

VARIACIÓN SOMACLONAL EN UN ARROZ AROMÁTICO ARGENTINO

Mónica Rachoski¹; Ayelen Gazquez²; Rodolfo Bezus³; Alfonso Vidal³; Ana Menendez⁴; Oscar Ruiz⁵; Andrés Rodríguez⁴; Santiago Maiale⁴

Oryza sativa, Aroma, callos, marcador

INTRODUCCIÓN

El arroz es uno de los cereales de mayor importancia económica debido a que provee alimento a más de la mitad de la población mundial. Los arroces aromáticos, por su valor económico, pueden ser una opción de producción. Existen numerosas variedades aromáticas, como Basmati 370 y Khao Dawk Mali (Chaudhary, 2003). En el Programa Arroz de la Universidad Nacional de La Plata se obtuvieron variedades aromáticas adaptadas a las condiciones ambientales de Argentina, entre ellas La Candelaria F.A., clasificada como japónica tropical (Giarrocco, 2007) y seleccionada para realizar este trabajo.

La fragancia del arroz es una cualidad recesiva que puede ser detectada por medio de diferentes técnicas como métodos sensoriales clásicos, cromatografía gaseosa y actualmente, marcadores moleculares SNP, como el que se utilizó en este trabajo (Bradbury et al, 2005).

Dentro de las técnicas de mejoramiento se encuentra la variación somaclonal por medio del cultivo de tejido. La misma permite inducir variantes de variedades ya conocidas cuyas características esenciales conviene conservar.

En éste trabajo se realizaron por un lado evaluaciones de las condiciones necesarias para optimizar la regeneración del cultivar La Candelaria F.A. con el objetivo de generar variación somaclonal y por el otro se evaluó la variación fenotípica de los somaclones obtenidos.

MATERIALES Y METODOS

Las semillas del cultivar La Candelaria F.A., fueron descascaradas a mano y desinfectadas en una solución de Hipoclorito de sodio al 50 % en buffer 1M PO₄H₂ pH 5. Luego de 30 minutos se realizó el lavado en flujo laminar con agua destilada estéril en tres ocasiones y las semillas fueron sembradas en cajas de Petri en medio MS (Murashige y Skoog, 1962).

Para la elección de las condiciones de generación de callos y regeneración se realizaron experimentos en el medio MS, la concentración de 2,4D fue de 1, 2, 3 y 4 mg/l, las de 6-benzilaminopurina (BAP) 1, 2, 3 y 4 mg/l y las de ácido naftalen acético (ANA) 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 mg/l. Primero se realizó el ensayo de BAP con el agregado de 0,5 mg/l de ANA. Luego con la concentración de BAP seleccionado se realizó el experimento de concentración de ANA.

Los medios se distribuyeron en placas de Petri con concentraciones de Phytigel® 2 g/l y sacarosa al 3 %. Se sembraron 10 semillas por placa con 5 repeticiones para la generación de callos y de 5 callos por placa para los ensayos de regeneración. Las placas se incubaron en oscuridad a 25 °C para los callos y a 23 °C y un fotoperiodo de 16:8 de luz-oscuridad, con repiques a medio fresco cada 2 semanas para los experimentos de regeneración.

¹ Lic. Genética, Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH,

² Lic. Biología Molecular, Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH

³ Ing. Agrónomos, Programa Arroz, FCAYF, UNLP

⁴ Doctor en Biología, Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH smaiale@intech.gov.ar

⁵ Doctor en Bioquímica, Unidad de Biotecnología 1, IIB-INTECH

Los vástagos de más de 5 cm obtenidos fueron repicados a tubos de vidrio conteniendo medio MS para el enraizamiento. Los vástagos se incubaron en cámara de cultivo de plantas a 23 °C y fotoperíodo de 16:8 de luz-oscuridad.

Las plántulas enraizadas fueron trasplantadas en vasos con arena:perlita 1:1, regadas con solución Yoshida (Yoshida, 1976) y cultivadas en cámara hasta la obtención de semillas R1. Con estas semillas se realizó un experimento de comportamiento general en invernadero. Se midió la fluorescencia transientes de la clorofila con un fluorómetro (PocketPEA, Hansatech Instruments®). Los datos fueron analizados por el software PEA Plus (Hansatech Instruments®) y procesados en una tabla Excel (Microsoft®). Con los datos se realizó el análisis OJIP (Stirbet y Govindjee, 2011) que permite realizar la caracterización del funcionamiento del fotosistema II.

El análisis de marcadores SNP específicos para detectar polimorfismo en el gen *Badh2* que es el responsable del aroma en arroz (Chen *et al.*, 2008) se realizó utilizando el juego de cebadores, descriptos por Bradbury *et al.* (2005). La extracción de ADN se llevó a cabo acorde a Murray y Thompson, (1980). Los datos fueron procesados con el software Prism 5® (Graph Pad Prism Inc.) y también se realizó el análisis estadístico.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se puede observar que la eficiencia de generación de callos en el cultivar La Candelaria en el medio MS fue mayor a la concentración de 2,5 mg/l, sin embargo las diferencias entre las concentraciones de 2,4D no fueron significativas (Figura 1), por lo que se decidió usar la concentración mínima de 2 mg/l.

Figura 1: Eficiencia de generación de callos a diferentes concentraciones de 2,4D.

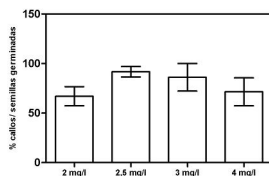
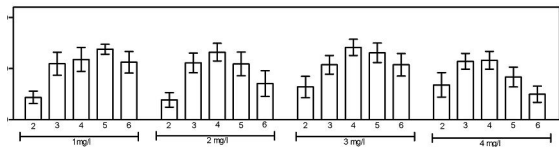


Figura 2: Porcentaje de callos con tejido regenerante a 1, 2, 3 y 4 mg/l de BAP con 0,5 mg/l de ANA en todos los tratamientos, con mediciones a 2, 3, 4, 5 y 6 semanas.



El porcentaje de tejido regenerante (Figura 2) no fue diferente entre las distintas concentraciones de BAP, y solo se observó diferencia significativa (ANOVA $p < 0,05$) entre la semana 2 y el resto, alcanzándose el máximo en la 4 semana. Debido a estos datos se optó por utilizar 2 mg/l de BAP en coincidencia con Gao *et al.* (2011).

También en este experimento se observó un incremento de callos necróticos más allá de la semana 4 y con mayor incidencia a partir de la concentración de BAP de 3 mg/l, lo que refuerza la elección de la concentración de BAP en 2mg/l.

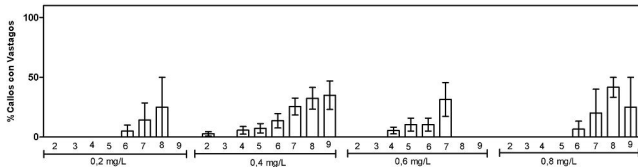
En la Figura 3 se presentan los resultados del experimento de modificación de las concentraciones de ANA, con el contenido de BAP de 2mg/l optimizado en el experimento precedente.

Se observa una mejor emisión de vástagos a la concentración de 0,4mg/l ANA y una disminución en las demás concentraciones ensayadas. Estos datos nos permiten sugerir

que para el cultivar la Candelaria F.A. las concentraciones de reguladores de crecimiento óptimas con 2 mg/l BAP y 0,4 mg/ ANA.

Las plantas R0 obtenidas fueron crecidas en cámara de cultivo de plantas hasta la obtención de semillas. Se selecciono un regenerante en especial ya que evidenciaba cambios morfológicos sustanciales con respecto a su tipo original para realizar experimentos de caracterización con su progenie.

Figura 3: Porcentaje de callos con vástagos en medio MS con concentraciones de 0,2; 0,4; 0,6 y 0,8 mg/l de ANA y 2 mg/l de BAP a 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 semanas



Las semillas fueron sembradas en estufa y transplantadas a macetas con tierra en un invernadero donde fueron cultivadas hasta la cosecha.

Se evaluaron el número de macollos a 30 y 60 días (Figura 4), en donde se observan diferencias significativas en ambos tiempos para los somaclones. En la tabla 1 se muestran los resultados de clorofila SPAD a 60 días y altura de planta, número de panojas, largo de panojas, peso de grano por planta, peso de mil granos, % de granos vanos y número de espiguillas por panoja en plantas a fin del ciclo.

Figura 4: Número de macollos de parental (P) y Somaclones (S) a 30 (A) y 60 (B) días de edad. Se realizó un t-test, 1 y 2 asteriscos significan diferencia significativa a un $p < 0,05$ y $p < 0,005$ respectivamente, $n = 10$.

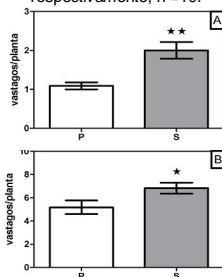


Tabla 1: Niveles de clorofila SPAD a 60 días y parámetros morfológicos en parentales y somaclones a fin de ciclo. Se realizó un t-test para cada parámetro, 1 y 2 asteriscos indican diferencias significativas a $p < 0,05$ y $p < 0,005$ respectivamente $n = 10$

Parámetro	Parental	Somaclon
clorofila SPAD 60 días	23,75 ± 3,969	25,93 ± 2,844
altura de planta	119,3 ± 6,423	119,3 ± 4,619
número de panojas	4,500 ± 1,414	5,833 ± 1,193 *
largo de panoja	21,56 ± 1,944	21,33 ± 1,435
peso de grano	14,59 ± 7,209	16,49 ± 4,134
peso de mil granos	25,62 ± 2,796 **	22,69 ± 0,7709
% vanos	16,56 ± 10,96	23,17 ± 6,043
número de espiguillas/panoja	144,3 ± 26,28	163,5 ± 22,46

Si bien se observan diferencias entre el parental y los somaclones, estas son solo significativas en el caso del número de panojas y el peso de mil granos.

En la figura 5 se observa un análisis OJIP realizado en estado de plántula.

En el mismo se observa notoriamente un mayor valor de Plabs en los somaclones con respecto al parental

Estos datos permiten sustentar desde un punto de vista funcional el mayor número de macollos en la etapa vegetativa que concluyo en un mayor número de panojas.

También se utilizaron marcadores moleculares SNP para la caracterización de las líneas somaclonales obtenidas, confirmándose que el carácter aromático desde el punto de vista molecular permaneció invariable en los somaclones (Foto 1).

Figura 5: Parámetros OJIP en plántulas de 3 hojas, relativos al parental (=1), línea gruesa somaclon N=10

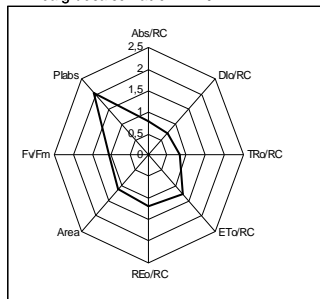
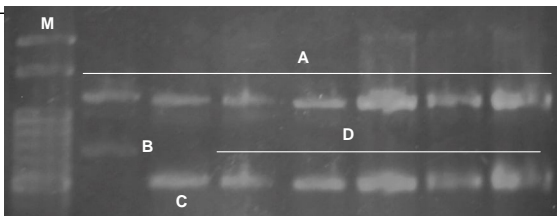


Foto 1: gel de agarosa mostrando las ampliificaciones de los marcadores SNP. M: marcador de peso molecular, A: control positivo, B: No aromático (cv.Lemont), C: parental, D: somaclones



CONCLUSIONES

Se pudo poner a punto un protocolo para la generación de somaclones en el cultivar La Candelaria F.A. La variación somaclonal inducida fue corroborada por parámetros morfológicos y funcionales del Fotosistema II y el carácter aromático de los somaclones fue corroborado por el uso de marcadores moleculares. Por lo expuesto se concluye que este método es adecuado para generar variación en el cultivar aromático La Candelaria F.A.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- BRADBURY LMT et al. A perfect marker for fragrance genotyping in rice. *Molecular Breeding* 16:279-283, 2005.
- CHAUDHRY RC. Especiality rices of the world: Effect of WTO and IPR on its production trend and marketing. *Food, Agriculture & Environment* 1:34-41, 2003.
- GIAROCO et al. Assessment of the genetic diversity in Argentine rice cultivars with SSR markers. *Crop Science* 47:853-860, 2007.
- MURASHIGE and SKOOG F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497, 1962.
- CHEN S, et al. Badh2, Encoding Betaine Aldehyde Dehydrogenase, Inhibits the Biosynthesis of 2-Acetyl-1-Pyrroline, a Major Component in Rice Fragrance. *The Plant Cell* 20; 1850-1861, 2008.
- SRIBET A, and GOVINDJEE. On the relation between the kautsky effect (Chlorophyll a fluorescence induction and Photosystem II: basic and applications of the OJIP fluorescent transient. *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology.* 104, 236-257, 2011.
- MURRAY M and THOMPSON W. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research* 19; 4321-4325, 1980.
- YOSHIDA S, et al. *Laboratory Manual for Physiological studies of rice.* IRRI third edition, Los baños, Filipinas, 1976.