

Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IACuba-28) resistentes a higromicina

Morphological evaluation of shoots regenerated from hygromycin-resistant rice callus (cv IACuba-28).

Maylin Pérez Bernal^{*}, Magalis Delgado Rigo^{**},
Carlos Alberto Hernández Díaz^{***}, Raúl Armas Ramos^{****}

Resumen

Se estableció un sistema de evaluación de brotes de arroz regenerados de callos resistentes a higromicina, que permitió relacionar las características morfológicas de dichos brotes con su resistencia al antibiótico. Callos embriogénicos de arroz se transformaron con *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105/ pCAMBIA1300), con el gen de la higromicina-fosfotransferasa como marcador de selección. Después de dos semanas en medio de cultivo con higromicina, los callos resistentes fueron transferidos a regeneración. Durante 30 días se realizaron extracciones sucesivas de brotes emitidos de los callos, en seis intervalos de cinco días cada uno. Estos brotes se clasificaron según su morfología en: clase I – brote vigoroso con una estructura bipolar típica, de ápice y raíz con longitudes proporcionales; clase II – brote con raíz pequeña respecto al ápice, o sin raíz; clase III – brote con alteraciones fenotípicas, albinismo, hojas muy anchas o enrolladas. Los brotes clasificados se transfirieron a medio MS con higromicina para evaluar su viabilidad. Los de clase I, que predominaron en las primeras extracciones, presentaron la mayor viabilidad durante el enraizamiento y crecimiento del follaje. En las últimas dos extracciones ocurrió una drástica reducción de los brotes clase I, y aumentaron los de clases II y III, simultáneamente disminuyó la viabilidad de estos últimos en MS con higromicina. Este resultado puede aplicarse para mejorar la eficiencia de obtención de plantas transgénicas de arroz en estas condiciones, debido a que precisa el momento óptimo para lograr brotes con características morfológicas normales y que sean resistentes a higromicina.

Palabras clave: callo, clases de brotes, regeneración.

Abstract

An evaluation system based on the morphological characteristics of regenerated hygromycin-resistant rice callus shoots was established for correlating such characteristics with shoot viability on hygromycin. Embryogenic rice calli were transformed by *Agrobacterium tumefaciens* (EHA105/ pCAMBIA1300), containing the hygromycin-phosphotransferase gene as selection marker. After two weeks on selection medium, hygromycin-resistant calli were transferred to regeneration medium. Regenerated shoots were extracted every 5 days (over a 30-day period) and classified into three classes according to their mor-

* Licenciada en Ciencias Farmacéuticas, Investigador Agregado. maylin.perez@cigb.edu.cu
(autor a quien debe dirigirse la correspondencia) Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología Sancti Spiritus. Apartado 83, Código Postal 60200, Sancti Spiritus, Cuba.

** Técnica en Química. magalis.delgado@cigb.edu.cu

*** Licenciado en Bioquímica, Investigador Auxiliar. carlos.hernandez@cigb.edu.cu

**** Ingeniero Físico Nuclear, Investigador Agregado. raul.armas@cigb.edu.cu

phological structure: class I: vigorous shoot having typical bipolar structure; class II: shoot having small root compared to apical length, or shoot without roots; class III: shoots having an abnormal appearance, such as malformed leaves or albinism. Individualised shoots were transferred to MS medium containing hygromycin for evaluating their resistance to antibiotics. A relationship was observed between regenerated shoots' morphological characteristics and the percentage of shoots' viability on hygromycin. Class I prevailed at early shoot extraction and was the most resistant to hygromycin. Drastic class I reduction was found with later shoot extraction, whilst classes II and III became increased. Likewise, shoot viability became radically reduced on MS medium containing hygromycin. This result might be applied for improving efficiency regarding obtaining transgenic rice plants, taking into account the best time for obtaining high percentages of hygromycin-resistant shoots having the best morphological characteristics.

Key words: Callus, regeneration, shoots classes.

Recibido: marzo 6 de 2007 Aceptado: junio 20 de 2007

Introducción

Las técnicas de ingeniería genética se han utilizado para incorporar nuevas características agronómicas en las especies vegetales de mayor demanda mundial, a fin de contrarrestar los efectos negativos causados por diferentes factores bióticos y abióticos del medio, que provocan la disminución de los rendimientos productivos.

El cultivo de tejidos es un punto de partida esencial para implementar estas tecnologías. Un paso imprescindible en la obtención de plantas transgénicas consiste en ajustar adecuadamente las condiciones del cultivo *in vitro* (Ganeshan et ál., 2003), de acuerdo con las características de cada especie y variedad. En Cuba las variedades comerciales de arroz son de tipo Indica, conocidas por ser más recalcitrantes al cultivo de tejidos (Saharan et ál., 2004) y responder pobremente a la transformación genética.

Independientemente de que se han empleado muchos tipos de explantes para la transformación, en el caso del arroz la mayoría de los trabajos se ha dirigido a establecer un sistema de regeneración vía inducción de callos, que es un procedimiento que comprende varias etapas de cultivo, y requiere un largo periodo de tiempo para lograr plantas adultas.

Dada su estructura, en todas las regiones del callo no se recibe el agente de selección presente en el medio en igual magnitud, es por ello que, aunque durante la regeneración se mantenga una drástica presión de selección, pueden obtenerse

brotos no resistentes al antibiótico; por tanto, éste es un paso crítico dentro del proceso de transformación (Kumria et ál., 2001). Sería conveniente lograr brotes transformados a partir de las capas más externas del callo, especialmente de las que crecen en contacto directo con el medio, que es donde principalmente ocurre la regeneración; de la embriogénesis somática que tiene lugar aquí regeneran brotes bipolares característicos de la germinación de un solo embrión (Alfonso-Rubí et ál., 1999). También es posible que los embriones somáticos no siempre tengan un origen unicelular, en cuyo caso el brote germinado puede ser quimérico para el transgén (Parrot et ál., 1991). Por estas razones se requiere establecer una eficiente regeneración de brotes a partir de los callos transformados, unida a un riguroso seguimiento a las plántulas en presencia del agente de selección.

En este trabajo se realiza una clasificación morfológica de brotes regenerados a partir de callos de arroz tipo Indica, de la variedad IACuba-28, resistentes a higromicina, que fueron transformados vía *Agrobacterium tumefaciens*, para evaluar la relación existente entre esta clasificación y la viabilidad de los brotes al ser transferidos al medio de crecimiento con el antibiótico de selección.

Materiales y Métodos

Transformación y selección de callos

Se utilizaron callos embriogénicos de arroz de la variedad IACuba-28, transformados mediante

Agrobacterium tumefaciens según el protocolo reportado por Hiei et ál. (1994), empleando la cepa EHA105 y el vector pCAMBIA1300 que contiene el gen de la higromicina fosfotransferasa como marcador de selección.

Estos callos fueron incubados en la oscuridad a 28 °C durante dos semanas en medio N6 (Chu et ál., 1975) con 2 mg.l⁻¹ de 2,4-D, 1 g.l⁻¹ de hidrolizado de caseína, 30 g.l⁻¹ de sacarosa, 50 mg.l⁻¹ de higromicina, 250 mg.l⁻¹ de cefotaxima, y solidificado con 3 g.l⁻¹ de fitagel. Al cabo de ese tiempo se seleccionaron los callos resistentes a higromicina atendiendo a sus características favorables de crecimiento, para ser transferidos a medio de regeneración.

A la par se realizó un cultivo de callos sin transformar que se dividió en dos partes para ser colocadas en el medio N6 con y sin la higromicina. Éstos se utilizaron como control no transformado (NT) de los experimentos.

Procedimiento para la regeneración y selección de brotes

Los callos seleccionados como resistentes a higromicina se incubaron a 27±1 °C bajo una combinación de luz natural y artificial, en placas Petri con el medio de regeneración recomendado por Pérez et ál. (2002). Los callos provenientes del control NT sin higromicina se colocaron en el medio de regeneración con y sin el antibiótico. En total se dispusieron 20 placas con 10 callos cada una.

Los experimentos se chequearon diariamente para precisar el tiempo de inicio de la regeneración. Los brotes regenerados se separaron con cuidado de los callos y se sembraron en frascos de vidrio con medio MS (Murashige y Skoog, 1962), conteniendo 30g.l⁻¹ de sacarosa, 50mg.l⁻¹ de higromicina, y solidificado con 3 g.l⁻¹ de fitagel. Los brotes regenerados del control NT se situaron también en MS con higromicina para comprobar el efecto letal de ésta.

La extracción de brotes de los callos se inició a partir de los 15 días de haber sido colocados en medio de regeneración, y transcurrió durante otros 30 días, en seis intervalos de cinco días entre cada extracción. Los brotes que paulatinamente se individualizaron fueron clasificados antes de cultivarlos en MS con higromicina. Esta clasificación se

realizó de acuerdo con su morfología externa en el siguiente orden:

Clase I: brote vigoroso con una estructura bipolar típica, de ápice y raíz con longitudes proporcionales.

Clase II: brote con raíz pequeña respecto al ápice, o sin raíz.

Clase III: brote con alteraciones fenotípicas visibles, como albinismo, hojas muy anchas o enrolladas.

Los resultados experimentales se evaluaron determinando el número de brotes extraídos por intervalo de acuerdo con la clasificación, y el porcentaje de mortalidad de éstos en MS con higromicina. Para el procesamiento estadístico se realizó un análisis de varianza completamente aleatorizado, efectuando una comparación múltiple de medias con el test de Student-Newman-Keuls y LSD, haciendo uso del programa Costat versión 6.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Transcurridas las dos semanas de cultivo, los callos del control NT sin higromicina crecieron favorablemente, mientras que los que se colocaron en el medio de selección con 50 mg.l⁻¹ de higromicina sufrieron necrosis total. En cambio, el 34,76% de los transformados presentaron regiones embriogénicas proliferativas formadas por células resistentes que constituyeron sectores de normal crecimiento capaces de desarrollarse en presencia del agente de selección. Fueron éstos los callos elegidos para iniciar la regeneración de los brotes en presencia de higromicina.

En el tejido de los callos, formado por células pequeñas, asimétricas y ricas en citoplasma, ocurre una embriogénesis recurrente mientras se mantengan altos los niveles de auxina exógena, como es el caso del medio de selección. Cuando estos callos se transfieren a un medio de regeneración donde el balance fitohormonal favorece las citokinas, los embriones, tras una fase de maduración y germinación, dan lugar a plantas completas (Bec et ál., 1998). En el grupo de callos del control NT esto ocurrió de forma eficiente, el 100% de ellos fueron capaces de emitir plántulas que se desarrollaron rápidamente luego de 10 días de permane-

cer en medio de regeneración sin antibiótico. Esto confirma la efectividad de los medios empleados para el cultivo y la regeneración de los callos. Los callos del control NT cultivados con higromicina mostraron necrosis tisular sin emisión de brotes, como era de esperar.

En los callos resistentes a higromicina se realizó la primera extracción de brotes a los 15 días de cultivo en medio de regeneración, con un total de 47 brotes, de ellos 38 de clase I y 9 de clase II. La figura 1 muestra que en los primeros tres intervalos de extracción se logra un aumento del número de brotes clase I; los de clase II tienen un comportamiento casi constante hasta la cuarta extracción, a partir de la cual se incrementan, mientras disminuyen los de clase I. El número de brotes individualizados como clase III fue mucho menor en relación con el resto, y se observó la mayor cantidad en las últimas etapas regenerativas.

Alfonso-Rubí et ál. (1999) realizaron estudios histológicos en las distintas fases de la formación de callos y posterior regeneración de plantas de arroz; ellos afirman que el proceso de división y diferenciación ocurre mediante embriogénesis somática a partir de las capas periféricas del callo, donde existen células meristemáticas con una di-

visión muy activa. De la embriogénesis somática que tiene lugar aquí regeneran brotes bipolares vigorosos característicos de la germinación de un solo embrión, que en nuestro estudio coinciden con los incluidos en la clase I.

El desarrollo de los brotes en MS con higromicina se evaluó después de cinco días de cultivo en este medio. Las plantas del control NT no crecieron, sus hojas se tornaron parduscas, no se desarrollaron las raíces y, finalmente, el 99% no sobrevivió en higromicina, con lo cual se comprobó el efecto letal de esta concentración en individuos no transformados de esta variedad. Se observaron diferencias significativas ($p \leq 0,05$) en los porcentajes de mortalidad en higromicina de las tres clases de brotes, con un 67,77% en los de clase III como máximo valor.

Se advirtió una relación entre las características morfológicas de los brotes y su viabilidad al transferirse al medio MS con higromicina, ya que los brotes clase I, típicos de las tres primeras extracciones, presentaron el menor porcentaje de mortalidad en MS con el antibiótico (figura 2), con buen crecimiento del follaje y del sistema radicular. Sin embargo, este porcentaje aumentó considerablemente en los brotes clase III, que fueron más

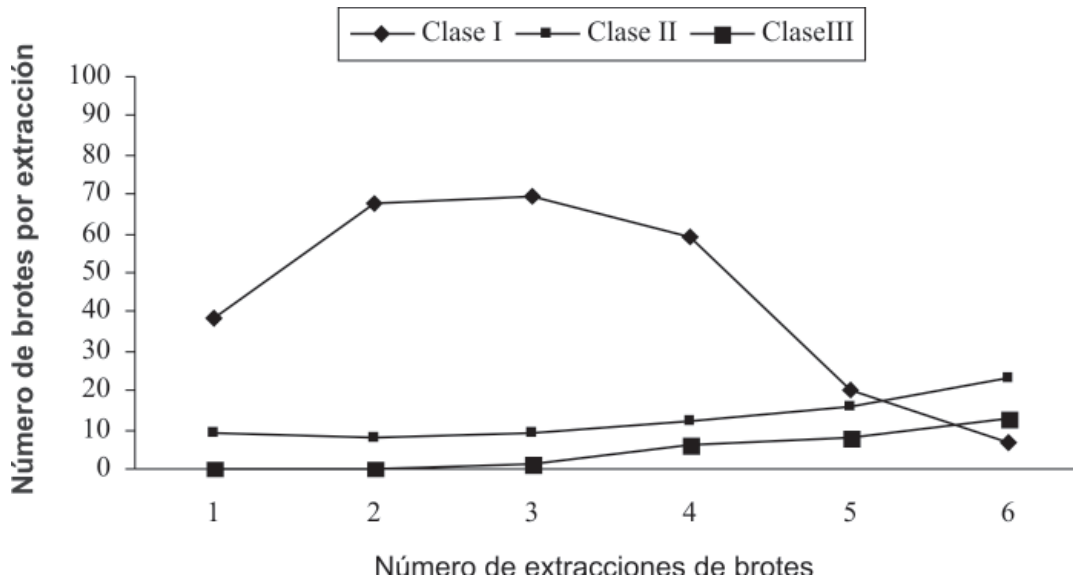


Figura 1. Comportamiento de la extracción de brotes de las clases I, II y III, regenerados a partir de callos de arroz resistentes a higromicina.

Las extracciones de los brotes fueron realizadas cada 5 días a partir de callos cultivados durante 15 días en medio de regeneración. Los datos son derivados de 20 placas Petri con 10 callos cada una.

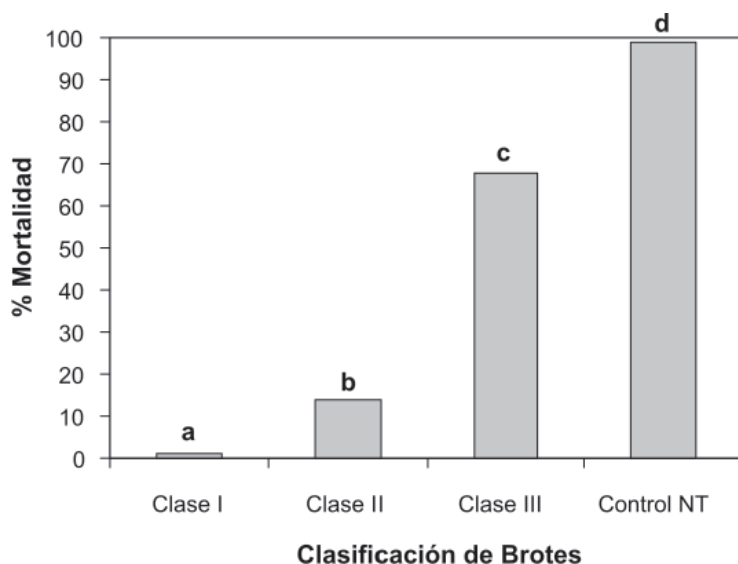


Figura 2. Comparación entre la mortalidad en medio MS con higromicina y las clases de brotes regenerados. *Control NT: brotes no transformados*. Letras diferentes indican que existen diferencias significativas ($p \leq 0,05$).

numerosos en las últimas extracciones, cuando ya los callos habían permanecido mucho tiempo en cultivo.

En los callos con estructuras embriogénicas globulares, densas y fácilmente disgregables estarán las células diana para la transferencia y expresión estable de genes una vez sometidos a la regeneración (Alfonso-Rubí et ál., 1999) Si en esta región es donde se han reportado la mayor cantidad de células resistentes a higromicina, especialmente las de contacto directo con el medio de regeneración, es de esperar que sean los brotes de clase I los que mayormente regeneren y sobrevivan en presencia del antibiótico de selección, al ser los predominantes en los primeros estadios regenerativos, que es donde se histodiferencian activamente estas estructuras celulares embriogénicas.

La transformación genética es un fenómeno unicelular. Una célula transgénica puede dividirse para formar un embrión somático, del que germina una planta transgénica. Sin embargo, los embriones somáticos no siempre tienen un origen unicelular, sino que pueden formarse a partir de un grupo de células que crezcan coordinadamente, donde unas sean transgénicas y otras no (Parrot et ál., 1991; Merkle et ál., 1999). De ahí que los brotes

germinen de un tipo u otro de embrión, y en el segundo caso se emita un brote quimérico que finalmente no sobreviva al cultivarse en el medio MS con higromicina. Ésta puede ser una explicación del porcentaje de brotes que, aún regenerando en higromicina a partir de callos resistentes, no sobreviven al agente de selección en la fase del cultivo en MS.

También debe entenderse que, a pesar de la drástica y continua selección en higromicina, el contacto directo de las células del callo con el medio es desigual: las que ocupan la porción inferior del callo reciben la máxima cantidad posible de los componentes del medio, mientras que las más alejadas no lo reciben en igual magnitud (González y Widholm, 1985). Por esta razón, durante el proceso de regeneración puede favorecerse la formación de brotes no resistentes a partir de las

células del callo que no están en contacto directo con el medio y no reciben la cantidad suficiente de higromicina. Debido a esto consideramos imprescindible el paso final de selección de los brotes en medio MS con el antibiótico de selección para descartar los falsos positivos.

No recomendamos la propagación de los brotes de la clase II sin raíces ni de la clase III, pues sus anomalías morfológicas pueden estar relacionadas con fenómenos de poliembriónia, falta de maduración y dormancia, germinación prematura de los embriones en cultivo, o alteraciones genéticas, eventos que cuentan entre las desventajas de la embriogénesis somática.

El resultado de este trabajo puede aplicarse para mejorar la eficiencia en la obtención de plantas transgénicas de arroz, debido a que precisa el momento óptimo en el que se deben individualizar los callos de los brotes con características morfológicas adecuadas y que sean resistentes a higromicina.

CONCLUSIONES

- Los brotes de características morfológicas normales son los que mayormente regeneran en

las primeras etapas y tienen alta supervivencia en higromicina.

- El tiempo de regeneración prolongado en callos transformados de arroz puede dar lugar a brotes de morfología externa anormal, no recomendables para la continuidad del proceso de transformación.
- Es esencial el paso final de selección de los brotes en medio MS con higromicina, con el fin de descartar los posibles falsos positivos que puedan germinar durante la regeneración.

BIBLIOGRAFÍA

- Alfonso-Rubí, J.; Carbonero, P.; Díaz, I. 1999. Parameters influencing the regeneration capacity of calluses derived from mature Indica y Japonica rice seeds after microprojectile bombardment. *Euphytica*. 107: 115-123.
- Bec, S.; Chen, L.; Ferriere, N. M.; Legavre, T. M.; Fauquet, C.; Guiderdoni, E. 1998. Comparative histology of microprojectile-mediated gene transfer to embryogenic calli in japonica rice (*Oryza sativa L.*): influence of the structural organization of target tissue on genotype transformation ability. *Plant Science*. 138: 177-190.
- Chu, C. C.; Wang, C. C., Sun, C. S.; Hsu, C.; Chu, C. Y.; Bin, F. Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*. 18: 659-668.
- Ganeshan, S.; Baga, M.; Harvey, B. L.; Rossnagel, B. G.; Scoles, G. J.; Chibbar, R. N. 2003. Production of multiple shoots from thidiazuron-treated mature embryos and leaf-base/apical meristems of barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 73(1) 57-64.
- González, R.; Widholm, J. 1985. Selection of plant cells for desirable characteristics: Inhibitor resistance. In: Dixon, R. A. *Plant Cell Culture: A practical approach*. Oxford: IRL Press.
- 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 Journal*. 6(2): 271-282.
- Kumria, R.; Waie, B.; Rajam, M. V. 2001. Plant regeneration from transformed embryogenic callus of an elite indica rice via *Agrobacterium*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*. 67(1) 63-71.
- Merkle, S. A.; Parrott, W. A.; Williams, E. G. 1999. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: Bhojwani, S. S. (editor). *Plant tissue culture: Applications and limitations*. Amsterdam: Elsevier Science Publishers. 67-101.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*. 15: 473-479.
- Parrot, W. A.; Merkle, S. A.; Williams, E. G. 1991. Somatic embryogenesis: potential for use in propagation and gene transfer system. In: Murria, D. R. (editor). *Advanced methods in plant breeding and biotechnology*. Wallingford: CAB International. 158-200.
- Pérez, M.; Coll, Y.; González, A.; Alfonso-Rubí, J.; Armas, R.; Hernández, C. A.; Pujol, M. 2002. Influencia de la fuente de carbono y el agente gelificante sobre la regeneración de arroz Indica variedad IACuba-28. *Biotecnología Vegetal*. 2(3): 163-166.
- Saharan, V.; Yadav, R. C.; Yadav, N. R.; Chapagain, B. P. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa L.*). *African Journal of Biotechnology*. 3(5): 256-259.