

## Las condiciones de cocultivo determinan la eficiencia de transformación de arroz (var. IACuba-28) mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Maylin Pérez Bernal\*<sup>1</sup>, Yamilet Coll<sup>2</sup>, Merardo Pujol<sup>3</sup>, Raúl Armas<sup>1</sup>, Julio Alfonso<sup>1</sup>, Carlos Hernández<sup>1</sup>, Annerys González<sup>1</sup>, Daymi Abreu<sup>1</sup>, Onel Valdivia<sup>1</sup>, Magalis Delgado<sup>1</sup>.

<sup>(1)</sup>Departamento de Investigaciones. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado Postal 83, Código Postal 60200, Sancti Spiritus, Cuba.

maylin.perez@cigb.edu.cu. <sup>(2)</sup>Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana, Cuba. <sup>(3)</sup>Investigaciones Agropecuarias. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba.

**Palabras clave:** Callos, cocultivo,  $\beta$ -glucuronidasa, higromicina

segregación de los genes *hpt* y *gus*. Ambos genes cosegregaron de forma mendeliana en la generación T<sub>1</sub>.

### RESUMEN

Se describe la incidencia de las condiciones de cocultivo en la eficiencia de transformación genética de arroz *Oryza sativa* L. (var. IACuba-28, ssp. *indica*). Se utilizó la cepa EHA105 de *A.tumefaciens*, portadora del vector pCAMBIA1301, que contiene los genes *gus* y *hpt*. Se cocultivaron callos embriogénicos con la bacteria en diferentes condiciones, para evaluar el efecto de la temperatura, de la concentración de acetosiringona y del tiempo de cocultivo, sobre la expresión del gen *gus* en los callos. El mayor porcentaje de callos con puntos azules (33.3%) se logró con el cocultivo durante 3 días a 20°C, incluyendo 100  $\mu$ M de acetosiringona en el medio de cocultivo. Para la selección de transformantes se efectuaron dos subcultivos de 7 días con 50 mg/l de higromicina. El 40% de los callos fueron resistentes al antibiótico. A partir de ellos ocurrió la regeneración de plantas, que fueron evaluadas por PCR y PCR-Southern para comprobar la presencia de los transgenes. Las plantas se llevaron a un invernadero para obtener semillas fértiles, que se utilizaron en un estudio de

**Key words:** callus, co-cultivation,  $\beta$ -glucuronidase, hygromycin

### ABSTRACT

The present work describes the incidence of co-cultivation conditions on genetic transformation efficiency of rice *Oryza sativa* L. (var. IACuba-28, ssp. *indica*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. It was used EHA105 strain harbouring the vector pCAMBIA1301, which includes *gus* and *hpt*. genes. Embryogenic calli were cocultivated with bacteria in different conditions, in order to evaluate the effect of temperature, acetosyringone concentration and co-cultivation time, on GUS expression. The best conditions for  $\beta$ -glucuronidase expression consisted of: co-cultivation media with acetosyringone 100  $\mu$ M, temperature of 20°C during 3 days as most favourable co-cultivation time. Under these conditions we obtained 33.33% of calli with blue spots. After two subcultures for seven days, on selection media containing 50 mg/l hygromycin, we found that 40% of calli were

hygromycin-resistant, and they were placed on regeneration media. Regenerated plants were evaluated by PCR and PCR-Southern blotting, verifying the presence of transgenes. Plants were

transferred to a greenhouse and fertile seeds were obtained. Both genes, *gus* and *hpt*, co segregated in mendelian form in T<sub>1</sub> progeny.

---

### INTRODUCCIÓN

Dentro de las gramíneas el arroz (*Oryza sativa* L.) es el cultivo que proporciona más calorías por hectárea y representa la cuarta parte del total de calorías que se consumen por los humanos en todo el mundo. Por estas razones, es alarmante que se pronostique a corto plazo un estancamiento en el total global de áreas de cultivo de arroz, con la consecuente pérdida de aproximadamente 130 millones de toneladas (Khush, 2001). Resultará muy difícil enfrentar la demanda de arroz que se prevé según el incremento poblacional, para lo cual se necesitaría un aumento de 755 millones de toneladas en la producción global hasta el año 2012 (Brookes & Barfoot, 2003). Es imperativo lograr producciones eficientes, sin pasar por alto la protección medioambiental y el uso más racional de los recursos agua y tierra. Una opción viable es el mejoramiento del cultivo mediante ingeniería genética, como una herramienta útil para disminuir las pérdidas en los rendimientos, causadas por agentes bióticos y abióticos que devastan los cultivos.

Varios grupos de investigadores en el mundo han desarrollado procedimientos de transformación genética de plantas en los que media una bacteria del suelo: *Agrobacterium tumefaciens*. Resultados exitosos con este método, aplicado al arroz, fueron obtenidos por primera vez por Hiei *et al.* (1994), Rashid *et al.* (1996) y Dong *et al.* (1996), que lograron transformar variedades japonesa, indica y

javanica, respectivamente. Para optimizar los procesos de transformación se han estudiado diversos factores, como el tipo de explante, la cepa de *A. tumefaciens*, el tiempo, las condiciones de inoculación de los tejidos, y la presencia de necrosis tisular causada por *Agrobacterium* (Wei *et al.*, 2000; Chakrabarty *et al.*, 2002; Ko *et al.*, 2003).

El cocultivo explante-bacteria es un paso determinante en la transformación. Comprende las primeras etapas de la transferencia de genes al núcleo de la célula vegetal. Se ha planteado la importancia de la activación de los genes *vir* a temperaturas alrededor de 20°C y con suficientes cantidades de compuestos fenólicos durante el cocultivo de la cepa de *A. tumefaciens* con el explante (Valderrama *et al.*, 2005). Los resultados en el porcentaje de plantas transformadas varían de acuerdo a la especie vegetal evaluada y a la concentración de acetosiringona utilizada (Chakrabarty *et al.*, 2002).

El presente trabajo demuestra la incidencia de las condiciones de cocultivo en la eficiencia de transformación genética mediante *A. tumefaciens* de la variedad cubana de arroz IACuba-28. Se utilizan callos embriogénicos como explantes, y la cepa de *A. tumefaciens* EHA105 portadora del vector pCAMBIA 1301. Se evalúa de forma independiente la incidencia de la temperatura, del tiempo de cocultivo y de la concentración de acetosiringona, sobre la expresión del gen *gus* en los callos transformados. Se analiza, además, la

segregación de los genes *hpt* (higromicina fosfotransferasa) y *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa) en plantas de la generación T<sub>1</sub>.

### MATERIALES Y MÉTODOS

#### *Formación de callos.*

Se utilizaron semillas maduras de arroz (*O. sativa* L.), de la variedad IACuba-28, perteneciente a la subespecie índica. Las semillas fueron descascaradas manualmente y desinfectadas 1 min en etanol 70% (v/v) y 20 min en hipoclorito de sodio comercial 2.5%. Posteriormente se lavaron con agua estéril y se secaron sobre papel absorbente. Las semillas fueron sembradas en placas Petri con medio de formación de callos 2N6, constituido por las sales y vitaminas del N6 (Chu *et al.*, 1975), 1.0 g/l de hidrolizado de caseína, 30 g/l de sacarosa, 2.5 mg/l de ácido 2.4-diclorofenoxiacético. El pH se ajustó a 5.7 y se utilizaron 3.0 g/l de fitagel como agente gelificante. Las placas con semillas se incubaron en la oscuridad a 28±1°C durante 21 días.

#### *Cultivo de la cepa de A. tumefaciens.*

Se utilizó la cepa supervirulenta EHA-105 de *A. tumefaciens*, portadora del vector binario pCAMBIA1301, que contiene el gen *hpt* como marcador de selección para la resistencia a higromicina, así como la secuencia del gen reportero *gus* ( $\beta$ -glucuronidasa), interrumpido por el primer intrón del gen catalasa 1 del frijol de castor (*Ricinus communis*). Ambos genes están regulados por el promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. La cepa fue cultivada en 50 ml de medio AB líquido (Hiei *et al.*, 1994) con acetosiringona 100  $\mu$ M, kanamicina 50 mg/l y rifampicina 40 mg/l. Se

incubó durante 30 h en un agitador rotatorio, a 250 rpm y 28±1°C. El cultivo se centrifugó 20 min a 3000 xg, para precipitar la masa celular, la cual se resuspendió en medio de infección AAM (Hiei *et al.*, 1994), hasta una densidad óptica igual a uno, medida a 600 nm.

#### *Cocultivo de los callos con A. tumefaciens.*

Los callos se embebieron en la suspensión bacteriana, agitando suave y ocasionalmente durante 10 min. A continuación la suspensión fue decantada y se secaron los callos sobre papel absorbente estéril.

Se evaluaron los siguientes tratamientos para el cocultivo de los callos con la bacteria. Para cada tratamiento se realizaron tres repeticiones con 1000 callos cada una:

Efecto de la temperatura: Los callos fueron colocados en placas Petri con medio de cocultivo 2N6 modificado con 10 g/l de glucosa y pH 5.2. Se incubaron durante 3 días, en la oscuridad, a tres temperaturas de cocultivo: 20, 25 y 28°C.

Concentración de acetosiringona: En el medio de cocultivo anterior se probaron tres concentraciones de acetosiringona: 100, 150 y 200  $\mu$ M. Los callos se situaron en oscuridad, durante 3 días, a 20°C.

Tiempo de cocultivo: Se utilizó el medio de cocultivo con 100  $\mu$ M de acetosiringona. Los callos se situaron a 20 °C, en oscuridad, pero distribuidos para tres tiempos de cocultivo: 3, 5 y 7 días.

#### *Lavado de los callos y detección de la actividad $\beta$ -glucuronidasa.*

Los callos se lavaron cinco veces con agua destilada estéril, más un lavado final durante 10 min con cefotaxima 500 mg/l. Para evaluar la influencia

de cada tratamiento en la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa, se realizó a muestras de callos la tinción histoquímica según el procedimiento descrito por Jefferson (1987). Se calculó el porcentaje de callos con puntos azules por tratamiento.

*Selección de los callos transformados.*

Para la selección con higromicina se escogieron los callos cocultivados con el tratamiento de mejor resultado en la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa. Estos callos se colocaron en placas Petri con medio de selección 2N6, cefotaxima 500 mg/l y higromicina 50 mg/l. Se realizaron dos subcultivos de siete días cada uno, con el refrescamiento del medio de cultivo terminado el primer subcultivo. Se dispuso además de un grupo de callos no transformados, que fueron distribuidos en dos partes: unos que se cultivaron en medio de cultivo sin higromicina (control positivo), y otros, en presencia del antibiótico (control negativo).

*Regeneración de plantas a partir de callos.*

Los callos resistentes a higromicina se transfirieron a placas Petri con el medio de regeneración propuesto por Pérez Bernal *et al.* (2002), con cefotaxima 250 mg/l y higromicina 50 mg/l. Para comprobar la efectividad del medio de cultivo y de la higromicina se dispuso de un grupo de callos no transformados como controles positivo y negativo.

El cultivo transcurrió con fotoperíodo de 16 h de luz fluorescente y 8 h de oscuridad, a  $27\pm 1^\circ\text{C}$ . Las plantas regeneradas se transfirieron a frascos de vidrio con medio de enraizamiento, consistente en

las sales del MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarosa 30 g/l, higromicina 50 mg/l y fitagel 3.0 g/l. Pasados diez días, las plantas se sembraron en un sustrato compuesto por humus y arcilla en una proporción 3:1, respectivamente, y se mantuvieron en un invernadero con incidencia de la luz solar y temperatura de  $27\pm 1^\circ\text{C}$ . Se tomaron fragmentos de hojas y tallos para realizar el ensayo histoquímico GUS (Jefferson, 1987).

La eficiencia de transformación se determinó por la relación siguiente:

$$\text{Eficiencia de transformación} = \frac{\text{Total de plantas resistentes a higromicina}}{\text{Número inicial de callos cocultivados}} \times 100$$

*Análisis del ADN genómico de plantas resistentes a higromicina.*

El ADN total fue aislado, a partir de hojas de plantas resistentes a higromicina y de plantas no transformadas. Para los ensayos de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y PCR-Southern se utilizó 0.5  $\mu\text{g}$  de ADN de cada muestra. Las muestras fueron sometidas a PCR para amplificar el gen *hpt*, con el programa siguiente: 3 min a  $95^\circ\text{C}$ , seguido de 1 min a  $93^\circ\text{C}$ , 1 min a  $55^\circ\text{C}$  y 1 min a  $72^\circ\text{C}$ , repetido en 35 ciclos, y finalmente 3 min a  $72^\circ\text{C}$ . La mezcla de reacción, para 50  $\mu\text{l}$  de volumen total, consistió en: cloruro de magnesio 2.5 mM, desoxirribonucleótidos trifosfatos (dNTPs) 0.2 mM, 3U de *Taq* ADN Polimerasa. Se utilizaron los oligonucleótidos siguientes:

*hpt* sentido:

**5'-CTGCCTGAAACCGAACTGC-3** (0.2  $\mu\text{M}$ )

*hpt* antisentido:

**5'-CTTCTGCGGGCGATTTGTG-3'** (0.2  $\mu\text{M}$ )

Se realizó un PCR-Southern para detectar el gen *gus* en dos plantas escogidas al azar. El programa para PCR fue el siguiente: 4 min a 95°C, 1 min a 60°C, 3 min a 72°C, seguido de 1 min a 93°C, 1 min a 60°C y 3 min a 72°C, repetido en 35 ciclos, y por último 3 min a 72°C. La mezcla de reacción consistió en: cloruro de magnesio 2.5 mM, dNTPs 0.2 mM, 5U de *Taq* ADN Polimerasa, y los oligonucleótidos empleados fueron los siguientes: 35S sentido:

5'-GCCGACAGTGGTCCCAAAGAT-3' (0.2 µM)

ntos antisentido:

5'-GATAATCATCGCAAGACCGGC-3' (0.2 µM)

El producto de la reacción se chequeó por electroforesis en gel de agarosa 0.8 % (p/v), y se transfirieron las bandas del gel a una membrana de nitrocelulosa Hybond-N<sup>+</sup> (Amersham, Biosciences), para realizar el Southern blot, utilizando una sonda específica para el *gus*, marcada no radiactivamente. Se siguió la técnica descrita por DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II (Boehringer Mannheim).

*Estudio de segregación de los genes hpt y gus en la generación T<sub>1</sub> de plantas resistentes a higromicina.*

Se escogieron 30 semillas de diez plantas resistentes a higromicina. Se sembraron en medio MS (Murashige & Skoog, 1962), sacarosa 30 g/l, higromicina 50 mg/l, y fitagel 3.0 g/l, y se cultivaron bajo el mismo régimen de fotoperíodo aplicado a la regeneración. El número de semillas resistentes y sensibles a higromicina se cuantificó a los 10 días de iniciado el experimento, atendiendo al total de plantas que germinaron y que no germinaron, respectivamente. La presencia del gen *gus* se comprobó realizando el ensayo histoquímico GUS

(Jefferson, 1987) con hojas y tallos de las plantas germinadas.

*Análisis estadístico de los resultados.*

Los porcentajes de callos con puntos azules por tratamiento de cocultivo fueron estudiados mediante un análisis de varianza unifactorial, completamente aleatorizado. La comparación múltiple de medias se realizó con el test de Student-Newman-Keuls. En el estudio de segregación del gen *hpt* para la resistencia a higromicina, los números de semillas resistentes y sensibles al antibiótico se procesaron mediante una prueba Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ) de bondad de ajuste, realizando la corrección de Yates. Para el procesamiento de datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.5.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Formación de callos*

En las semillas cultivadas en medio 2N6 se detectó la formación de callos con estructuras proembriogénicas nodulares, friables y de color amarillo brillante, con algunos embriones somáticos en etapa globular, blanquecinos y traslúcidos. Saharan *et al.* (2004) plantearon que la formación de callos de arroz ocurre a partir del escutelo de las semillas maduras. Se ha descrito la competencia del tejido escutelar para la formación de callos embriogénicos, que los avala como excelentes explantes para lograr alta eficiencia de transformación mediada por *A. tumefaciens*, debido a que en sus tejidos se promueve la expresión de las proteínas VirE del *Agrobacterium* (Pipatpanukul *et al.*, 2004). Se ha definido, además, que los callos son explantes con tejido meristemático donde se producen sustancias inductoras de los genes *vir*,

existe un balance favorable de hormonas endógenas y disponibilidad de receptores para la unión del *A. tumefaciens* (Smith & Hood, 1995).

*Influencia de la temperatura, la concentración de acetosiringona y el tiempo de cocultivo en la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en callos transformados.*

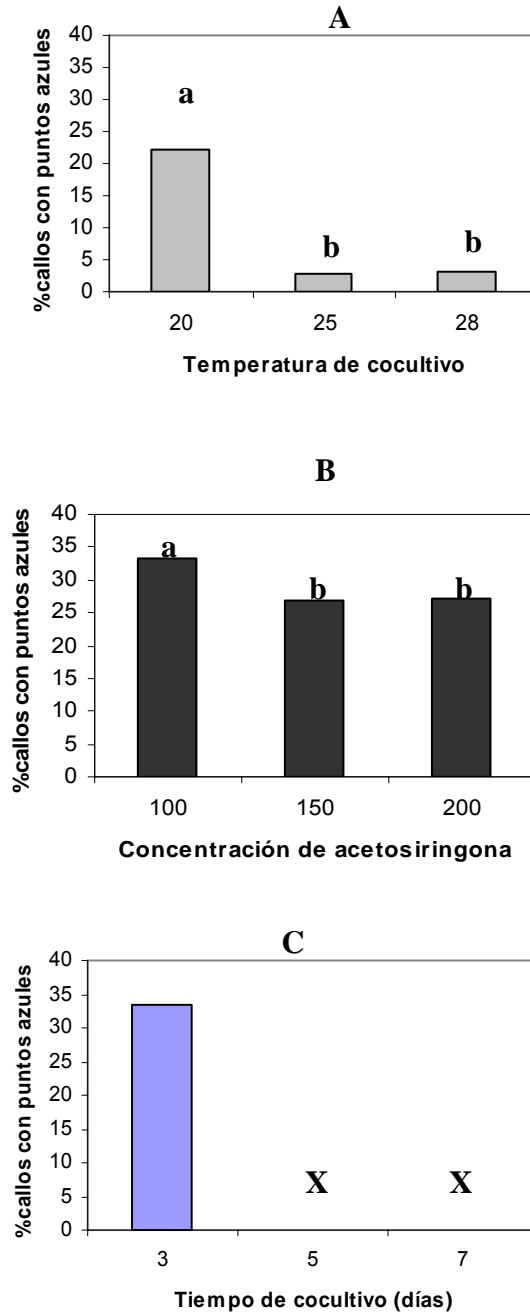
La presencia del intrón del gen catalasa del frijol de castor, interrumpiendo la secuencia del gen *gus* en el plásmido, permitió evaluar la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa inmediatamente después del lavado, sin que los restos de la bacteria interfirieran en los resultados.

Influencia de la temperatura de cocultivo: El mayor porcentaje de callos con puntos azules se obtuvo en los cocultivos a 20°C. Cuando el cocultivo se realizó a 25 y 28°C, se encontraron evidencias de actividad  $\beta$ -glucuronidasa en menos del 3.0% de los callos (Figura 1A). El cultivo de callos de variedades cubanas de arroz se ha realizado de manera eficiente a una temperatura 28±1°C (Pérez Bernal *et al.*, 2002, 2007). Sin embargo, la influencia de la baja temperatura en el éxito de la expresión del gen *gus* en callos transformados, demostró que el cocultivo de los mismos con *A. tumefaciens* debe transcurrir a 20°C. Este comportamiento responde a la teoría de la termo-sensibilidad de la transferencia de los genes del ADN-T a las células vegetales, la cual propone que la estabilidad del aparato de transferencia VirB-

VirD4 es dependiente de la temperatura, y que la producción de VirD2 y VirG y la inducción de *virG* son óptimas a 19°C (Fullner *et al.*, 1996). En un estudio realizado por Baron *et al.* (2001) en varias cepas de *Agrobacterium*, se demostró que la expresión de las proteínas relacionadas con la virulencia se reduce al aumentar la temperatura de 20 a 28°C, por una aparente desestabilización de un transportador tipo IV al cual están asociadas.

La temperatura óptima para el cocultivo depende del explante y del genotipo. Por encima de 25°C se induce un mayor necrosamiento del material vegetal y una reducción en la tasa de transformación (Chakrabarty *et al.*, 2002). Sin embargo, Tyagi *et al.* (2007) afirmaron que en la transformación de la variedad índica ADT39, mediada por *A. tumefaciens*, la temperatura adecuada para el cocultivo de callos-bacteria fue 28°C. Saharan *et al.* (2004) realizaron el cocultivo de callos a 25±1°C, en los cultivares índica HKR-46 y HKR-126, logrando porcentajes de 28.9 y 44.4% de expresión GUS, respectivamente.

Efecto de la concentración de acetosiringona en el medio de cocultivo: El mayor porcentaje de callos con puntos azules se logró con 100  $\mu$ M de acetosiringona (Fig. 1B), la mínima concentración reportada para las variedades índica (Hiei *et al.*, 1994). En los callos cocultivos con 150  $\mu$ M y 200  $\mu$ M, los porcentajes de puntos azules fueron menores y sin diferencias significativas entre sí ( $p \leq 0.05$ ).



**Fig. 1.** Incidencia de (A) la temperatura de cocultivo, (B) la concentración de acetosiringona en el medio de cocultivo y (C) el tiempo de cocultivo, en la actividad de la enzima  $\beta$ -glucuronidasa en callos de arroz (variedad IACuba-28) transformados con *A. tumefaciens*, y sometidos a ensayo histoquímico. En 1C la "X" significa que no fue posible realizar el ensayo histoquímico debido a la total necrosis de los callos. Letras diferentes denotan diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Student-Newman-Keuls,  $p \leq 0.05$ ).

La acción estimuladora de la acetosiringona sobre la transformación mediada por *A. tumefaciens*, se demuestra analizando los

resultados del experimento de influencia de la temperatura (Fig. 1A), donde no se incluyó este compuesto fenólico en el medio de cocultivo. En

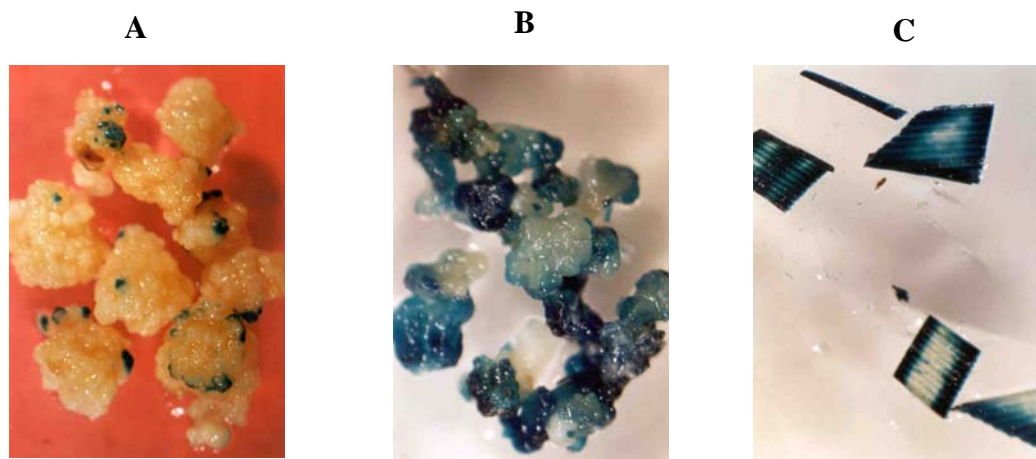
ese caso se logró apenas un 22.1% de callos con puntos azules en la mejor condición: 20°C. Sin embargo, con la misma temperatura, pero adicionando acetosiringona al medio de cocultivo, todos los valores estuvieron por encima del 25% y el máximo sobrepasó el 33%. No obstante, el uso de concentraciones elevadas de acetosiringona, por encima de 200  $\mu\text{M}$ , puede causar efectos negativos sobre la transferencia del ADN-T de *A. tumefaciens*, porque este compuesto actúa como bacteriostático (Sheng & Citovsky, 1996).

**Tiempo de cocultivo:** Transcurrido el cocultivo de 3 días, se obtuvo un porcentaje de 33.3 % de callos con puntos azules (Fig. 1C). Sin embargo, en los callos cocultivados durante 5 y 7 días con *A. tumefaciens* no fue posible realizar el ensayo histoquímico, debido a que todos sufrieron necrosis, por el excesivo tiempo de acción de la bacteria sobre las células de los callos. El tiempo de cocultivo compromete la eficiencia de eliminación de la bacteria y la viabilidad de los tejidos. Cuando

este tiempo se prolonga por más de 3 días el *A. tumefaciens* puede colonizar completamente los tejidos y provocarles letales secuelas (Amoah *et al.*, 2001).

#### Selección de los callos transformados.

Los callos del control positivo no modificaron su color ni ritmo de crecimiento; mientras que los del control negativo cambiaron de amarillo a pardo oscuro y no fueron viables. El 40% de los callos cocultivados inicialmente con *A. tumefaciens* fueron resistentes a higromicina, observándose en ellos un incremento en las masas proembriogénicas y los embriones globulares. Luego del ensayo histoquímico GUS, se encontraron en los callos grandes áreas teñidas de azul, de mayor tamaño que los grupos de puntos detectados inicialmente después del cocultivo, lo que sugiere la multiplicación de las células portadoras del gen *gus* (Fig. 2, A y B).



**Fig. 2.** Actividad transitoria de la  $\beta$ -glucuronidasa en: (A)- callos embriogénicos de arroz de la variedad IACuba-28, cocultivados con *A. tumefaciens*, en medio de cocultivo con 100 $\mu\text{M}$  de acetosiringona, durante 3 días a 20°C, (B)- Callos con grandes áreas de color azul por la tinción histoquímica, luego de 2 semanas de selección en higromicina, (C)- Fragmentos de hojas y tallos de plantas regeneradas.

#### Regeneración y cultivo de las plantas resistentes a higromicina.

A los 25 días de cultivo de los callos del control positivo en el medio de regeneración, se observó la



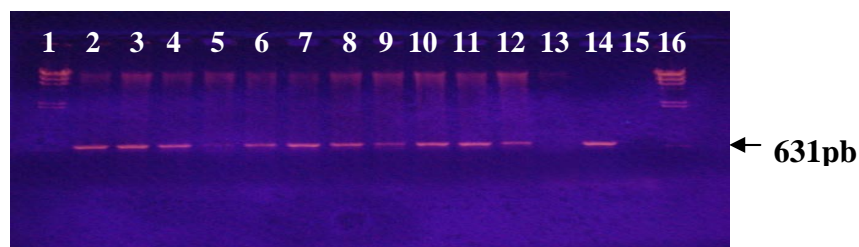
formación de plantas completas en el 100% de ellos. Estudios previos realizados por Pérez Bernal *et al.* en el 2007, demostraron que en el medio de cultivo utilizado se propicia la maduración y germinación de los embriones somáticos, hasta dar lugar a plantas completas. Los callos del control negativo se tornaron pardos y necróticos, sin señales de regeneración de plantas, como consecuencia del efecto letal de la higromicina. Del 61% de los callos resistentes a higromicina regeneraron plantas completas y con fenotipo normal. Este proceso comenzó 30 días después de transferidos los callos al medio de regeneración. En los 21 días siguientes se obtuvieron 128 plantas, que fueron transferidas a medio de enraizamiento con higromicina. Las plantas desarrollaron su sistema radicular y alcanzaron una altura promedio del tallo de 10.2 cm. En los fragmentos de hojas y tallos de las plantas sometidas al ensayo histoquímico GUS, se observó la expresión de la  $\beta$ -glucuronidasa (Fig. 2C).

Las plantas transplantadas al invernadero, produjeron semillas fértiles al cabo de los 140 días de cultivo en esas condiciones, cumpliendo el ciclo correspondiente a la variedad IACuba-28.

La eficiencia de transformación obtenida fue de 12.8 %, cifra que supera a otros valores de eficiencia reportados para variedades japónica e índica. Dai *et al.* (2001) lograron un 7% de eficiencia de transformación de la variedad japónica Taipei 309. En el 2004, Pipatpanukul *et al.* obtuvieron 12 plantas transgénicas tipo índica, a partir de 450 callos cocultivados con la cepa EHA105 de *A. tumefaciens*, para una eficiencia de 2.66%.

#### Análisis de ADN genómico.

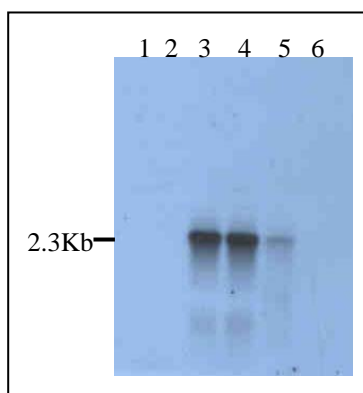
La presencia del gen marcador de selección *hpt* en plantas regeneradas fue demostrada mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). Se observaron en el gel de agarosa las bandas de 631 pares de bases en todas las muestras de ADN de las plantas sometidas al ensayo (Fig. 3). Esta talla es la esperada para el fragmento amplificado, que se extiende desde la posición 307 hasta la 938 de la región codificante del gen *hpt*. La banda del vector pCAMBIA1301, utilizado como control positivo, apareció a la misma altura que las correspondientes a los fragmentos amplificados en las muestras de ADN de las plantas que se analizaron.



**Fig. 3.** Electroforesis en gel de agarosa donde se muestran los resultados de la Reacción en Cadena de la Polimerasa al ADN total purificado de hojas de plantas resistentes a higromicina. Se utilizaron oligonucleótidos específicos a la región codificante del gen *hpt*. 1 y 16- Marcador de Peso Molecular  $\lambda$ -HindIII. 2 al 12- Plantas 52, 66, 68, 69, 79, 94, 105, 106, 107, 117, respectivamente. 13- Planta no transformada. 14- Control Positivo (pCAMBIA1301). 15- Control Negativo (pBlueScript).

Se comprobó la presencia del gen *gus* en las dos plantas que se escogieron para la reacción de PCR y posterior hibridación con una sonda marcada no radiactivamente y específica para este gen. En la Fig. 4 se distinguen las bandas de 2.34 kb pertenecientes a ambas plantas y al control

positivo. La talla de la banda se corresponde con el fragmento de interés, que incluye parte del promotor 35S, el gen *gus* con el primer intrón del gen de la catalasa 1 del frijol de castor, y parte del terminador.



**Fig. 4.** Resultado del PCR-Southern Blot para detectar el gen *gus* en plantas de arroz. 1-Marcador de peso molecular, 2-Planta no transgénica (Control negativo), 3-Planta transgénica 52, 4-Planta transgénica 79, 5-Plásmido pCAMBIA 1301 (Control positivo) y 6-Control sin ADN.

Los resultados de este análisis de ADN genómico confirman la presencia de los genes *hpt* y *gus* en las plantas 52 y 79. En el resto de las plantas que fueron analizadas por PCR para amplificar el gen *hpt*, fue positivo el ensayo histoquímico para detectar la  $\beta$ -glucuronidasa en sus hojas y tallos.

#### *Segregación de los genes hpt y gus en las plantas de la generación T<sub>1</sub>.*

En la generación T<sub>1</sub>, obtenida de semillas de ocho de las diez plantas analizadas, se cumplió la segregación mendeliana 3:1 del gen *hpt* (Tabla 1), y fue demostrada la actividad de la  $\beta$ -glucuronidasa mediante el ensayo histoquímico en los tejidos.

Los genes *gus* y *hpt* están incluidos en el casete de expresión que se transfiere del plásmido de *A. tumefaciens* al núcleo de la célula, y se espera que esta secuencia de ADN debe insertarse completa en el genoma vegetal, tratándose de una transformación mediada por *A. tumefaciens*. Por tal motivo puede ocurrir la cosegregación de los genes *gus* y *hpt* en las plantas de la generación T<sub>1</sub>.

En 1996, Dong *et al.* y Hiei & Komari, revelaron la cosegregación de los genes *hpt* y *gus* en plantas de arroz javánica e índica, respectivamente, derivadas de la transformación genética mediante *A. tumefaciens*. La presencia de ambos genes en las plantas se confirmó realizando tinción histoquímica GUS en los tejidos transformados, y

**Tabla 1.** Segregación de los genes *hpt* y *gus* en la generación T<sub>1</sub> de arroz variedad IACuba-28, transformado mediante *Agrobacterium tumefaciens*.

Planta Nº	Total de semillas a germinar	Semillas Hig <sup>(r)</sup>	Semillas Hig <sup>(s)</sup>	Relación	( $\chi^2$ )	GUS
8	30	22	8	3:1	0.04	+
10	30	25	5	3:1	1.11	+
52	30	22	8	3:1	0.04	+
79	30	24	6	3:1	0.40	+
90	30	9	21	?	32.40*	-
94	30	23	7	3:1	0.04	+
96	30	14	16	?	12.84*	-
100	30	22	8	3:1	0.04	+
110	30	22	8	3:1	0.860	+
117	30	23	7	3:1	0.04	+

\* No cumple la segregación mendeliana 3:1 ( $p \leq 0.05$ )

Leyenda: Hig<sup>(r)</sup>: Resistentes a higromicina Hig<sup>(s)</sup>: Sensibles a higromicina

PCR y Southern Blot al ADN de hojas jóvenes, para detectar el gen *hpt*.

En una investigación realizada por Cheng *et al.* (1998) en arroz transformado mediante *A. tumefaciens*, con genes *cry* de *Bacillus thuringiensis* y con el gen reportero *gus*, se observó la cosegregación mendeliana 3:1 de ambos genes en el 97% de las plantas de la generación T<sub>1</sub>. Estos autores plantearon que el escaso número de plantas que no cumplieron la segregación esperada, pueden ser quimeras resultantes de la transgénesis. El alto porcentaje de cosegregación en la expresión de los transgenes, ratificó la baja tasa de rearrreglos genéticos que se origina con la transformación mediada por *A. tumefaciens*.

## REFERENCIAS

Amoah BK, Wu H, Sparks C & Jones HD (2001) Factors influencing *Agrobacterium*-mediated

transient expression of *uidA* in wheat inflorescence tissue. *J. Exp. Bot.* 52: 1135-1142.

Baron C, Domke N, Beinhofer M, Hapfelmeier S (2001) Elevated temperature differentially affects virulence, VirB protein accumulation, and T-Pilus formation in different *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium vitis* strains. *J. Bact.* 183: 6852-6861.

Brookes G & Barfoot P (2003) GM rice: Will this lead the way for global acceptance of GM crop technology? ISAAA Briefs No.28, Cornell University, Ithaca, New York.

Chakrabarty R, Viswakarma N, Bhat SR, Kirti PB, Singh BD & Chopra VL (2002) *Agrobacterium* mediated transformation of cauliflower: optimization of protocol and development of Bt-transgenic cauliflower. *J. Biosc.* 27: 495-502.

- Cheng X, Sardana R, Kaplan H & Altosaar I (1998) *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic *cryIA(b)* and *cryIA(c)* genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Proc Natl Acad Sci.* 95: 2767–2772.
- 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. *Sci. Sin.* 18: 659-668.
- Dai S, Zheng P, Marmey P, Zhang S, Tian W, Chen S, Beachy RN & Fauquet C (2001) Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Mol. Breed.* 7: 25-33.
- Dong J, Teng WM, Buchholtz WG & Hall TC (1996) *Agrobacterium* mediated transformation of javanica rice. *Mol. Breed.* 2: 267-276.
- Fullner KJ, Lara JC & Nester EW (1996) Pilus assembly by *Agrobacterium* T-DNA transfer genes. *Science.* 173: 1107-1109.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T & Kumashiro T (1994) Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant J.* 6: 271-282.
- Hiei Y & Komari T (1996) Stable inheritance of transgenes in rice plants transformed by *Agrobacterium tumefaciens*. In: Proceedings of the Third International Rice Genetics Symposium, Manila (eds). Khush G.S. International Rice Research Institute, Philippines, pp 131-142.
- Jefferson R (1987) Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant. Mol. Biol. Rep.* 5: 387-405.
- Khush GS (2001) Green revolution: the way forward. *Nat. Rev. Genet.* 2: 815-822.
- Ko TS, Lee S, Krasnyanski S & Korban SS (2003) Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explants. *Theor. Appl. Genet.* 107: 439-447.
- Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.* 15: 473-479.
- Pérez Bernal M, Coll Y, González A, Alfonso J, Armas R, Hernández C & Pujol M (2002) Influencia de la fuente de carbono y el agente gelificante sobre la regeneración de arroz indica, variedad IACuba-28, a partir de callos. *Biotecnología Vegetal.* 2: 183-186.
- Pérez Bernal M, Delgado M, Hernández C & Armas R (2007) Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IACuba-28) resistentes a higromicina. *Rev. Colomb. Biotecnol.* 9: 35-40.
- Pipatpanukul T, Bunnag S, Theerakulpisut P & Kositrakul M (2004) Transformation of indica rice cv RD6 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Songk. J. Sci. Technol.* 26: 1-13.
- Rashid H, Yokoi S, Toriyama K & Hinata K (1996) Transgenic plant production mediated by *Agrobacterium* in indica rice. *Plant Cell Rep.* 15: 727-730.
- Saharan V, Yadav RC, Yadav RN & Ram K (2004) Studies on improved *Agrobacterium* mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *Afr. J. Biot.* 3: 572-575.
- Sheng J & Citovsky V (1996) *Agrobacterium*-plant cell DNA transport: have virulence proteins, will travel. *The Plant Cell.* 8: 1699-1710.

- Smith RH & Hood EE (1995) Review and Interpretation: *Agrobacterium tumefaciens*. Transformation of Monocotyledons. *Crop Sci.* 35: 301-309.
- Tyagi H, Rajasubramaniam S & Dasgupta I (2007) Regeneration and *Agrobacterium* mediated transformation of a popular indica rice variety ADT39. *Current Sci.* 93: 678-683.
- Valderrama AM, Arango R & Afanador L (2005) Transformación genética de plantas mediada por *Agrobacterium*: ingeniería genética natural y aplicada. *Rev. Fac. Nal. Agr. Medellín* 58: 2569-2585.
- Wei L, Guangqin G & Zheng G (2000) *Agrobacterium*-mediated transformation: state of the art and future prospect. *Chinese Sci. Bull.* 45: 1537-1546.