

## AVANCES EN LA TRANSFORMACIÓN DE ARROZ PERTENECIENTE A LA UNLP

Alejandro Chaves<sup>(1)</sup>, Analia Alet<sup>(1)</sup>, Santiago Maiale<sup>(1,2)</sup>, Oscar Ruiz<sup>(1)</sup>, Alfonso Vidal<sup>(2)</sup>, Rodolfo Bezus<sup>(2)</sup>, María Pinciroli<sup>(2)</sup>. <sup>1</sup>IIB-INTECh, camino circunvalación laguna Km 6, Chascomús <sup>2</sup>PMGA FCAyF UNLP, avidal@ceres.agro.unlp.edu.ar

El programa arroz desarrolla una importante tarea de mejoramiento en Argentina desde el año 1945, utilizando metodología tradicional. En estos últimos tiempos el mejoramiento fue revolucionado por la aparición de la tecnología de la transformación genética, y siguiendo las innovaciones tecnológicas, este programa

ha comenzado a desarrollar las capacidades necesarias para su realización en el ámbito científico local.

Las condiciones ecológicas en la zona de influencia de este programa se caracterizan por las bajas temperaturas que debe afrontar el cultivo sobre todo durante la implantación y en el momento de la floración, es por esto que se seleccionó para poner a punto el proceso de transformación, una construcción que posee un promotor que contiene elementos de respuesta a estrés.

Este promotor pertenece a la especie *Arabidopsis thaliana* y maneja la expresión de la proteína RD29A, se realizaron construcciones con este promotor manejando la expresión del gen reportero GUS y de una enzima de la biosíntesis de poliaminas (ADC), la cual había ya demostrado eficacia en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* para mejorar el comportamiento a estrés por frío y salino (Alet y col.2004). Las construcciones utilizadas se detallan a continuación:

35S	nptII	NOS	rd29	GUS	NOS
-----	-------	-----	------	-----	-----

35S	nptII	NOS	rd29	ADC	NOS
-----	-------	-----	------	-----	-----

Se decidió trabajar con los dos últimos cultivares inscriptos por la UNLP denominados Don Ignacio F.A. (DI) y Nutriar F.C.A y F.(N), el primero perteneciente al ecotipo indica, mientras que el segundo pertenece al ecotipo japónica. En primer termino se puso apunto el medio para generar callos.

Las semillas descascaradas se esterilizaron durante 30 min. en una solución de hipoclorito de sodio con 5g/L de cloro activo, enjuagándose 3 veces en agua estéril, para luego sembrarlas, operando en un flujo laminar.

Se ensayaron 2 medios distintos, MS y N6, a diferentes concentraciones de 2,4-D (entre 1 y 4 mg/L), debiendo descartarse el cultivar Nutriar debido a la presencia de un hongo endófito que no puede ser eliminado. Se compararon la variación del peso total promedio de los callos vs. concentración de 2,4-D para ambos medios. Como se puede observar en la figura 1, la concentración necesaria para generar la mayor masa de callos fue 2.5 mg/L de 2,4-D, y no existieron diferencias en el crecimiento entre el medio MS y N6.

Según lo descrito por Kumria R et al (2002) para generar callos de los ecotipos Índica (al cual pertenece DI) se utilizan 1.5 mg/L de 2,4-D, nosotros decidimos utilizar el medio MS y la concentración de 2 mg/L de 2,4D ya que a esta concentración el tamaño de callo obtenido es adecuado para la regeneración.

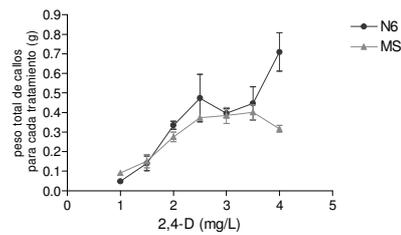


Fig. 1- Peso de los callos obtenidos para cada tratamiento. Cada concentración y medio se realizó por triplicado

Para la etapa de regeneración de plantas se probó un protocolo preliminar descrito por Kumria et al (2002) en la variedad DI. El medio utilizado fue MS con 2.5 mg/L Kinetina (KIN), 0.5 mg/L ácido Naftalen Acético (ANA) y 3% Maltosa. Se obtuvieron plantas fértiles pero en forma muy aleatoria. Posteriormente se realizó un experimento con combinaciones de 1.5, 2, 2.5 y 3 mg/L de KIN y 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/L de ANA, obteniéndose los mismos resultados siendo la única combinación de 2.5 mg/L de KIN y 0.5 mg/L de ANA la que produjo plantas.

El plásmido binario empleado para transformar los callos de arroz presenta el gen que codifica para la neomicina fosfotransferasa II (nptII) que confiere resistencia a antibióticos aminoglicosilados tales como Kanamicina, Neomicina, Geneticina (G418) y Paramomicina. En monocotiledóneas, la Kanamicina no es efectiva como agente de selección debido a que estas especies presentan resistencia natural a este antibiótico, por lo tanto se decidió usar Paramomicina. Entonces fue necesario establecer la concentración mínima de antibiótico para seleccionar callos transformados. Para esto se usó la variedad DI, por lo cual en primer lugar se probaron 5 concentraciones entre 12.5 y 200 mg/L. (Figura 2) y luego se hizo una escala más pequeña con 130, 140, 150, 170 mg/L resultando ser la concentración óptima a utilizar entre 150 y 170 mg/L de Paramomicina.



Fig 2. Ensayo de concentración de Paramomicina para la variedad DI. Se muestran callos sometidos a 12.5, 25, 50, 100 y 200 mg/L de Paramomicina

Se utilizó la cepa *A. tumefaciens* pGV3101 pMP90. Se transformó esta cepa con los plásmidos binarios rd29A:ADC y rd29A:GUS y se verificó por colony PCR (Figura 3). Como se puede observar, las transformantes fueron positivas.

Posteriormente se transformaron callos de arroz de la variedad DI por el método de co-cultivo con la cepa *A. tumefaciens* pGV3101

rd29A:GUS (Kumria et al., 2002), y se determinó la actividad GUS en callos transformados y control. Hasta el momento no se realizaron

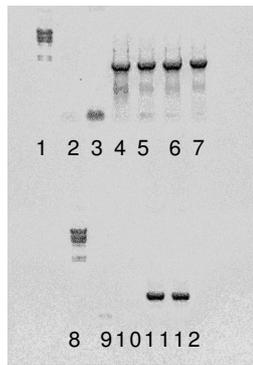


Fig 3. Análisis de las colonias de *A. tumefaciens* transformadas por colony PCR. Se analizaron las 3 colonias obtenidas para rd29A:ADC y la colonia para rd29A:GUS. 1 y 8)  $\lambda$ HIND, 2 y 9) control de amplificación de los primers entre si, 3 y 10) control de amplificación inespecífica (bacteria sin transformar) 4 y 11) control de amplificación específica para ADC y nptII, respectivamente, 5,6 y 7) colonias transformadas con rd29A:ADC y (12) con rd29A:GUS

transformaciones con la construcción rd29A:ADC. Como se puede observar en la figura 4, los callos tratados presentaron actividad GUS, indicando esto que se encuentran transformados.

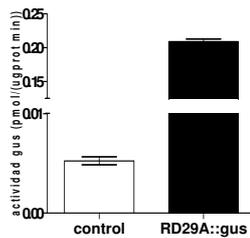


Fig. 4 Determinación de actividad GUS en callos transformados y control.

Como conclusión puede decirse que el protocolo de transformación aquí ensayado fue parcialmente eficiente, ya que no se pudieron obtener un número adecuado de plantas regenerantes del cultivar DI. Se concluye que se debería probar la regeneración en otros materiales y luego transmitir por cruzamiento el transgen a DI.

#### REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS:

Alet, A; Ruiz, O; Sánchez, D. **Expresión inducida por estrés de la arginina descarboxilasa en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana* sugiere diferentes roles de la putrescina en condiciones de congelamiento y estrés salino.** En: XXV REUNION ARGENTINA DE FISILOGIA VEGETAL, 2004, Santa Rosa. Actas XXV RAFV, 2004 p. 229.

Kumria, M; Rajam, M.V. **Alteration in polyamine titres during *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential.** Plant Science, v.162, n.5, p.769-777, 2002.