

OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE CULTIVO IN VITRO Y TRANSFERENCIA DE ADN PARA LA APLICACIÓN DE EDICIÓN GÉNICA EN VARIEDADES COMERCIALES DE ARROZ DE INTA.

Paula Faccio¹; Lara Taschetta², Ailin Beznec³, José Colazo⁴, Ezequiel Bossio⁵

Palabras-clave: arroz, embriogénesis somática, biolística, transformación genética.

Introducción

El arroz (*Oryza sativa L.*) constituye un alimento básico para más de la mitad de la población mundial, aportando más del 20 % de las calorías diarias. La mejora genética de este cultivo enfrenta el desafío de satisfacer una creciente demanda, manteniendo altos estándares de rendimiento, calidad y resistencia a estreses bióticos y abióticos. Si bien el mejoramiento convencional ha sido exitoso, sus limitaciones en precisión y velocidad impulsan el desarrollo de estrategias biotecnológicas modernas. En este contexto, la edición génica emerge como una herramienta clave, especialmente si se aplican directamente sobre cultivares de alto valor agronómico con eficiencia de regeneración *in vitro* usualmente baja. Este trabajo busca optimizar los protocolos de cultivo *in vitro* y establecer un sistema eficiente de transformación en cultivares élite de arroz con la finalidad de aplicar edición génica.

Materiales y Métodos

Material vegetal y condiciones de cultivo *in vitro*

Se evaluó la respuesta al cultivo *in vitro* de 7 variedades de interés productivo, incluyendo 4 indicas: Guri INTA CL, Angiru INTA CL, Puitá INTA CL, Memby Pora INTA CL y 3 japónicas: Kira INTA, Koshinta y Yerua. Para comenzar el cultivo *in vitro* se desinfectaron semillas maduras de cada variedad con hipoclorito de sodio 2% + Tween 20 y posteriormente se colocaron en medio de inducción de callo durante 15 días a 28°C en oscuridad, luego se pasaron a medio de regeneración con fotoperíodo a 28°C, hasta la obtención de callos embriogénicos y regeneración de plántulas. La formulación de los medios de cultivo fue adaptada de Sahoo RK, Tuteja N 2012.

Se evaluó la capacidad embriogénica (%CE) como: (número de callos embriogénicos / total de callos) *100, la capacidad de regeneración de los callos embriogénicos (% CR) como (número de callos regenerantes/ total de callos embriogénicos) *100 y la cantidad de plantas por callo obtenidas. Adicionalmente, para las variedades Guri y Kira se evaluaron los mismos parámetros de regeneración, pero partiendo de embriones inmaduros. El protocolo de desinfección superficial de las cariopsis inmaduras fue el mismo descrito para semilla madura.

Transformación genética

Se utilizó la variedad Guri INTA CL para el ensayo de transformación mediante biolística. Se utilizó el gen reportero gus bajo el promotor de Ubiquitina para evaluar la eficiencia de transferencia con 2 presiones de disparo (650 y 900 psi). Se bombardearon 180 callos derivados de embriones inmaduros a una presión de 900 psi con un vector contenido el gen de selección hph bajo el promotor Actina I. Se regeneraron 58 plantas en medio con selección (higromicina 50 mg/l), las cuales fueron rustificadas en cámara de cría y evaluadas por PCR.

1 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA, (1686) Hurlingham, Provincia de Buenos Aires, Argentina. faccio.paula@inta.gob.ar

2 Estudiante de grado, Universidad Nacional de Moreno. lara.taschetta@gmail.com

3 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. beznec.ailin@inta.gob.ar

4 MSc. EEA Concepción del Uruguay, GTMGA, INTA. colazo.jose@inta.gob.ar

5 Dr., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bossio.ezequiel@inta.gob.ar

Resultados y Discusión

Regeneración *in vitro*

El %CE, el %CR y el número de plantas viables obtenidas por número de callos embriogénicos se muestran en los gráficos 1, 2 y 3, respectivamente. Las variedades Índicas (Puitá, Memby, Angiru y Guri) mostraron una mayor capacidad embriogénica (gráfico 1) con valores entre 40 y 84% respecto a las japónicas (Kira, Koshinta y Yerua) con valores entre 10 y 40% para las mismas condiciones de cultivo, revelando diferencias significativas ($p = 0.0035$). Dentro de las Índicas Guri presentó un mayor %CE. En el gráfico 2 se observa que el %CR no presentó diferencias significativas entre ambos grupos ($p = 1.0$).

Gráfico 1: capacidad embriogénica de las distintas variedades estudiadas. Puitá INTA CL (P), Memby Pora INTA CL (M), Angiru INTA CL (A), Guri INTA CL (G), Kira INTA (K), Koshinta (Ksh) y Yerua (Y).

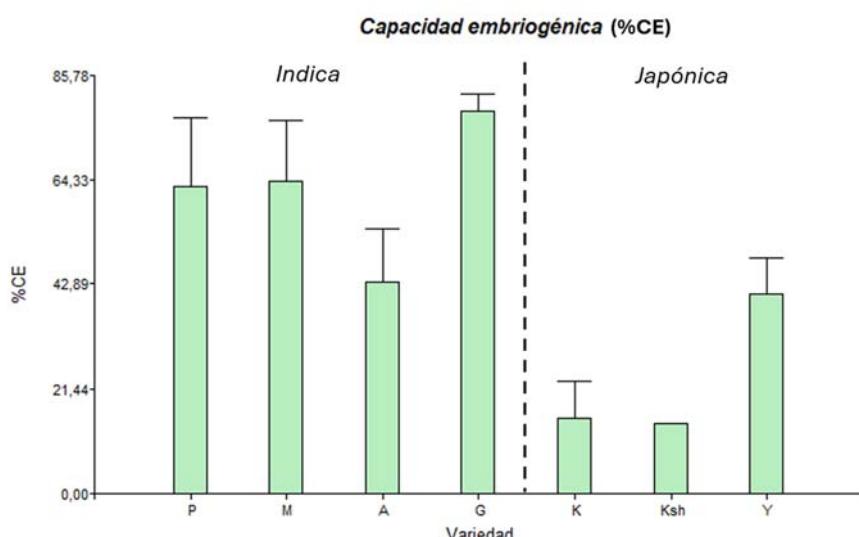
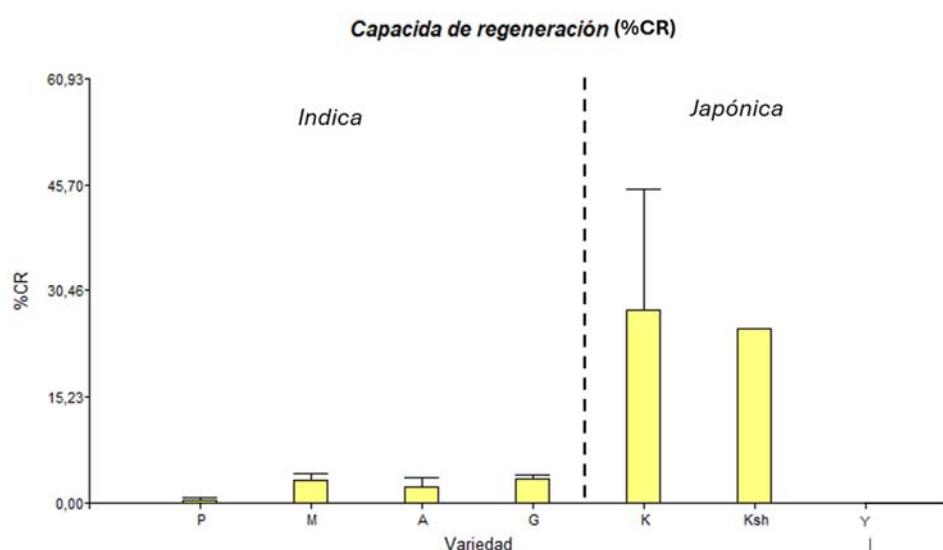


Gráfico 2: capacidad de regeneración de las distintas variedades estudiadas. Puitá INTA CL (P), Memby Pora INTA CL (M), Angiru INTA CL (A), Guri INTA CL (G), Kira INTA (K), Koshinta (Ksh) y Yerua (Y).



1 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA, (1686) Hurlingham, Provincia de Buenos Aires, Argentina. faccio.paula@inta.gob.ar

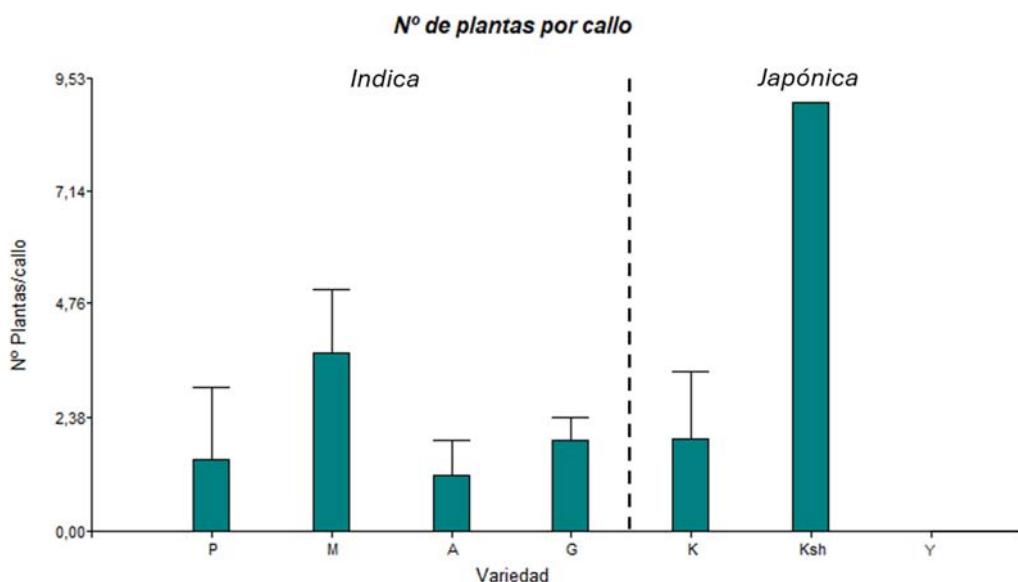
2 Estudiante de grado, Universidad Nacional de Moreno. lara.taschetta@gmail.com

3 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bez nec.allin@inta.gob.ar

4 MSc. EEA Concepción del Uruguay, GTMGA, INTA. colazo.jose@inta.gob.ar

5 Dr., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bossio.ezequiel@inta.gob.ar

Gráfico 3: número de plantas viables obtenidas por número de callos embrionarios de las distintas variedades estudiadas. Puitá INTA CL (P), Memby Pora INTA CL (M), Angiru INTA CL (A), Guri INTA CL (G), Kira INTA (K), Koshinta (Ksh) y Yerua (Y).



Se rustificaron plantas que completaron su ciclo en cámara de cría y produjeron semillas fértiles en todas las variedades, excepto Yerua que, a pesar de desarrollar callos con características embrionarias no produjeron plántulas, bajo las condiciones ensayadas (gráfico 3).

Se observa una mayor producción de plantas en los callos inducidos a partir de embriones inmaduros respecto a los callos provenientes de semilla madura, tanto para la variedad Guri como para Kira (tabla 1).

Tabla 1: comparación de eficiencia de producción de plantas respecto al origen del callo. G (SM): variedad Guri proveniente de semilla madura; G (EI): variedad Guri proveniente de embrión inmaduro. K (SM): variedad Kira proveniente de semilla madura; K (EI): variedad Kira proveniente de embrión inmaduro.

	%CE	%CR	plantas/callo
G (SM)	77,5	8,8	2,03
G (EI)	72	40,75	3
K (SM)	15,4	27,5	1,9
K (EI)	75	16,7	4,5

Transformación genética

La mejor condición de transformación se logró a 900 psi con callos provenientes de embriones inmaduros (Figura 1). Las plantas regeneradas en medio selectivo mostraron integración del gen hph verificado por PCR. Esto confirma la viabilidad del sistema para la generación de líneas transgénicas.

1 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA, (1686) Hurlingham, Provincia de Buenos Aires, Argentina. faccio.paula@inta.gob.ar

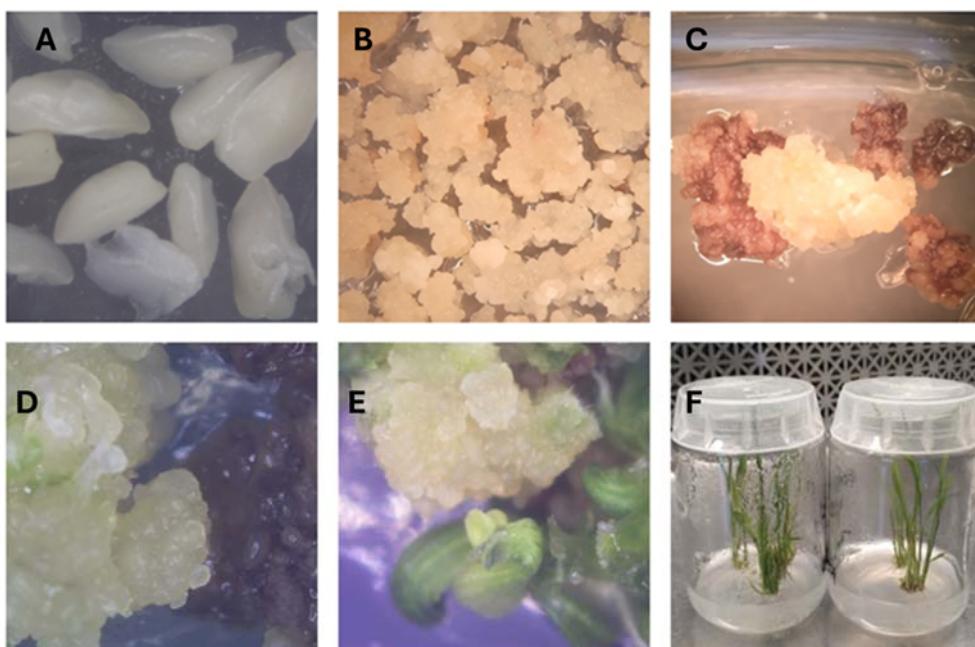
2 Estudiante de grado, Universidad Nacional de Moreno. lara.taschetta@gmail.com

3 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bez nec.allin@inta.gob.ar

4 MSc. EEA Concepción del Uruguay, GTMGA, INTA. colazo.jose@inta.gob.ar

5 Dr., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bossio.ezequiel@inta.gob.ar

Figura 1: Morfología de callos embrionarios y plantas regeneradas en medio selectivo. A: Embriones inmaduros en medio de inducción. B: callos para transformar. C: callos creciendo en medio selectivo con higromicina 50 mg/l. D y E: callos regenerando en medio selectivo. F: plántulas enraizando.



Conclusiones

Se optimizaron las condiciones de cultivo *in vitro* para siete cultivares comerciales de arroz, logrando regeneración eficiente en cinco de ellos. Además, se estableció un protocolo exitoso de transformación genética estable mediante biobalística en la variedad Guri INTA CL. Los resultados validan el protocolo ajustado y posicionan a las variedades INTA como materiales aptos para la edición génica. No obstante, ello, es necesario aumentar el número de ensayos para robustecer estas conclusiones. Este trabajo sienta las bases para la aplicación de esta herramienta biotecnológica en genotípos de alto valor agronómico y poder acelerar así el desarrollo de nuevas variedades adaptadas a los desafíos productivos actuales.

Agradecimientos

Agradecemos a Sara Ameijeiras por su soporte en el cultivo *in vitro* y a Guillermo Piparola por el manejo de las plantas en el invernáculo de bioseguridad y cámaras de cría.

Referencias

Sahoo RK, Tuteja N. Development of Agrobacterium-mediated transformation technology for mature seed-derived callus tissues of indica rice cultivar IR64. GM Crops Food. 2012 Apr-Jun;3(2):123-8. doi: 10.4161/gmcr.20032. Epub 2012 Apr 1. PMID: 22538224.

1 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA, (1686) Hurlingham, Provincia de Buenos Aires, Argentina. faccio.paula@inta.gob.ar

2 Estudiante de grado, Universidad Nacional de Moreno. lara.taschetta@gmail.com

3 Dra., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bez nec.allin@inta.gob.ar

4 MSc. EEA Concepción del Uruguay, GTMGA, INTA. colazo.jose@inta.gob.ar

5 Dr., Instituto de Genética, GMBdC, INTA. bossio.ezequiel@inta.gob.ar