadas para transformar semillas o inflorescencias (Ahmed et al., 2017). Sin embargo, la mayoría de los reportes exitosos de transformación se logran utilizando genotipos de la subespecie japónica, mientras que los genotipos indica suelen ser más recalcitrantes tanto a la infección por la bacteria como a la regeneración de tejidos *in vitro*.

Para la transformación pueden utilizarse distintos explantos como embriones inmaduros, callos embriogénicos o ápices de crecimiento, obtenidos mediante cultivo de tejido (Sahoo et al., 2011). Las condiciones de proliferación, diferenciación, desdiferenciación, regeneración y rusticación de los tejidos en cultivo *in vitro* son prerrequisitos para lograr un protocolo de transformación eficiente. Estas variables son dependientes del genotipo de la planta que se utilizará y en el caso del arroz existen marcadas diferencias tanto entre las subespecies, como así también entre cultivares de la misma subespecie. Esto implica que sea necesaria la optimización de los métodos de cultivo para los cultivares de interés.

Los callos embriogénicos son uno de los explantos más utilizados para transformación con las diferentes técnicas. Para su obtención se utilizan hormonas del tipo de las auxinas, en general 2,4D (ácido 2,4 dicloro fenoxiacético) en diferentes concentraciones dependiendo del cultivar utilizado. Luego del proceso de transformación, es menester contar con un agente de selección que permita discriminar las células transformadas. Para esto existen diferentes agentes de selección relacionados con la tolerancia a antibióticos o herbicidas. Entre estos se encuentran los genes NPTII (neomicina fosfotransferasa) que otorga resistencia a kanamicina, G-418 o Paramomicina; HPT (higromicina fosfotransferasa) que otorga resistencia a higromicina y PAT (fosfinotricina acetil transferasa) que confiere tolerancia al herbicida glufosinato de amonio. Entre estos genes el NPTII es muy usado en dicotiledóneas, mientras que el HPT lo es en gramíneas, especialmente en arroz (Hiei & Komari, 2008). Una vez seleccionadas las células transformadas, el paso siguiente consiste en la regeneración de tejidos para obtener plantas transformadas. En esta etapa se utilizan hormonas del tipo citocininas como la 6-bencilaminopurina (BAP) sola o en combinación con auxinas como el ácido naftalen acético (ANA). También es importante emplear azúcares específicos y ciertos iones minerales como el Cu^{2+} o Ag^+ que pueden aumentar la eficiencia de regeneración (Biswas & Zapata, 1993; Bartlett et al., 2008).

Además de los métodos de transformación mencionados que incluyen el cultivo de tejidos y la regeneración de órganos también se han descritos protocolos para la transformación *in planta*. Uno de los más utilizados es el denominado "floral dip" que se usa rutinariamente en la especie modelo *Arabidopsis thaliana* (Clough & Bent, 1998). Estos métodos se basan en la transformación directa de órganos

reproductivos en la planta con el fin de obtener individuos transformantes en la siguiente generación. La principal ventaja de estas técnicas es que se evitan los pasos de cultivo *in vitro* acortando los tiempos y sorteando dificultades propias que presentan algunos cultivares a dicha metodología. En particular en arroz, se han descrito varias alternativas de transformación *in planta* con resultados variables (Supartana et al., 2005; Andrieu et al., 2012; Ahmed et al., 2017; Ratanasut et al., 2017), sin embargo, no es una metodología que haya ganado amplia difusión.

Como se mencionó anteriormente, la eficiencia de transformación de arroz es dependiente de diversos factores como son el genotipo del cultivar, las concentraciones de hormonas utilizadas durante el cultivo de tejidos, métodos de transformación, etc. Sumado a esto, la mayoría de los protocolos disponibles en bibliografía han sido optimizados para cultivares utilizados en investigación o comerciales que se cultivan en otros países, por lo tanto, es necesario contar con protocolos de transformación para cultivares modernos y adaptados a las condiciones locales tanto para investigación de transgenes con utilidad agronómica o como plataformas para realizar ediciones génicas con diversos fines. En este sentido, el objetivo de este trabajo fue optimizar un protocolo para la transformación del cultivar de alto rendimiento Don Justo FCAyF obtenido en el programa arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de la UNLP.

METODOLOGÍA

MATERIAL VEGETAL, BACTERIAS Y PLÁSMIDOS

Como material vegetal se utilizaron semillas de arroz de la variedad Don Justo FCAyF que se encuentra inscripta en el Registro Nacional de Propiedades de Cultivares bajo el número 2836.

Para las transformaciones se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* ATHV transformada con los plásmidos pCAMBIA1303 (p1303) (Aguilar-Bartels et al., 2021) o pCAMBIAMD2 (pMD2). Este último fue diseñado y construido siguiendo el protocolo descrito por Vázquez-Vilar et al. (2021). Dicho plásmido contiene las herramientas necesarias para realizar edición génica mediante el sistema CRISPR-Cas9. Ambos plásmidos contienen el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV35s) y el gen de la higromicina fosfotransferasa II (HPT) que confiere resistencia a la higromicina B. Además, p1303 contiene el gen de la proteína fluorescente verde (GFP) como marcador. El plásmido pCAMBIA1303 porta un gen de resistencia a kanamicina y pCAMBIAMD2 posee el gen de resistencia a espectinomicina que se utilizan para su selección en bacterias.

CULTIVO IN VITRO

GENERACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS

Las semillas se descascararon mediante tratamiento con papel lija y se desinfectaron dos veces mediante inmersión en lavandina comercial y Tween20 con agitación constante a 110 revoluciones por minuto (rpm) durante 20 min. Estas fueron enjuagadas cuatro veces con agua destilada estéril en una cámara de flujo laminar de aire estéril. Luego, las semillas se sembraron en cajas petri con 20 ml del medio de inducción (MSP), compuesto por sales minerales (MS) (Murashige & Skoog, 1962), adicionado con 0,3 g.l⁻¹ caseína hidrolizada, 500 mg.l⁻¹ prolina, 30 g.l⁻¹ sacarosa y concentraciones variables de 2,4-D. Como agente gelificante se utilizó 5 g.l⁻¹ de phytigel. Las placas permanecieron en cuarto de cultivo a 23°C, en oscuridad durante 14 días.

REGENERACIÓN DE PARTE AÉREA Y RAÍZ

Para regenerar estructuras vegetativas a partir de callos, estos se traspasaron a placas con medio de regeneración (MSR) que consiste en sales minerales (Murashige & Skoog, 1962) 4,4 g.l⁻¹, caseína hidrolizada 0,1 g.l⁻¹, maltosa 30 g.l⁻¹, phytigel 5 g.l⁻¹, suplementado con concentraciones variables de ácido 1-naftanelacético (ANA) y 6-Bencilaminopurina (BAP). Se realizaron 3 repiques cada 12-15 días a placas nuevas. Las placas se mantuvieron en cámara de cultivo a 23°C con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad. Una vez regenerada parte aérea, se traspasaron los brotes para la regeneración de raíces. En este caso se utilizó el mismo medio de cultivo, pero adicionado con diferentes concentraciones de la hormona ácido indol butírico (AIB) sin la presencia de ANA ni BAP. Se mantuvieron durante 15 días en este medio en las mismas condiciones de cultivo mencionadas anteriormente.

TRANSFORMACIÓN MEDIANTE *A. TUMEFACIENS*

La cepa ATHV se cultivó en medio LB (Lysogeny Broth) compuesto por extracto de levadura 5 g.l⁻¹, tripteína bacteriológica 10 g.l⁻¹ y NaCl 10 g.l⁻¹. En caso de utilizar medio sólido se agregó agar bacteriológico 10 g.l⁻¹. En todos los casos se suplementó con los antibióticos necesarios rifampicina 50 mg.l⁻¹, kanamicina 50 mg.l⁻¹ o espectinomicina 100 mg.l⁻¹ según corresponda. Se realizó un cultivo de ATHV en medio LB suplementado con acetosiringona 20 µM durante 16 horas, a partir de este cultivo se preparó una suspensión en medio de transformación (sales MS 4,4 g.l⁻¹, sacarosa 40 g.l⁻¹, acetosiringona 200 µM) con una DO₆₀₀= 0,8. Esta suspensión se utilizó tanto para transformación de callos embriogénicos como también de embriones maduros.

En el caso de la transformación de callos, se seleccionaron callos pequeños (1-2 mm de diámetro) se colocaron en la suspensión de transformación con agitación durante 15 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se secaron en papel estéril para eliminar el exceso de *Agrobacterium* y se colocaron en placas con medio de co-cultivo (sales MS 4,4 g.l⁻¹, sacarosa 40 g.l⁻¹, acetosiringona 200 µM, phytigel 5 g.l⁻¹) durante 3 días en oscuridad a 23°C. Al cabo de este período los callos se transfirieron a placas con medio de selección (MSP) suplementado con higromicina 50 mg.l⁻¹ como agente de selección, además carbenicilina 250 mg.l⁻¹ y cefotaxima 250 mg.l⁻¹ para evitar el crecimiento de *Agrobacterium*. Se realizaron 3 rondas de selección de 15 días cada uno. Al finalizar el proceso de selección los callos sobrevivientes se pasaron al medio MSR descrito anteriormente.

La transformación de embriones se realizó a partir de embriones maduros. Para esto se desinfectaron semillas de arroz como se describió anteriormente y se mantuvieron a temperatura ambiente durante 48 horas en agua estéril para permitir la imbibición y que resulte más fácil separar el embrión del resto de la semilla. Los embriones se separaron en cabina de flujo laminar con la ayuda de lupa y bisturí y los mismos fueron transformados de la misma forma que los callos. Estos embriones posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y finalmente se realizó una desinfección con una solución de cefotaxima 250 mg.l⁻¹ para eliminar restos de *Agrobacterium*, se secaron y fueron colocados en placas con medio de co-cultivo suplementado con cefotaxima y carbenicilina. Al cabo de aproximadamente 15 días las plántulas generadas a partir de estos embriones se utilizaron para la extracción de ADN genómico.

EXTRACCIÓN DE ADN Y REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La extracción de ADN a partir de material vegetal se realizó con el método de bromuro de hexadeciltrimetilamonio (CTAB) según lo descrito por Ausubel et al. (1987). Para realizar la confirmación de los métodos de transformación se realizaron diferentes reacciones de PCR con cebadores específicos dependiendo del plásmido utilizado para la transformación. En el caso de las transformaciones con pCAMBIA1303 se utilizó el gen GFP (GFP_{FW} 5'-GGATTCTGGTGATGGTGTTAG-3', GFP_{RV} 5'-GGATTCTGGTGATGGTGTTAG-3') mientras que para el plásmido pCAMBIAMD2 se utilizaron los genes HPT (HPT_{FW} 5'-GGATTCTGGTGATGGTGTTAG-3', HPT_{RV} 5'-GGATTCTGGTGATGGTGTTAG-3') o Cas9 (Cas9_{FW} 5'-GGATTCTGGTGATGGTGTTAG-3', Cas9_{RV} 5'-GGATTCTGGTGATGGTGTTAG-3'). Todas las reacciones se llevaron a cabo en un termociclador PX2 (Thermal Cycler, Termo Electron Corporation, USA). Las reacciones estaban compuestas por tampón PB-L (Productos Bio-Lógicos) en concentración final de 1X, dNTPs en una concentración final de 0,32 mM, 1 unidad de Taq polimerasa PB-L, cloruro de magnesio en una concentración final de 1,5 mM y 0,2 µM de cada oligonucleótido. En todos los casos se utilizó 1 µl de ADN genómico como templado, los controles positivos consistían en el mismo volumen del plásmido correspondiente y el control negativo agua estéril. El programa de PCR consistió en una etapa de desnaturalización a 94°C durante 5 minutos, 35 repeticiones de 94°C 1 min, 69°C 1 min y 72°C 1 min, y por último una extensión final de 10 minutos a 72°C. Los productos de las amplificaciones por PCR fueron analizados por electroforesis en gel de agarosa al 1% preparados con tampón TAE 1X, teñidos con bromuro de etidio, y visualizados en un transiluminador-UV Hoefer Macro Vue UV-20 (Amersham, USA).

RESULTADOS

OPTIMIZACIÓN DEL CULTIVO IN VITRO DE TEJIDOS PARA LA VARIEDAD DON JUSTO

INDUCCIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS

Para la generación de callos embriogénicos se evaluaron diferentes concentraciones del ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4D) con el fin de determinar la concentración que permita el mayor porcentaje de formación de callos a partir de semillas maduras de arroz. Se evaluaron cuatro concentraciones de 2,4D desde 1 hasta 4 mg/L. De esta forma, se observaron porcentajes de callogénesis desde un 15 hasta un 45%, siendo las concentraciones más altas (3-4 mg/L) de 2,4D las que mostraron los mejores porcentajes (Figura 1). El tiempo de formación de callos fue de 15 días. El análisis estadístico demuestra que a partir de 2 mg/L no hay diferencias en el porcentaje de callogénesis, sin embargo, se eligió la concentración de 3 mg/L para futuros ensayos para asegurar la máxima eficiencia.

REGENERACIÓN DE VÁSTAGO A PARTIR DE CALLOS

Para la regeneración de parte aérea a partir de los callos obtenidos previamente se utilizó una combinación de citoquinina (BAP) y auxina (ANA). Estas fitohormonas se utilizaron en diferentes proporciones para identificar la concentración más adecuada de cada una en el proceso de regeneración. Las concentraciones evaluadas fueron para BAP desde 1 mg/L hasta 4 mg/L, mientras que para ANA el rango fue de 0,2-0,8 mg/L. Se realizaron repiques cada 15 días y a los 45 días se realizó la evaluación de los callos regenerados. Se identificó como regenerados a aquellos callos que mostraban la aparición de brotes verdes (Figura 2A). De esta forma, los porcentajes de regeneración variaron entre un 8 y un 77%. Observándose los mejores resultados de regeneración en la combinación de BAP 4 mg/L-ANA 0,8 mg/L con un porcentaje de regeneración cercano al 77% (Figura 2B).

REGENERACIÓN DE RAÍZ

Luego de la regeneración de la parte aérea, se procedió a la regeneración de raíz, para ello, se evaluaron cuatro concentraciones de ácido indol butírico (AIB). Se separaron los brotes verdes y fueron transferidos a las placas con AIB. Se observó que antes de colocar en medio de inducción de raíz, los brotes ya comenzaban a producir raíces (Figura 3A), por lo tanto, la concentración de AIB no afectó la formación de raíces (Figura 3B). En nuestras condiciones experimentales se seleccionó como concentración óptima para la obtención de callos embriogénicos 3 mg/L de 2,4D, mientras que para la regeneración de parte aérea a partir de estos callos la mejor combinación de hormonas fue de 4 mg/L de BAP y 0,8 mg/L de ANA. Por último, determinamos que en nuestras condiciones de trabajo no sería necesaria la etapa de enraizamiento, ya que el 100% de los brotes obtenidos en la etapa de regeneración generaron raíces.

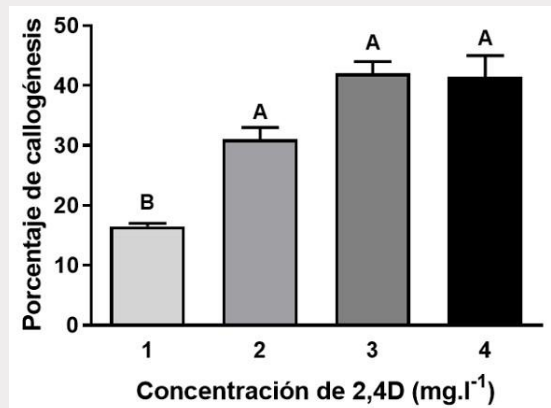


Figura 1

Evaluación de la concentración de 2,4D en la formación de callos embriogénicos a partir de semillas maduras de arroz. Los resultados son la media de dos ensayos independientes \pm SEM y el análisis estadístico corresponde a un ANOVA de una vía con test de Tukey, $p < 0.05$.

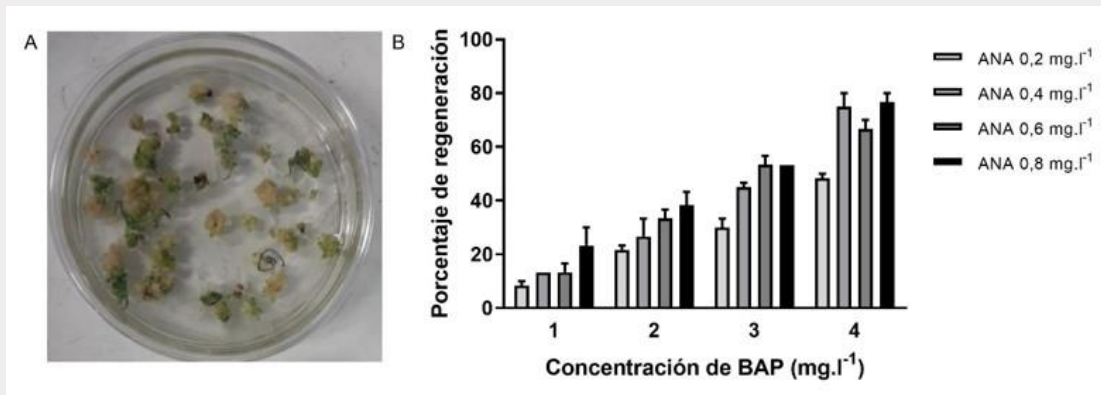


Figura 2

Determinación de la concentración de fitohormonas para la regeneración de parte aérea. A- Brotes verdes en callos embriogénicos luego de 45 días en medio de regeneración con la concentración más alta de hormonas. B- Porcentaje de regeneración de parte aérea a distintas concentraciones de BAP y ANA. Los resultados son la media de dos ensayos independientes +/- SEM.

TRANSFORMACIÓN MEDIANTE AGROBACTERIUM TUMEFACIENS

TRANSFORMACIÓN DE CALLOS EMBRIOGÉNICOS

Luego del proceso de optimización de las condiciones para el cultivo de tejidos *in vitro* de la variedad Don Justo se procedió a la transformación mediante *A. tumefaciens* para la obtención de plantas transgénicas, lo que significa una herramienta importante para el mejoramiento de esta variedad, ya que permitiría obtener variedades transgénicas y/o editadas genéticamente utilizando como base la variedad desarrollada en nuestro país.

Para las pruebas de transformación se utilizó la cepa de *A. tumefaciens* ATHV que portaba los plásmidos, p1303 o pMD2, ambos otorgan resistencia a higromicina por lo que se utilizó este antibiótico como agente de selección. Además, p1303 tiene como gen reportero a la proteína fluorescente verde (GFP), que permite la determinación visual de los callos transformados en una lupa de fluorescencia. En primer lugar, se realizó una transformación con el plásmido p1303 con el fin de determinar fácilmente la expresión de GFP. En este caso, se determinó como transformado el callo que presentaba fluorescencia (Figura 4A). De esta forma se observó un porcentaje de transformación aproximadamente de un 28% (Figura 4C). Por otra parte, se realizó la transformación con el plásmido pMD2 que contiene todas las partes necesarias para utilizar el sistema de edición génica mediante CRISPR (ARNg y Cas9) además del gen de selección. En este caso, se consideró callo transformado aquel que sobrevivió el proceso de selección con higromicina (Figura 4B), además se realizó una extracción de ADN de los callos transformados para confirmar la presencia del gen de resistencia, en este sentido todos los callos resistentes a higromicina resultaron positivos para el gen HPT mediante PCR. En este caso, el porcentaje de transformación fue más bajo, alrededor de un 14% (Figura 4C). De esta forma se puede observar como el porcentaje de transformación varía entre los plásmidos a utilizar, sin embargo, en ambos casos pudimos obtener callos transformados.

EVALUACIÓN DE SISTEMAS DE TRANSFORMACIÓN IN PLANTA

Además de realizar transformaciones de callos embriogénicos, se evaluaron otros métodos de transformación independientes de cultivo de tejidos *in vitro*. La ventaja de estas estrategias de transformación es que evita los pasos de formación de callos y regeneración de tejidos que suelen ser los pasos limitantes para ciertas variedades de arroz.

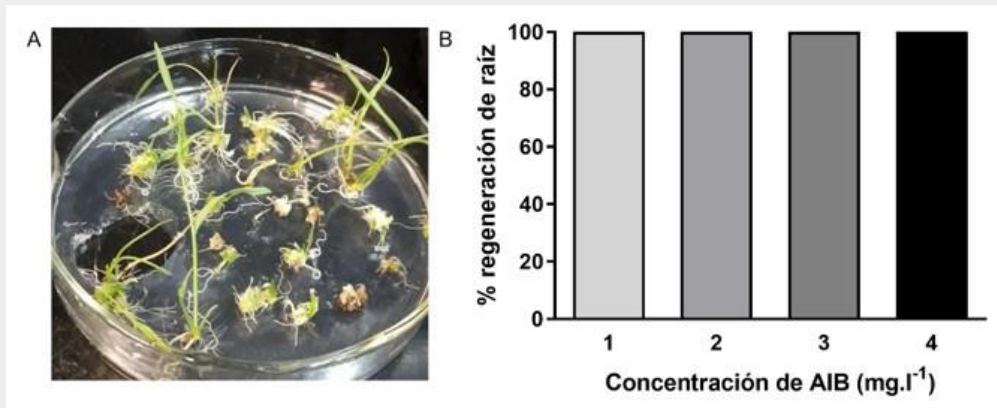


Figura 3

Regeneración de raíz. A- Brotes regenerados con formación de raíz en medio de regeneración sin la presencia de AIB. B- Porcentaje de regeneración de raíz a distintas concentraciones de AIB. Los resultados son la media de dos ensayos independientes +/- SEM.

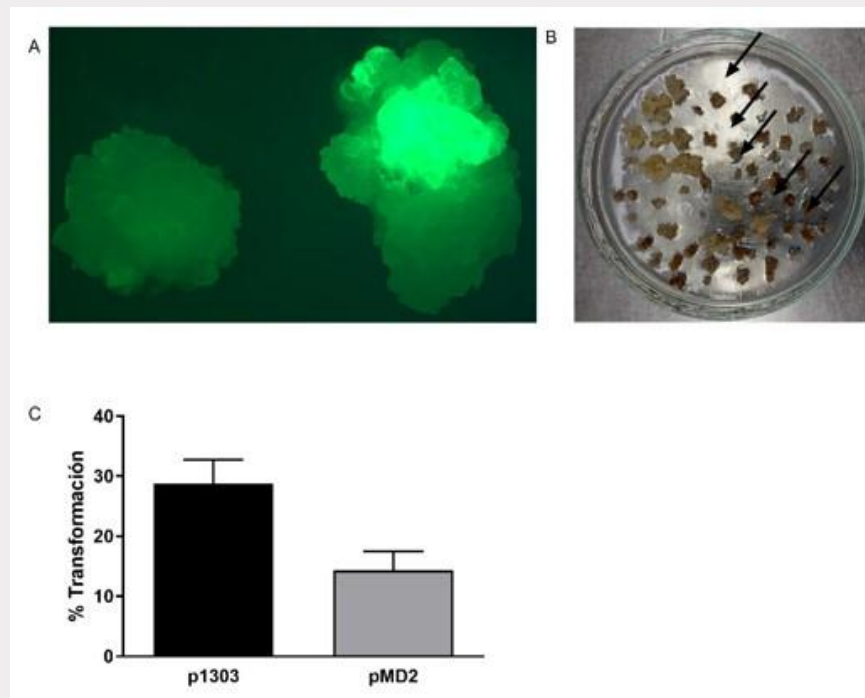


Figura 4

Transformación de callos embriogénicos con *A. tumefaciens* ATHV. A- Callos transformados con el plásmido p1303, a la izquierda se observa un callo control sin transformar y a la derecha un callo transformado con fluorescencia. B- Callos transformados con el plásmido pMD2, las flechas señalan algunos callos resistentes a la selección con higromicina. C- Porcentajes de transformación utilizando ambos plásmidos. Los resultados son la media de entre 5-7 réplicas independientes +/- SEM.

En primer lugar, se siguió la estrategia de transformación de semillas descrita previamente por Lin et al. (2009) que consiste brevemente en la punción de los embriones de las semillas con una aguja embebida en una suspensión de *A. tumefaciens* y posterior infiltración por vacío de estas semillas con la misma suspensión. En nuestras condiciones y con la variedad Don Justo FCAYF no se obtuvieron plantas transformadas mediante esta metodología, por lo que optamos por evaluar otra alternativa, que consistió en transformar embriones maduros de arroz de forma similar a la reportada previamente para trigo (Hamada et al., 2017; Liu et al., 2021). En este sentido, se obtuvieron embriones maduros a partir de semillas previamente desinfectadas y embebidas en agua estéril por 48 horas. Se retiraron los embriones con bisturí y se mantuvieron en placas con medio MS hasta su tratamiento. Luego se realizó la transformación con ATHV con los plásmidos p1303 o pMD2 y se germinaron los embriones en medio MS. Al cabo de aproximadamente 10 días, las plántulas se sacrificaron para realizar la extracción de ADN con el fin de evaluar el porcentaje de transformación. En el caso de las transformaciones con p1303 se amplificó el gen de GFP, mientras que para pMD2 se amplificó el gen de Cas9 (Figura 5B). De esta forma se calculó el porcentaje de transformación con ambos plásmidos teniendo en cuenta el número de plántulas que dieron PCR positiva para estos genes con relación al número total de embriones utilizados. Así, observamos que la transformación de embriones utilizando el plásmido p1303 tuvo una eficiencia de transformación del 27,4% (Tabla 1), estos valores son similares a los obtenidos en la transformación de callos embriogénicos utilizando el mismo plásmido. Por otro lado, cuando se utilizó el plásmido pMD2 con la maquinaria necesaria para realizar edición génica el porcentaje de transformación fue de aproximadamente 3% (Tabla 1). Estos valores son más bajos a los observados en la transformación de callos embriogénicos, sin embargo, se mantiene la misma tendencia, al utilizarse el plásmido pMD2 el porcentaje de transformación es menor que con el plásmido p1303. En resumen, estos resultados demuestran que es posible transformar la variedad Don Justo FCAYF utilizando diferentes plásmidos con eficiencias de transformación variable. Además, se logró transformar esta variedad con métodos independientes del cultivo de tejidos mediante la transformación de embriones maduros. Si bien, en algunos casos los porcentajes de transformación son bajos, la simpleza y rapidez de esta metodología implicaría una herramienta muy útil para el mejoramiento de esta u otras variedades de arroz.

DISCUSIÓN

El desafío de la agricultura moderna consiste en producir más y mejores alimentos minimizando el impacto ambiental y en donde el mejoramiento genético vegetal ocupa un lugar preponderante para lograr estos objetivos. Una de las herramientas usadas dentro del mejoramiento es la biotecnología moderna, la cual a través de la expresión de genes foráneos mediante la transgénesis o la modificación de los propios genes mediante la edición génica ofrece soluciones con bajo impacto ambiental a la agricultura moderna (Turnbull et al., 2021). Para el caso de los cereales y del arroz en particular llegar a obtener plantas transgénicas o editadas implica el uso del cultivo de tejido y la regeneración de plantas, procesos que son dependientes del genotipo, la composición de los medios de cultivo y las condiciones de crecimiento (Tripathy et al., 2018). En nuestras condiciones utilizando la variedad local Don Justo FCAYF, las concentraciones de callogénesis óptimas se encontraron entre 2 y 4 mg/L de 2,4-D, concentraciones que coinciden con las reportadas por otros autores para otras variedades (Tripathy, 2021; Yaqoob et al., 2021; Saba-Mayoral et al., 2022). Con relación al porcentaje de callogénesis, en este trabajo obtuvimos un máximo de 45% para las concentraciones de 3 y 4 mg.l⁻¹ de 2,4-D, mientras que otros autores encontraron respuestas diferenciales entre 42-94% dependiendo del cultivar utilizando 2-3 mg.l⁻¹ de auxina (Binte Mostafiz & Wagiran, 2018; Yaqoob et al., 2021). Si bien Saba-Mayoral et al. (2022) obtuvieron menores porcentajes de callogénesis (10-13%) utilizando callos de 6 y 7 días con el cultivar Bomba, la metodología utilizada por estos autores fue diferente, ya que estos callos se originaron de escutelos bombardeados con el plásmido de transformación. Por otro lado, también hay reportes de entre 72 y 89% de callogénesis con dosis de 2,5 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 0,5 mg.l⁻¹ de cinetina variando las concentraciones de algunos componentes del medio como caseína, sacarosa, prolina, agente gelificante y las condiciones de luz y oscuridad durante el período de incubación (Tripathy, 2021). Es importante mencionar que además de las condiciones de cultivo otro factor que influye en el proceso de callogénesis es la edad de las semillas utilizadas como explanto.

Tabla 1
Eficiencia de transformación in planta de la variedad Don Justo FCAyF.

Plásmido	Embriones totales	Embriones transformados (% transformación)
p1303	73	20 (27,4%)
pMD2	179	6 (3,4%)

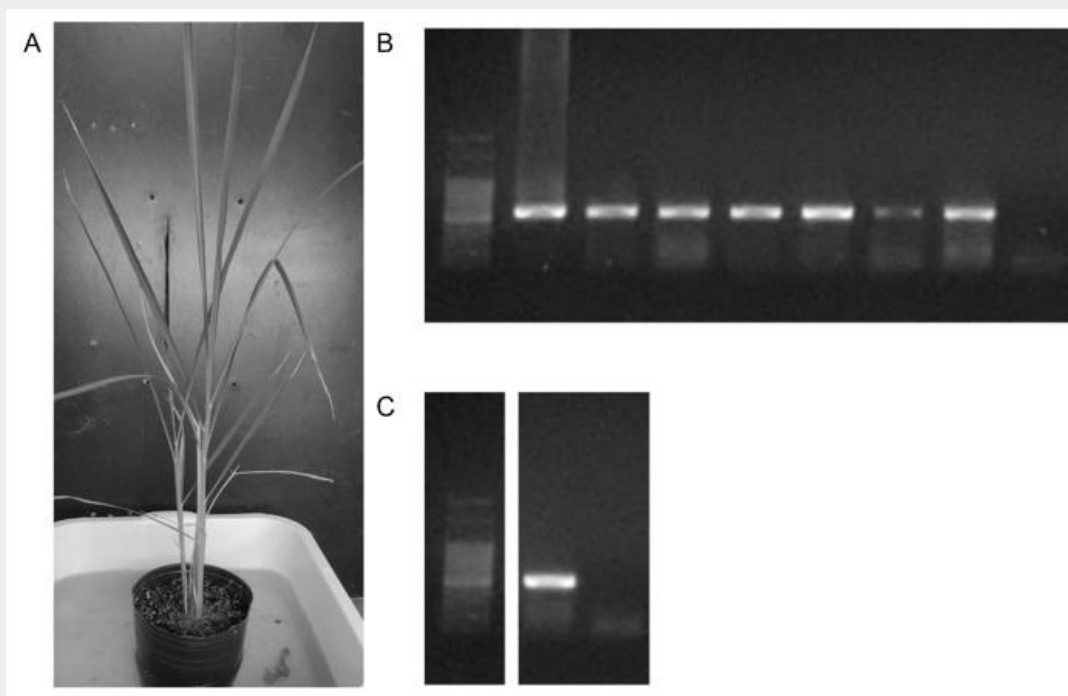


Figura 5

A- Planta transgénica obtenida mediante transformación de callos con el plásmido pMD2. B- Determinación por PCR del gen Cas9 en muestras de ADN genómico proveniente de embriones transformados. Calle 1: Marcador molecular de 100 pb. Calle 2: Control positivo para Cas9. Calle 3 a 8: Cas9 en muestras de embriones transformados. Calle 9: control negativo. C- Determinación por PCR del gen Cas9 en planta transgénica. Calle 1: Marcador molecular de 100 pb. Calle 2: Cas9 en muestra planta T0. Calle 3: control negativo.

En cuanto a la tasa de regeneración, los resultados en la literatura son variables dependiendo mucho del genotipo utilizado. Hay reportes que van desde un 40 a un 82% de regeneración en distintos cultivares utilizando una única concentración de hormonas (2 mg.l⁻¹ BAP, 2 mg.l⁻¹ kinetina, 0,5 mg.l⁻¹ ANA) (Binte Mostafiz & Wagiran, 2018). Por otro lado, también se han reportado tasas de regeneración de entre 62 a 88% considerando callos organogénicos y embriogénicos con variaciones en las concentraciones de los componentes de los medios de cultivos, pero con una dosis única de hormonas de 2 mg.l⁻¹ de BAP y 0,5 mg.l⁻¹ ANA (Tripathy, 2021). Mientras que en el presente trabajo utilizando el cultivar Don Justo se observó una tasa de regeneración de hasta el 77% con dosis de 4 mg.l⁻¹ de BAP y entre 0,4-0,8 mg.l⁻¹ de ANA. Estos resultados reflejan la importancia de optimizar las condiciones de cultivo, tipo y concentraciones de hormonas, fuentes de inóculos, etc. para cada variedad que se quiera utilizar como base para procesos de mejoramiento utilizando técnicas de ingeniería genética.

Otro paso clave en el proceso de mejoramiento es la etapa de transformación, es decir la introducción de material genético foráneo en la especie deseada. Como se mencionó anteriormente hay diferentes métodos de transformación de material vegetal (Husaini et al., 2010), siendo uno de los más utilizados la transformación mediante *A. tumefaciens*. En este trabajo se utilizó la cepa ATHV, mostrando porcentajes de transformación de 28 y 14% dependiendo de la construcción utilizada. Estos resultados coinciden con los reportados por otros autores utilizando la misma cepa y en algunos casos el mismo plásmido (Aguilar-Bartels et al., 2021). También estos autores observaron diferencias en la eficiencia de transformación con la edad del callo, siendo mayor con callos de 6 días en comparación a callos de 10 días de edad, adjudicando la diferencia a diferentes estados y espesores de las células que condicionarían la infectividad de la bacteria (Vega et al., 2009). En el presente trabajo se utilizaron semillas de 1 año lo que condicionó tanto el número de callos obtenidos como el tiempo necesario hasta la obtención de callos con tamaño adecuado (aproximadamente 15 días) y pudo haber sido uno de los factores que influyeron en el menor porcentaje de callos transformados con relación a otros protocolos.

Tal como se mencionó anteriormente, existen subespecies de arroz que difieren, entre otras cosas, en su capacidad para ser cultivadas *in vitro*. Es de destacar que las plantas de la subespecie Indica presentan serias dificultades para ser regeneradas a partir de callos (Pazuki & Sohani, 2013) y es mucho menor por lo tanto el número de cultivares transformados de esta subespecie en comparación con los japónicas. Entre los cultivares Indicas transformados utilizando *A. tumefaciens* pueden mencionarse Pusa Basmati, MR219, Taraori Basmati, Kasalath e IR64 entre otros, siendo la mayoría de estos transformados desde callos embriogénicos y también desde ápice del vástago como IR64 (Mohammed et al., 2019). Por lo tanto, se hacen numerosos esfuerzos tanto para optimizar protocolos de regeneración como para desarrollar otros métodos de transformación que no pasen por la etapa de cultivo de callos. Estas técnicas se denominan transformación *in planta* o *in vivo*. Entre ellas, pueden mencionarse las referentes a la transformación de los órganos reproductivos de la planta como el caso de "floral dip" o incluso directamente el embrión en la semilla. En arroz se han reportado el uso de estas técnicas, para el caso de floral dip se han observado porcentajes de transformación de anteras de hasta un 80% (Rod-in et al., 2014; Ratanasut et al., 2017), sin embargo, estos son reportes aislados que no han sido ampliamente reproducidos. En el caso de la transformación de embriones y/o semillas, esta técnica consiste en inocular el embrión mediante una punción con aguja embebida en *A. tumefaciens* y posterior co-cultivo de las semillas con la bacteria, luego estas semillas darán lugar plantas T0 de las cuales se obtendrán semillas T1 transformadas. En arroz esta técnica fue utilizada en distintas oportunidades con resultados variables que van desde una eficiencia de transformación de 3% hasta un 30% dependiendo de los cultivares y los plásmidos utilizados (Supartana et al., 2005; Lin et al., 2009; Ahmed et al., 2017). En nuestras condiciones experimentales esta metodología no dio resultados positivos por lo que se realizó una variante similar a la utilizada en trigo (Hamada et al., 2017; Liu et al., 2021) donde los embriones fueron escindidos de las semillas y estos fueron el material de partida para la transformación. En este sentido logramos obtener 27,4% y 3,4% de eficiencia de transformación dependiendo del plásmido utilizado. Estos porcentajes de transformación concuerdan con los reportados por otros autores para la metodología de transformación *in planta*.

Los resultados obtenidos en este trabajo resultan importantes para el desarrollo de una plataforma que permita el mejoramiento de variedades locales de interés agronómico mediante ingeniería genética, ya sea transgénesis tradicional o edición génica mediante CRISPR-Cas. Por último, los resultados mostrados utilizando el sistema de transformación *in planta*, teniendo en cuenta el no uso de cultivo de tejido, la simpleza de la metodología y la posibilidad de llevarlo a mayor escala fácilmente, resultan muy promisorios para posteriores investigaciones de transformaciones o ediciones génicas en arroz.

CONCLUSIÓN

La posibilidad de utilizar herramientas biotecnológicas en el mejoramiento de arroz en nuestro país es dependiente de la disponibilidad de protocolos de transformación para genotipos adaptados a los ambientes de cultivo en Argentina. Por lo que en este trabajo se optimizaron las condiciones de cultivo *in vitro* de tejidos (callogénesis, regeneración aérea y regeneración radicular) y se evaluaron diferentes formas de transformación *in vitro* e *in planta* con *A. tumefaciens* para la obtención de plantas transgénicas. Con respecto a la callogénesis se determinó la concentración óptima de 2,4D en 3 mg/L, mientras que para la regeneración se utilizó una combinación de 4 mg/L de BAP y 0,8 mg/L de ANA. Al mismo tiempo, se

observó que no fue necesaria la etapa de enraizamiento ya que durante la regeneración de parte aérea se observó un 100% de formación de raíces. Por otro lado, con respecto a los métodos de transformación se obtuvieron eficiencias de 3-28% dependiendo del método y el plásmido utilizado. Siguiendo estos protocolos se obtuvieron plantas transgénicas de la variedad Don Justo que fueron confirmadas mediante PCR para el gen Cas9 (Figura 5). Estos resultados sirven como plataforma para el mejoramiento de esta variedad mediante transgénesis o edición génica.

Agradecimientos

Este trabajo fue financiado parcialmente por el subsidio PICT2019-1194 (Agencia Nacional de Promoción de la Investigación, el Desarrollo Tecnológico y la Innovación). Los autores agradecen la asistencia técnica de la Bqca. Beatriz Wyss.

BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-Bartels, C.; P. Quirós-Segura; A. García-Piñeres; A. Gatica-Arias & G. Arrieta-Espinoza (2021).** Aspectos clave para la transformación genética de arroz (*Oryza sativa* L.) subespecie indica mediante *Agrobacterium tumefaciens*. *Agronomía Mesoamericana* 32: 764-778.
- Ahmed, T.; S. Biswas; S.M. Elias; M. Sazzadur Rahman; N. Tuteja & Z.I. Seraj (2017).** *In planta* transformation for conferring salt tolerance to a tissue-culture unresponsive indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivar. *In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant* 54: 154-165.
- Andrieu, A.; J.C. Breitler; C. Siré; D. Meynard; P. Gantet & E. Guiderdoni (2012).** An *in planta*, *Agrobacterium*-mediated transient gene expression method for inducing gene silencing in rice (*Oryza sativa* L.) leaves. *Rice* 5(1): 23.
- Ausubel, F.; R. Brent; R. Kingston; D. Moore; J. Smith; J. Seidman & K. Struhl (1987).** Current protocols in molecular biology. New York: John Wiley & Sons, Inc. 4755 pp.
- Bartlett, J.G.; S.C. Alves; M. Smedley; J.W. Snape & W.A. Harwood (2008).** High-throughput *Agrobacterium*-mediated barley transformation. *Plant Methods* 4(1): 22.
- Binte Mostafiz, S. & A. Wagiran (2018).** Efficient callus induction and regeneration in selected indica rice. *Agronomy* 8(5): 77.
- Biswas, G.C.G. & F.J. Zapata (1993).** High-frequency plant regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L.) using maltose. *Journal of Plant Physiology* 141(4): 470-475.
- Clough, S.J. & A.F. Bent (1998).** Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 16(6): 735-743.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations. FAO (2002).** Producción de cultivos, perspectivas por sectores principales. Disponible en:
- Hamada, H.; Q. Linghu; Y. Nagira; R. Miki; N. Taoka & R. Imai (2017).** An *in planta* biolistic method for stable wheat transformation. *Scientific Reports* 7(1): 11443.
- Hiei, Y. & T. Komari (2008).** *Agrobacterium*-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. *Nature Protocols* 3(5): 824-834.
- Husaini, A.M.; M.Z. Abdin; G.A. Parray; G.S. Sanghera; I. Murtaza; T. Alam; D.K. Srivastava; H. Farooqi & H.N. Khan (2010).** Vehicles and ways for efficient nuclear transformation in plants. *GM Crops* 1(5): 276-287.
- Lin, J.; B. Zhou; Y. Yang; J. Mei; X. Zhao; X. Guo; X. Huang; D. Tang; X. Liu (2009).** Piercing and vacuum infiltration of the mature embryo: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice. *Plant Cell Reports* 28(7): 1065-1074.
- Liu, Y.; W. Luo; Q. Linghu; F. Abe; H. Hisano; K. Sato; Y. Kamiya; K. Kawaura; K. Onishi; M. Endo; S. Toki; H. Hamada; Y. Nagira; N. Taoka & R. Imai (2021).** *In planta* genome editing in commercial wheat varieties. *Frontiers in Plant Science* 12(388).
- Malzahn, A.; L. Lowder & Y. Qi (2017).** Plant genome editing with TALEN and CRISPR. *Cell & Bioscience* 7(1): 21.
- McCouch, S.R.; M.H. Wright; C.W. Tung; L.G. Maron; K.L. McNally; M. Fitzgerald; N. Singh; G. DeClerck; F. Agosto-Perez; P. Korniliev; A.J. Greenberg, M.E.B. Naredo; S.M.Q. Mercado; S.E.**

- Harrington; Y. Shi; D.A. Branchini; P.R. Kuser-Falcão; H. Leung; K. Ebana,... J. Mezey (2016).** Open access resources for genome-wide association mapping in rice. *Nature Communications* 7(1): 10532.
- Mohammed, S.; A.A. Samad & Z. Rahmat (2019).** *Agrobacterium*-mediated transformation of rice: constraints and possible solutions. *Rice Science* 26(3): 133-146.
- Murashige, T. & F. Skoog (1962).** A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15(3): 473-497.
- Pazuki, A. & M. Sohani (2013).** Phenotypic evaluation of scutellum-derived calluses in 'Indica' rice cultivars. *Acta Agriculturae Slovenica* 101: 239-247.
- Ratanasut, K.; W. Rod-In & K. Sujipuli (2017).** *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of rice. *Rice Science* 24(3): 181-186.
- Rod-in, W.; K. Sujipuli & K. Ratanasut (2014).** The floral-dip method for rice (*Oryza sativa*) transformation. *Journal of Agricultural Technology* 10(2): 467-474.
- Romero, F.M. & A. Gatica-Arias (2019).** CRISPR/Cas9: development and application in rice breeding. *Rice Science* 26(5): 265-281.
- Saba-Mayoral, A.; L. Bassie; P. Christou & T. Capell (2022).** Development of a facile genetic transformation system for the Spanish elite rice paella genotype Bomba. *Transgenic Research* 31(3): 325-340.
- Sahoo, K.K.; A.K. Tripathi; A. Pareek; S.K. Sopory & S.L. Singla-Pareek (2011).** An improved protocol for efficient transformation and regeneration of diverse indica rice cultivars. *Plant Methods* 7(1): 49.
- Sasaki, T. & B. Burr (2000).** International rice genome sequencing project: the effort to completely sequence the rice genome. *Current Opinion in Plant Biology* 3(2): 138-142.
- Shimamoto, K. & J. Kyojuka (2002).** Rice as a model for comparative genomics of plants. *Annual Review of Plant Biology* 53(1): 399-419.
- Smith, C.W. & R.H. Dilday (2002).** Rice: origin, history, technology, and production. C.W. Smith & R.H. Dilday Ed. *Wiley Series in Crop Science*. 664 pp.
- Sood, P.; A. Bhattacharya & A. Sood (2011).** Problems and possibilities of monocot transformation. *Biologia Plantarum* 55(1): 1-15.
- Supartana, P.; T. Shimizu; H. Shioiri; M. Nogawa; M. Nozue & M. Kojima (2005).** Development of simple and efficient *in planta* transformation method for rice (*Oryza sativa* L.) using *Agrobacterium tumefaciens*. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 100(4): 391-397.
- Tripathy, S.K. (2021).** Optimization of culture variables for efficient callus induction and rapid plant regeneration in zinc rich rice (*Oryza sativa* L.) cv. "Chittimuthyalu". *Journal of Applied Biology & Biotechnology* 9(4): 1-9.
- Tripathy, S.K.; M. Maharana; S. Panda; B. Sahoo; D.B. Sahoo; S.K. Behera & B. Chakma (2018).** Exploring efficient callusing and rapid regeneration system in upland rice (*Oryza sativa* L.). *Rice Genomics and Genetics* 9(2): 7-14.
- Turnbull, C.; M. Lillemo & T.A.K. Hvoslef-Eide (2021).** Global regulation of genetically modified crops amid the gene edited crop boom – a review. *Frontiers in Plant Science* 12.
- Vazquez-Vilar, M.; V. Garcia-Carpinter; S. Selma; J.M. Bernabé-Orts; J. Sanchez-Vicente; B. Salazar-Sarasua; A. Ressa; C. de Paola; M. Ajenjo; J.C. Quintela; A. Fernández; A. Granell & D. Orzáez (2021).** The GB4.0 platform, an all-in-one tool for CRISPR/Cas-based multiplex genome engineering in plants. *Frontiers in Plant Science* 12: 689937-689937.
- Vega, R.; N. Vásquez; A.M. Espinoza; A.M. Gatica & M. Valdez-Melara (2009).** Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Revista de Biología Tropical* 57: 141-150.
- Yaqoob, U.; T. Kaul & I.A. Nawchoo (2021).** *In vitro* plant regeneration of some recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Vegetos* 34(1): 102-106.