



Aspectos clave para la transformación genética de arroz (*Oryza sativa* L.) subespecie *indica* mediante *Agrobacterium tumefaciens*¹

Key aspects for the genetic transformation of rice (*Oryza sativa* L.) subspecies *indica* by *Agrobacterium tumefaciens*

Cindy Aguilar-Bartels², Priscilla Quirós-Segura², Alfonso García-Piñeres^{2,3}, Andrés Gatica-Arias^{2,4},
Griselda Arrieta-Espinoza²

- ¹ Recepción: 10 de diciembre, 2020. Aceptación: 12 de abril, 2021. Este trabajo fue parte de una tesis de Licenciatura en Agronomía de la primera autora y de proyectos de Investigación de la Universidad de Costa Rica y el MICIT.
- ² Universidad de Costa Rica, Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), 11501-2060, San José, Costa Rica. cindy.aguilar@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-5988-0546>), priscilla.quirossegura@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-0046-7060>), griselda.arrieta@ucr.ac.cr (autora para correspondencia; <https://orcid.org/0000-0001-9235-5834>).
- ³ Universidad de Costa Rica, Escuela de Química, 11501-2060, San José, Costa Rica. alfonso.garciapineres@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-3000-4630>).
- ⁴ Universidad de Costa Rica, Escuela de Biología, 11501-2060, San José, Costa Rica. andres.gatica@ucr.ac.cr (<https://orcid.org/0000-0002-3841-0238>).

Resumen

Introducción. La transformación del arroz (*Oryza sativa* L. ssp *indica*) mediada por *Agrobacterium*, representa una oportunidad para la investigación científica y el mejoramiento genético. Es necesaria la optimización del protocolo para obtener la mayor eficiencia de transformación. **Objetivo.** Evaluar diferentes factores que afectan la transformación genética en callos embriogénicos de arroz de la subespecie *indica* vía *Agrobacterium tumefaciens*. **Materiales y métodos.** Este estudio se realizó en San José, Costa Rica, entre 2012 y 2014. En seis tratamientos se evaluaron: el efecto de la edad del callo, la concentración de acetosiringona, condición luminosa, la presencia o ausencia de radícula y la cepa de *Agrobacterium tumefaciens* en la transformación genética de callos embriogénicos de arroz de la variedad CR5272 con el gen reportero *gus*. Se compararon la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 con el plásmido pCAMBIA1305.2 y las cepas ATHV, GV3101 y LBA4404, con el plásmido pCAMBIA1303; mediante pruebas histoquímicas para la detección de la expresión transitoria del gen marcador que codifica para la β -glucuronidasa. **Resultados.** La evaluación de los seis tratamientos con la cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2 resultó en expresión transitoria del gen *GusPlus* de 1,33-7,00 % para la variedad CR5272 y de 8,00 % para el control con la variedad Nipponbare (ssp. *japonica*). Las cepas con el plásmido pCAMBIA1303 presentaron una expresión transitoria del gen *gusA* entre el 100-65 % con un área promedio de 14,23 mm² (ATHV), 8,81 mm² (GV3101), y 8,83 mm² (LBA4404), sin diferencias significativas entre ellas; sin embargo, sí hubo diferencias al compararlas con la cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2 (85 %, 4,39 mm²). **Conclusiones.** La utilización de las condiciones: callos de seis días, concentración de acetosiringona de 76 μ M, luz antes y después del cocultivo, presencia de radícula y la cepa ATHV::pCAMBIA 1303, mejoraron la eficiencia de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* en la variedad de arroz CR5272.

Palabras clave: β -glucuronidasa, *gus*, modificación genética, callos embriogénicos.



Abstract

Introduction. *Agrobacterium*-mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L. ssp *indica*) represents an opportunity for scientific research and genetic improvement. Optimization of the protocol is necessary to obtain the highest transformation efficiency. **Objective.** To evaluate different factors that affect the genetic transformation in embryogenic rice callus of subspecies *indica* through *Agrobacterium tumefaciens*. **Materials and methods.** This study was performed in San José, Costa Rica between 2012 and 2014. The following were evaluated in six treatments: the effect of callus age, acetosyringone concentration, lighting condition, the presence or absence of radicle, and *Agrobacterium tumefaciens* strain on the genetic transformation of embryogenic calli of rice variety CR5272 with gus reporter gene. *Agrobacterium* strains LBA4404 with pCAMBIA1305.2 plasmid, and strains ATHV, GV3101, and LBA4404 with the pCAMBIA 1303 plasmid were compared; by histochemical tests for the detection of transient expression of the β -glucuronidase reporter gene. **Results.** The evaluation of the six treatments with strain LBA4404::pCAMBIA 1305.2 resulted in transient expression of 1.33-7.00 % of the *GusPlus* gene for the CR5272 variety, and 8.00 % for the control with the Nipponbare (ssp. *japonica*) variety. The strains with the pCAMBIA1303 plasmid showed a transient expression of the *gusA* gene between 100-65 % with an average area of 14.23 mm² (ATHV), 8.81 mm² (GV3101), and 8.83 mm² (LBA4404) with no significant differences between them; however, there were differences when compared with strain LBA4404::pCAMBIA1305.2 (85 %, 4.39 mm²). **Conclusions.** The use of the conditions: six-day callus, acetosyringone concentration of 76 μ M, light before and after cocultivation, presence of radicle and the ATHV::pCAMBIA 1303 , improved the transformation efficiency with *Agrobacterium tumefaciens* in the rice variety CR5272.

Keywords: β -glucuronidase, gus, genetic modification, embryogenic callus.

Introducción

La alimentación mundial se ha basado en un alto consumo de cereales como parte de la nutrición básica. Uno de los más importantes es el arroz, el cual representa 20 % del consumo de la energía dietética de la mitad de la población global (Food and Agriculture Organization, 2004; Fukagawa & Ziska, 2019). En Costa Rica, el arroz forma parte importante de la dieta de la población, con un consumo anual per cápita de 46,96 kg (Corporación Arrocería Nacional, 2019).

Estudios realizados por la Organización de las Naciones Unidas (United Nations, 2019), estiman que para 2050, la población mundial estaría cercana a los 9,7 billones, lo que representa un aumento de 30 % en comparación con las cifras del año 2015. Por lo anterior, y debido a la importancia alimenticia y económica del arroz, existe una necesidad de aumentar el rendimiento de este cultivo, en donde la ingeniería genética representa una de las soluciones para la producción de nuevas variedades con características agronómicas deseables (Datta & Datta, 2006).

La modificación mediada por *Agrobacterium* sp. ha sido, dentro de la ingeniería genética, una de las técnicas preferidas gracias a su eficiencia, ya que produce un bajo número de copias de los transgenes insertados en el genoma hospedero y la heredabilidad de los transgenes, así como una expresión por lo general estable de los genes y fertilidad en las plantas (Bonilla et al., 2008; Kuta & Tripathi, 2005; Opabode, 2006; Patel et al., 2013; Tie et al., 2012).

Este sistema de transformación genética ha sido utilizado desde hace más de dos décadas en arroz (Hiei et al., 1994), para el mejoramiento de características agronómicas importantes en este cereal, entre ellas la resistencia a los insectos *Chilo suppressalis*, *Scirpophaga incertulas* y *Nilaparvata lugens* y tolerancia a situaciones de estrés tales como sequía y salinidad (Cheng et al., 1998; Ramesh et al., 2004; Tan et al., 2017).

Se realizaron varias investigaciones con el objetivo de aumentar la eficiencia de la transformación en variedades de las subespecies *japonica* (30 % a 100 %) e *indica* (1,5 a 3,5 %) (Tie et al., 2012). La subespecie *indica* presenta

aún cierta resistencia que disminuye la tasa de transformación por *Agrobacterium* sp. (Hiei & Komari, 2006; Shri et al., 2013; Tan et al., 2017; Tie et al., 2012), por lo que es necesaria la optimización. Para esto, se debe tomar en cuenta que en la transformación genética con *Agrobacterium* intervienen múltiples factores, como el genotipo de la planta, el tipo de explante utilizado, la cepa de la bacteria, los genes de selección y las condiciones del cultivo de tejidos como la adición de la acetosiringona, la cual es un componente esencial para lograr una mayor frecuencia de transformación, porque induce los genes vir y se incrementa la actividad de las cepas de *Agrobacterium* (Deeba et al., 2014; Saharan et al., 2004; Shri et al., 2013).

El empleo de genes marcadores tales como GUS (Jefferson et al., 1986), es útil para determinar la eficiencia de transformación de los protocolos experimentales de transformación genética. Se ha demostrado la presencia ubicua de la enzima β -glucuronidasa en varias plantas modelos, dentro de ellas *Oryza sativa*, cuya actividad podría alterar los resultados observados de expresión de gus (Sudan et al., 2006); sin embargo, el uso de metanol reduce la interferencia de la actividad enzimática nativa (Abdollahi et al., 2011; Tripathi et al., 2010), lo que posibilita el uso apropiado de la técnica para la observación de la expresión transitoria del gen marcador (Reddy, 2008).

El objetivo de esta investigación fue evaluar diferentes factores que afectan la transformación genética en callos embriogénicos de arroz de la subespecie *indica* vía *Agrobacterium tumefaciens*.

Materiales y métodos

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM) de la Universidad de Costa Rica, en San José, Costa Rica, entre enero del 2012 y diciembre del 2014.

Inducción de callos a partir de embriones zigóticos maduros de arroz

Se utilizó semilla fundación de la variedad comercial de arroz (*Oryza sativa* L. ssp *indica*) CR5272 (Camacho & Navarro, 2020; León & Arroyo, 2011; Valdés et al., 1992) de la subespecie *indica*, donada por el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica; como control se utilizó semilla de arroz de la variedad Nipponbare subespecie *japonica*, donada por el Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad de Lleida, España. Estas semillas se usaron para la inducción de callos embriogénicos derivados de los embriones zigóticos maduros, que serían el tejido blanco para la transformación con *A. tumefaciens*.

Las semillas se descascararon mediante tratamiento con papel lija 3M N°100 y se desinfectaron dos veces mediante inmersión en una solución de NaOCl 3,5 % i.a, y Tween 20 (Sigma Aldrich Chem. Co., USA) con agitación constante a 110 revoluciones por minuto (RPM) durante 20 min en un agitador orbital horizontal (Hotech Modelo721). Estas fueron enjuagadas cuatro veces con agua destilada estéril en una cámara de flujo laminar de aire estéril. Luego, las semillas de la variedad CR5272 se sembraron en cajas petri con 20 ml del medio de inducción (MSTP), compuesto por sales minerales (MS) (Murashige & Skoog, 1962), adicionado con 50 mg l⁻¹ triptófano, 500 mg l⁻¹ prolina, 30 g l⁻¹ sacarosa y 2,0 mg l⁻¹ 2,4-D. Por su parte, las semillas de Nipponbare se cultivaron en el medio MSP descrito por Bai et al. (2014), compuesto por las sales minerales (MS) (Murashige & Skoog, 1962), suplementado con vitaminas Gamborg's B5 (M404, PhytoTech lab) y 300 mg l⁻¹ caseína hidrolizada, 500 mg l⁻¹ prolina, 2,5 mg l⁻¹ de 2,4-D y 20 g l⁻¹ sacarosa. Se utilizaron reactivos sintetizados por Phytotechnology Lab (USA). El pH de los medios MSTP y MSP se ajustó a 5,8 antes de la adición del agente gelificante (3 g l⁻¹ y 5 g l⁻¹ de phytigel, respectivamente), esterilizándose en autoclave a 121 °C durante 20 min. Los cultivos se incubaron en condiciones de oscuridad continua a una temperatura promedio de 26 °C.

Cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

Se utilizaron las cepas de *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 (Ach5, octopina), ATHV y GV3101 (C58, nopalina), transformadas con los vectores binarios pCAMBIA 1305.2 (https://www.snapgene.com/resources/plasmidfiles/?set=plant_vectors&plasmid=pCAMBIA1305.2) y pCAMBIA 1303 (https://www.snapgene.com/resources/plasmid-files/?set=plant_vectors&plasmid=pCAMBIA1303), con base en el protocolo de Reddy (2008) y Tzfira et al. (1997). Estos plásmidos contienen el promotor del virus del mosaico de la coliflor 35S (CaMV35s), el gen de la higromicina fosfotransferasa II (*hptII*) que confiere resistencia a la higromicina B, el gen *nptII* de resistencia a la kanamicina, el gen marcador *GusPlus* y *gusA*, así como el terminador nos.

Se inocularon 50 μ l de la suspensión de bacterias y distribuyeron con ayuda de una espátula drigalsky estéril sobre el medio de crecimiento semisólido YEM, colocado en placas petri (0,4 g l⁻¹ de extracto de levadura, 10,0 g l⁻¹ de manitol, 0,1 g l⁻¹ de NaCl, 0,2 g l⁻¹ de MgSO₄, 0,5 g l⁻¹ de K₂HPO₄, pH a 7,0 y 15,0 g l⁻¹ de agar suplementado con 50 mg l⁻¹ de kanamicina (BP861, Sigma-Aldrich®). Las placas de petri inoculadas se colocaron a 28 °C por 24 h. Se extrajo el ADN del plásmido de las colonias con el kit para miniprep GeneJet™ (K0503, Thermo Fischer Scientific). Luego, se realizó una reacción de amplificación en cadena (PCR) para el gen *hptII* con el ADN extraído para confirmar la presencia de los plásmidos de la siguiente manera: 2,0 μ l de ADN (10 ng μ l⁻¹), 12,55 μ l de H₂O, 2,0 μ l de Buffer (10X (NH₄)₂SO₄), 1,2 μ l de MgCl₂ (25 mM), 0,4 μ l de dNTPs (10 mM), 0,4 μ l de primer *hptII* FW (5'-ATGAAAAGCCTGAACTCACCGCGA-3') 20 μ M, 0,4 μ l de primer *hptII* RV (5'-TCCATCACAGTTTGCCAGTGATACA-3') 20 μ M, 0,8 μ l de BSA (10 mg ml⁻¹), 0,25 μ l de ADN Taq polimerasa (5 U μ l⁻¹). Las condiciones de reacción fueron las siguientes: 5 min a 94 °C seguido de 35 ciclos (1 min a 94 °C, 1 min 69 °C y 1 min a 72 °C); se finalizó con 10 min a 72 °C. Además, se incluyó agua como control negativo y una muestra de ADN de los plásmidos purificados como control positivo. Se utilizó un gel de agarosa al 1 % (p/v) con buffer TAE 1 % (v/v) a 60 V durante 1 h para la evaluación de los productos de PCR.

Transformación de arroz mediada por *Agrobacterium*

Se multiplicó la cepa de *Agrobacterium* LBA4404 con el plásmido pCAMBIA1305.2 un día antes de utilizarla para la modificación del arroz. Para ello, la bacteria se incubó en 100 ml de medio YEM adicionado con 50 mg l⁻¹ de kanamicina a 28 °C en agitación a 200 rpm (Agitador Hotech Instruments Corp, modelo 902) en oscuridad por un día. La bacteria se dejó crecer hasta que alcanzó una densidad óptica (DO₆₀₀) de 0,5, que se midió con un espectrofotómetro (Thermo Scientific). La suspensión de bacterias se centrifugó a 5000 rpm por 10 min a 4 °C, se descartó el medio y se recuperaron las células en 100 ml de medio AAM (Toriyama & Hinata, 1985), suplementado con acetosiringona (Sigma; D134406, la concentración de este reactivo varió según el tratamiento que se iba a evaluar) y se colocaron en crecimiento a 28 °C con agitación a 200 rpm en oscuridad por 1 h.

Se evaluaron seis tratamientos de transformación de arroz con *Agrobacterium*, los cuales se describen en el Cuadro 1. Los tratamientos fueron los siguientes: T01: 5272-10-[76]-Osc-SR (este tratamiento corresponde al protocolo descrito por Reddy (2008); T02: 5272-6-[76]-Osc-SR; T03: 5272-6-[76]-Luz-CR; T04: 5272-6-[76]-Luz-SR; T05: 5272-6-[150]-Luz-SR; T06: 5272-6-[300]-Luz-SR. Se realizó un experimento control con la variedad de arroz Nipponbare, con las condiciones descritas por Reddy (2008) para evaluar la efectividad del protocolo y funcionalidad de la cepa LBA4404 con el plásmido pCAMBIA1305.2 y un control (no tratamiento de callos) sin transformar. Cada experimento de transformación se realizó por triplicado. Para cada réplica se utilizaron 150 callos de arroz, de los cuales 100 callos se transformaron con la cepa respectiva y el resto se mantuvieron como control sin transformar.

Para realizar la transformación genética, se utilizó el siguiente procedimiento: finalizada la fase de inducción de callo embriogénico, se eliminó la radícula para los tratamientos "SR". Los callos se sumergieron en 45 ml de

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos de transformación de arroz con *Agrobacterium tumefaciens*. Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2012 - 2014.

Table 1. Description of rice transformation treatments with *Agrobacterium tumefaciens*. Laboratory of Applied Biotechnology to Crop Genetic Improvement of the Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2012 - 2014.

Tratamiento	Varietal	Edad de los callos post inducción (días)	Concentración Acetosiringona	Condición lumínica: Luz / Oscuridad (Osc)	Radícula (Con: CR / Sin: SR)	Código
T01	CR5272	10	76 μ M	Osc	SR	T01: 5272-10-[76]-Osc-SR
T02	CR5272	6	76 μ M	Osc	SR	T02: 5272-6-[76]-Osc-SR;
T03	CR5272	6	76 μ M	Luz	CR	T03: 5272-6-[76]-Luz-CR;
T04	CR5272	6	76 μ M	Luz	SR	T04: 5272-6-[76]-Luz-SR
T05	CR5272	6	150 μ M	Luz	SR	T05: 5272-6-[150]-Luz-SR
T06	CR5272	6	300 μ M	Luz	SR	T06: 5272-6-[300]-Luz-SR
Control - no trat.	CR5272	6	ninguna	Osc	CR	Control - no tratamiento
Control Nipp.	Nipponbare	7	76 μ M	Osc	SR	Control - Nipponbare

la suspensión de *A. tumefaciens* en medio AAM, se colocaron en agitación (15 rpm) durante 15 min. Se sacaron los callos de la solución y se eliminó el exceso de bacteria, luego se colocaron sobre papel filtro (Whatman #2) estéril. Se co-cultivaron sobre un nuevo papel filtro (9 cm de diámetro), humedecido con 0,5 ml de medio AAM, suplementado con la concentración indicada de acetosiringona. Estos filtros se colocaron sobre medio MSTP, suplementado con 10 g l⁻¹ de glucosa y acetosiringona de acuerdo con el tratamiento. Transcurridos tres días de cocultivo a 26 °C, se lavaron los callos cinco veces en agua destilada estéril y una vez con agua destilada estéril con un volumen de 500 mg l⁻¹ de carbenicilina (Phytotechnology Laboratories, C346), para eliminar la bacteria. Se secó el exceso de humedad con papel filtro esterilizado.

Para confirmar que el gen gus del plásmido pCAMBIA1305.2 se expresaba de forma correcta, se realizó una transformación con el método de biolística como control. Para esto, se transformaron 20 callos de seis días de edad de la variedad CR5272 en tres repeticiones. Estos se colocaron en medio osmótico MSO durante 4 h antes del bombardeo. El medio está compuesto por las sales minerales Murashige & Skoog (1962) (MS), 30 de g l⁻¹ de maltosa, 2 mg l⁻¹ de 2,4-D, 47 g l⁻¹ de sorbitol, 47 g l⁻¹ de manitol, pH de 5,8 y 3 g l⁻¹ de Phytigel. Se esterilizó en autoclave a 121 °C por 20 min.

Se utilizó el plásmido pCAMBIA1305.2 purificado de la cepa LBA4404 de *Agrobacterium tumefaciens*. Para la transformación de los callos, se tomaron 5 μ g del plásmido y se mezclaron con 50 μ l de una suspensión de oro estéril (1,0 μ m de diámetro, BIORAD) a 60 mg ml⁻¹, 20 μ l de espermidina (PhytoTechnology Laboratories, S837) 0,1 M, 50 μ l de CaCl₂ (Sigma, C-3881) 2,5 M se agitó de forma constante en un vórtex. La mezcla se dejó reposar a 25 °C por 10 min y luego se centrifugó por 10 s a 10000 rpm. Se eliminó el sobrenadante con la pipeta sin tocar el botón. Luego, se agregaron 50 μ l de etanol absoluto y de inmediato se pipetearon 9 μ l de la solución sobre las membranas macroacarreadoras. Se dejaron secar las partículas con la colocación de la membrana en placas Petri con sílica gel durante 10 min. El disparo se realizó con helio a una presión de 1100 psi con el sistema de biolística (BIORAD modelo PDS-1000/He) (García-Arias, 2011). Luego, los callos se cultivaron en el medio osmótico MSO durante 24 h y se transfirieron al medio MSTP, se incubaron en condiciones de oscuridad y 25 °C de temperatura .

Evaluación del protocolo obtenido con otras cepas de *Agrobacterium*

Se realizaron dos experimentos de transformación con las condiciones que brindaron los mejores resultados en el apartado anterior, las cuales fueron: variedad CR5272, callos de seis días de edad, acetosiringona 76 μ M, utilización de luz durante la fase de inducción y posterior al cocultivo, y presencia de radícula durante el proceso de transformación. Se utilizaron las cepas de *Agrobacterium* LBA4404, ATHV, GV3101 transformadas con el plásmido pCAMBIA1303, debido a que esta combinación de cepas plásmido se utiliza en forma rutinaria en otros laboratorios y con otros cultivos, adicionalmente, se utilizó la combinación cepa LBA4404 con el plásmido pCAMBIA 1305.2 como control, con el objetivo de comparar la eficiencia de transformación del mismo protocolo, pero con diferentes cepas de *Agrobacterium* y plásmido distinto. Se transformaron veinte callos embriogénicos por cepa y se sustituyó el medio de cultivo MSTP por MSP.

Evaluación de la expresión del gen gus

Para determinar la expresión de los genes *GusPlus* y *gusA*, se utilizó el kit β -Glucuronidase Reporter Gene Staining (Sigma, GUS) y se les realizó una aplicación de metanol al 20 %; todas las coloraciones azules que se observaron en los callos se consideraron como expresiones transitorias del gen (Abdollahi et al., 2011; Kosugi et al., 1990; Tripathi et al., 2010). Posterior a la tinción, los callos embriogénicos transformados y los controles se almacenaron en tubos de 1,5 ml con alcohol al 75 %.

Este tipo de evaluación es un método simple y sensitivo para detectar la actividad del gen un día después de la transformación y, aunque no es necesario que los transgenes se encuentran integrados de forma estable en el genoma vegetal, es posible inferir la eficiencia de las condiciones experimentales y protocolos de transformación (Bonilla et al., 2008; Cervera, 2005; He et al., 2005; Ramesh & Gupta, 2005).

La prueba se aplicó de la siguiente manera: en los experimentos de transformación con *Agrobacterium* (T0 a T06) y en el control con biolística, se contó el número de callos con puntos de color azul como indicador de la expresión transitoria del gen *GusPlus* y se expresaron los resultados en términos del porcentaje del total de callos que muestran coloración azul. Se analizaron veinte callos del control negativo (control - no tratamiento) y cincuenta callos transformados de cada una de las repeticiones de los experimentos con *Agrobacterium*. En el experimento de biolística se evaluaron diez callos transformados y diez callos del control (no tratamiento en cada una de las repeticiones). En los experimentos con diferentes cepas de *Agrobacterium* (LBA4404, ATHV, GV3101), se evaluó la expresión transitoria de los genes *gusA* y *GusPlus*, se midió el área de color azul presente en los callos transformados con el programa ImageJ (versión 1.50i) (Schneider et al., 2012).

Análisis estadístico de los datos

Los datos obtenidos se analizaron con el paquete estadístico R (R Core Team, 2015). En la primera serie de mediciones se analizó el número de callos que muestran una tinción azul con regresión logística. Los resultados de las pruebas realizadas se ajustaron para comparaciones múltiples con el método de Tukey ($P < 0,05$).

En la segunda etapa, los datos del área de los callos que mostraron tinción positiva para cada una de las cepas estudiadas, se compararon con un análisis de varianza de una vía con la raíz cuadrada de la variable de respuesta, seguido de la prueba de Tukey ($P < 0,05$) para comparar todos los posibles pares de tratamiento.

Resultados

Evaluación de la transformación de arroz con la cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2

Para determinar las mejores condiciones de transformación genética del arroz con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404::pCAMBIA1305.2, se evaluaron las siguientes variables: variedad de arroz, edad de los callos, concentración de acetosiringona, condición lumínica y presencia o ausencia de radícula (T01: 5272-10-[76]-Osc-SR; T02: 5272-6-[76]-Osc-SR; T03: 5272-6-[76]-Luz-CR; T04: 5272-6-[76]-Luz-SR; T05: 5272-6-[150]-Luz-SR; T06: 5272-6-[300]-Luz-SR).

Al realizar el análisis de los resultados (Figura 1), se detectaron diferencias significativas en la expresión transitoria del gen *GusPlus* entre los tratamientos T01 (0,59 % de los callos con expresión transitoria) vs T03 (7,00 %), T01 (0,59 %) vs Control - Nipponbare (8,00 %) y T06 (1,33 %) vs Control - Nipponbare (8,00 %). Asimismo, se observaron algunas tendencias relacionadas con la edad del callo, la utilización de la luz, la presencia de la radícula y el genotipo del arroz.

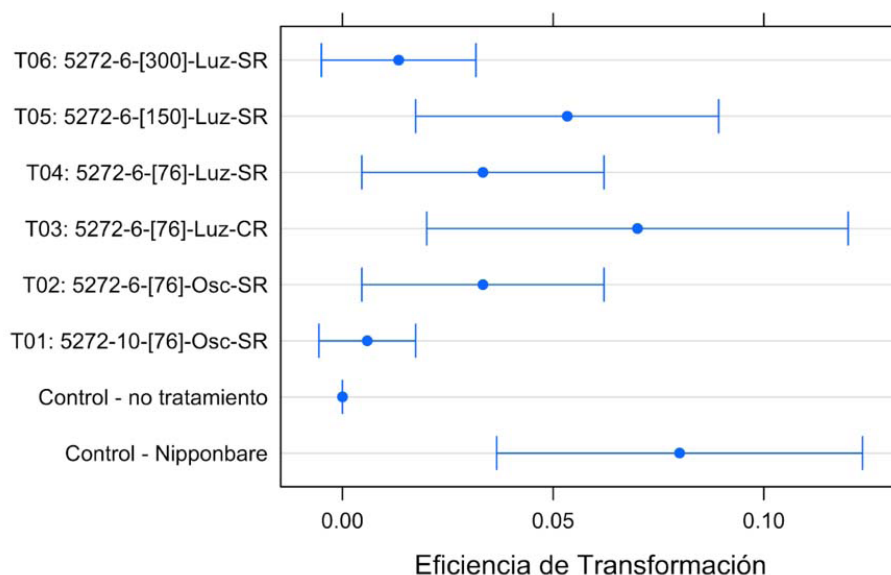


Figura 1. Efecto de los tratamientos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2 sobre la expresión transitoria del gen *GusPlus*. Los valores muestran la eficiencia promedio de transfección \pm SEM ($n_{\text{Control Neg}}=500$, $n_{\text{Control Nipp}}=150$, $n_{\text{T01}}=170$, $n_{\text{T02}}=150$, $n_{\text{T03}}=100$, $n_{\text{T04}}=150$, $n_{\text{T05}}=150$, $n_{\text{T06}}=150$). Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2012 - 2014.

Figure 1. Effect of transformation treatments with *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404:: pCAMBIA1305.2 on the transient expression of the *GusPlus* gene. The values show mean transfection efficiency \pm SEM ($n_{\text{Control Neg}}=500$, $n_{\text{T01}}=170$, $n_{\text{Control Nipp}}=150$, $n_{\text{T02}}=150$, $n_{\text{T03}}=100$, $n_{\text{T04}}=150$, $n_{\text{T05}}=150$, $n_{\text{T06}}=150$). Laboratory of Applied Biotechnology to Crop Genetic Improvement of the Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2012 - 2014.

El porcentaje de expresión transitoria del gen *GusPlus* promedio obtenido en el tratamiento T01 con callos de diez días de edad fue 0,59 %. Sin embargo, se observó un leve incremento al utilizar callos de seis días de edad en el tratamiento T02 (3,33 %). Al comparar los tratamientos T02 y T04, en los cuales se varió la condición lumínica

durante la fase de inducción de callos embriogénicos a partir de semilla madura, se obtuvo el mismo porcentaje con ambos tratamientos (3,33 %). En el tratamiento T03, en el que no solo se utilizó la inducción del callo con luz, sino que se mantuvo la radícula en el callo, la expresión transitoria del gen fue de 7,00 %.

Los resultados obtenidos en esta investigación indican un posible efecto de la concentración de acetosiringona sobre la expresión transitoria del gen *GusPlus*. En los tratamientos T04, T05 y T06, en los que se usó 76, 150 o 300 μM de acetosiringona, respectivamente, se observó un porcentaje de expresión del gen *GusPlus* de 3,33 %, 5,33 % y 1,33 %, respectivamente. Esto sugiere que una concentración de 150 μM de este reactivo estuvo asociado con una mayor expresión transitoria del *GusPlus*.

La expresión del gen *GusPlus* en el tratamiento control con la variedad Nipponbare fue de un 8 %, la mayor que se obtuvo para la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404::pCAMBIA1305.2. Las condiciones utilizadas para el control, brindaron los resultados esperados: ningún callo del control mostró expresión del gen *GusPlus* y todos los callos transformados con el método de biolística presentaron tinción (Figura 2).

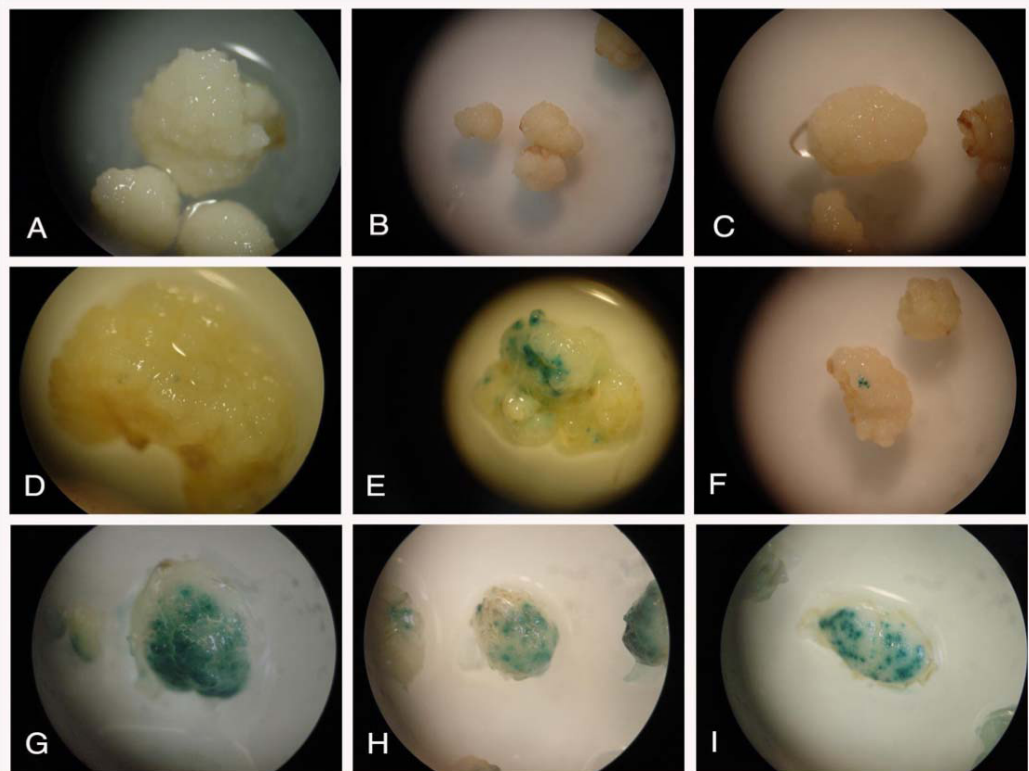


Figura 2. Expresión transitoria del gen *GusPlus* en callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa*) variedad CR5272 de la subespecie *indica*. A, B y C: control. D, E y F: callos transformados con *Agrobacterium* LBA4404 (pCAMBIA 1305.2) tratamientos T05, T03, y T02; respectivamente. G, H e I: callos transformados con el método de biolística con el plásmido pCAMBIA 1305.2. Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2012 – 2014.

Figure 2. Transient expression of the *GusPlus* gene in rice (*Oryza sativa*) embryogenic calluses (*Oryza sativa*) variety CR5272 of the subspecies *indica*. A, B, and C: Control. D, E, and F: Callus transformed with *Agrobacterium* LBA4404 (pCAMBIA 1305.2) treatments T05, T03, and T02, respectively. G, H, and I: Calluses transformed with the biolistics method with the plasmid pCAMBIA 1305.2. Laboratory of Applied Biotechnology to Crop Genetic Improvement of Centro de Investigacion en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2012 - 2014.

Evaluación del protocolo obtenido con otras cepas de *Agrobacterium*

Al evaluar el protocolo obtenido en la primera parte con las cepas de *Agrobacterium* ATHV::pCAMBIA1303, GV3101::pCAMBIA1303, LBA4404::pCAMBIA1303 y LBA4404::pCAMBIA1305.2, la expresión transitoria de los genes *gusA* y *GusPlus* varió entre el 65 y 100 %, mientras que el área promedio de expresión transitoria osciló entre 4,4 mm² y 14,2 mm² (Cuadro 2).

Cuadro 2. Porcentaje y área de callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa*) variedad CR5272 con expresión transitoria del gen *gus* por cepa de *Agrobacterium* evaluada. Laboratorio de Biotecnología Aplicada al Mejoramiento Genético de Cultivos del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. 2012 – 2014.

Table 2. Percentage and area of rice (*Oryza sativa*) embryogenic callus variety CR5272 with transient expression of the *gus* gene per *Agrobacterium* strain evaluated. Laboratory of Applied Biotechnology to Crop Genetic Improvement of the Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular (CIBCM), Universidad de Costa Rica, San Jose, Costa Rica. 2012 – 2014.

Cepa de <i>Agrobacterium</i>	Gen marcador	Porcentaje de callos con expresión transitoria	Área promedio de expresión transitoria (mm ²)
ATHV::1303	<i>gusA</i>	100	14,2 a
GV3101::1303	<i>gusA</i>	100	8,0 a
LBA4404::1303	<i>gusA</i>	65	8,8 a
LBA4404::1305.2	<i>Gus Plus</i>	85	4,4 b

Tratamientos con letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$) / Treatments with different letters indicate significant differences ($p < 0,05$).

Se observaron diferencias significativas en el área promedio de expresión transitoria del gen *gus* entre las diferentes cepas ($p = 1,03e-05$). Al realizar el análisis por comparaciones múltiples (Cuadro 2), las cepas ATHV::pCAMBIA1303, GV3101::pCAMBIA1303, LBA4404::pCAMBIA1303, no presentaron diferencias entre sí ($p > 0,05$). La cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2 presentó diferencias al ser comparada con el resto de las cepas evaluadas ($p < 0,05$) (Cuadro 2).

Discusión

La transformación del arroz con *Agrobacterium tumefaciens* está supeditada a varios factores que median su éxito. La presente investigación evidenció que la edad del callo es un factor primordial que influyó en la eficiencia de transformación del arroz. En la variedad CR5272 esto puede explicarse por la presencia de una delgada capa de nueve a doce filas de células pequeñas e isodiamétricas con alta actividad mitótica a partir de los tres días durante la fase de inducción del callo (Vega et al., 2009), lo que es probable que las haga más sensibles a la transformación con la bacteria y, por ende, muestran una mayor expresión transitoria del gen *gus*. Mientras que, a partir de los diez días de inducción, se presentó un aumento inmediato en el tamaño de las células del callo y se dio una agrupación con diferentes estados de diferenciación (Vega et al., 2009). Es probable que este estado, así como el espesor de las células, dificulten la capacidad de penetración del *Agrobacterium*, lo que se traduce en una menor eficiencia de transformación para esta variedad.

Los resultados de eficiencia de transformación dependiente de la edad de los callos, podrían estar también relacionados al genotipo, en este caso en forma muy específica con la variedad CR5272 utilizada en esta

investigación, ya que se ha reportado en otras variedades de la subespecie *indica* como la IR64 e IR72 que callos derivados de embriones zigóticos de ocho semanas de edad tuvieron una mayor eficiencia de transformación, aunado a que eran más friables y presentaron menor oxidación durante la transformación (Kumar et al., 2005). Asimismo, los callos embriogénicos de la variedad *indica* Ratnagiri-711 de 35 días de edad obtuvieron eficiencia de transformación de 34,03 %, mientras que al utilizar callos de veinticinco días se dio una reducción considerable en la eficiencia de la transformación 8,86 % (Sawant et al., 2018). En otro caso, se utilizó la variedad ASD16, en donde fueron los callos de veintiún días de edad los que mostraron mayor frecuencia de transformación, en contraste con los callos de catorce días (Sundararajan et al., 2017).

Este estudio evidencia un efecto de la concentración de la acetosiringona sobre la eficiencia de transformación con *Agrobacterium*, ya que al duplicar la concentración de 76 μM a 150 μM se incrementó la expresión transitoria del gen *GusPlus* pero decayó al utilizar la concentración de 300 μM . Los datos obtenidos concordaron con los observados en otras investigaciones, en los que al aumentar la concentración de acetosiringona (400 μM) se incrementó la expresión de un gen marcador, pero decayó al utilizar 500 μM (Saharan et al., 2004), así también, en otras investigaciones, se reportó un aumento en la eficiencia de transformación al utilizar concentraciones de acetosiringona hasta 200 μM (Hoque et al., 2005; Shri et al., 2013).

Con respecto al efecto de la aplicación de luz, los resultados de la presente investigación fueron similares a los obtenidos en la subespecie *japonica* y en las variedades de la subespecie *indica* IR-64, Lalat y IET-4786, en donde la aplicación de luz continua durante todas las fases del cultivo *in vitro*, excepto durante el cocultivo, ayudó a la obtención de callos óptimos para la transformación con *Agrobacterium* y tuvo un efecto positivo en la eficiencia de transformación (Nishimura et al., 2006; Shri et al., 2013; Toki, 1997).

La presencia de la radícula permitió la obtención de una mayor expresión transitoria del gen *GusPlus*; es probable que esto se deba a que al mantenerla se disminuye la manipulación al callo, por lo tanto, existe un menor estrés oxidativo, que se puede presentar cuando hay daño en las células, debido a que se da una mezcla del contenido de las vacuolas y el citoplasma, lo que libera compuestos fenólicos que luego pueden ser oxidados por las enzimas peroxidasa o la polifenol oxidasa, lo que conlleva a una muerte celular (Saikat & Aryadeep, 2019).

El tratamiento control de transformación con *Agrobacterium* en la variedad Nipponbare, que se usó como tratamiento de referencia, presentó un mayor porcentaje en la expresión transitoria del gen marcador *GusPlus* al compararse con los demás tratamientos realizados en la variedad CR5272. Los resultados aquí obtenidos concordaron con otras investigaciones que reportaron una mayor eficiencia de la transformación de variedades de la subespecie *japonica* que variedades de la subespecie *indica*, las cuales son consideradas recalcitrantes al cultivo *in vitro* (Kumar et al., 2005; Lin & Zhang, 2005; Nishimura et al., 2006; Yookongkaew et al., 2007). Se ha demostrado que *Agrobacterium* tiene una menor habilidad para infectar callos de la subespecie *indica* (var. Zhenshan) en comparación con la subespecie *japonica* (var. Nipponbare) y se adjudica a las diferencias que presentan en la expresión de los genes relacionados a la defensa en las plantas, multiplicación y división celular, así como los genes relacionados con la replicación del ADN, entre otros (Tie et al., 2012). Los genes relacionados con la defensa de la planta a la infección por *Agrobacterium* se activan y aumentan en la variedad de la subespecie *indica*, mientras que en los callos de la variedad Nipponbare, solo algunos genes fueron activados o inclusive fueron reprimidos, lo que permitió una mejor infección por *Agrobacterium*. Por otro lado, genes relacionados con el crecimiento celular y replicación del ADN se reprimieron en la variedad de la subespecie *indica*, mientras que esto no ocurrió en la variedad de la subespecie *japonica* (Tie et al., 2012).

La expresión transitoria del gen *GusPlus* del plásmido pCAMBIA1305.2 en el experimento control de transformación con biolística, fue del 100 % en todos los callos transformados. Por esta razón, los resultados obtenidos con biolística funcionaron como un control adicional para comprobar la expresión correcta de los genes codificados por el plásmido (Dai et al., 2001).

Los porcentajes de transformación obtenidos con *Agrobacterium* fueron menores que para el control que se realizó con biolística. No obstante, el interés de trabajar con la transformación mediada por esta bacteria, parte de la importancia de contar con una metodología que ofrece ventajas como el bajo número de copias de transgenes, contar con un modelo más predecible de la integración en el ADN, una mayor probabilidad de que la copia del gen de interés esté intacta, mayor probabilidad de obtener fertilidad en las plantas transformadas y una menor probabilidad de que se presenten quimeras en la planta regenerada (Dai et al., 2001; Sood et al., 2011). Desde el punto de vista económico y científico, es una técnica de menor costo en comparación con biolística, que aunque presenta ventajas documentadas en la literatura, también puede presentar algunas desventajas como: integración parcial de los transgenes o rearrreglos, múltiples copias de transgenes en un solo locus, lo que podría resultar en la no expresión del gen o en el silenciamiento de los genes, una menor fertilidad en las plantas transformadas y un mayor costo (i.e. partículas de oro, helio, accesorios e instrumentación, entre otros) (Alok et al., 2017; Dai et al., 2001; Sood et al., 2011).

En este estudio se observó que la cepa de *Agrobacterium* fue un factor de mayor influencia en la eficacia de transformación, así como el medio de cultivo utilizado al cambiar de MSTP a MSP, ya que se logró un aumento al pasar de un 7 % de expresión transitoria del gen *GusPlus* a un 85 % de expresión transitoria con la cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2. Los resultados indicaron que se obtuvo mayor área de expresión transitoria con las cepas ATHV::pCAMBIA1303 y GV3101::pCAMBIA1303, en comparación con la cepa LBA4404::pCAMBIA1305.2. Esto podría deberse a que cada una de las cepas presentan diferencias en su ADN cromosomal o en el plásmido Ti (Deeba et al., 2014), lo que podría crear un efecto distinto en la expresión transitoria del gen *gus* en la variedad CR5272.

Conclusiones

Esta investigación permitió evaluar factores que afectaron la transformación genética vía *Agrobacterium tumefaciens*, en callos embriogénicos de arroz de la variedad costarricense CR5272 de la subespecie *indica*. Se identificaron las condiciones a partir de las cuales se obtuvo la mayor eficiencia de transformación, que fueron las siguientes: callos de seis días de edad, acetosiringona (76 μ M), condición de luminosidad (luz continua en todo momento excepto durante el cocultivo con *Agrobacterium*), presencia de radícula y ATHV como cepa de la bacteria con el plásmido pCAMBIA1303.

Los resultados obtenidos en este estudio ofrecen información necesaria y pueden ser una guía para el diseño de experimentos de transformación para laboratorios con interés de incursionar en la utilización de esta técnica en el mejoramiento genético de arroz tipo *indica*.

Agradecimientos

Los autores expresan su agradecimiento al CIGRAS de la Universidad de Costa Rica y al Laboratorio de Biotecnología Aplicada de la Universidad de Lleida, España, por la donación de la semilla de arroz con la que se trabajó en esta investigación. Este trabajo recibió financiamiento del Consejo Nacional para Investigaciones Científicas y Tecnológicas (CONICIT): FV-054-07 y de los proyectos 801-A8-508 Oficina de Asuntos Financieros – UCR: fondo restringido N° 1471 y 111-B5-708 (red temática “Ingeniería genética aplicada al mejoramiento de cultivos tropicales) de la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad de Costa Rica.

Referencias

- Abdollahi, M. R., Memari, H. R., & van Wijnen, A. J. (2011). Factor affecting the endogenous β -glucuronidase activity in rapeseed haploid cells: how to avoid interference with the Gus transgene in transformation studies. *Gene*, *487*, 96–102. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2011.07.007>
- Alok, A., Sharma, S., Kumar, J., Verma, S., & Sood, H. (2017). Engineering in plant genome using *Agrobacterium*: progress and future. In V. C. Kalia, & A. K. Saini (Eds.), *Metabolic engineering for bioactive compounds: Strategies and processes* (pp. 91–111). Springer. https://doi.org/10.1007/978-981-10-5511-9_5
- Bai, C., Rivera, S., Medina, V., Alves, R., Vilaprinyo, E., Sorribas, A., Canela, R., Capell, T., Sandmann, G., Christou, P., & Zhu, C. H. (2014). An *in vitro* system for the rapid functional characterization of genes involved in carotenoid biosynthesis and accumulation. *The Plant Journal*, *77*, 464–475. <https://doi.org/10.1111/tpj.12384>
- Bonilla, M., Muñoz, J., & Sánchez, F. (2008). Expresión transitoria del gen gus en caña de azúcar usando *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Agronómica*, *57*(3), 161–166.
- Camacho, J., & Navarro, J. (2020). Selección de líneas promisorias de arroz a partir de generaciones avanzadas. *Alcances Tecnológicos*, *13*(1), 40–49. <https://doi.org/10.35486/at.v13i1.169>
- Cervera, M. (2005). Histoquímica and fluorométrica assays for uidA (GUS) gene detection. In L. Peña (Ed.), *Methods in molecular biology, transgenic plants: Methods and protocols* (pp. 203–211). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1-59259-827-7:203>
- Cheng, X., Sardana, R., Kaplan, H., & Altosaar, I. (1998). *Agrobacterium*-transformed rice plants expressing synthetic cryIA (b) and cry IA (c) genes are highly toxic to striped stem borer and yellow stem borer. *Applied Biological Sciences*, *95*, 2767–2772. <https://doi.org/10.1073/pnas.95.6.2767>
- Corporación Arrocería Nacional. (2019). *Informe estadístico periodo 2018-2019*. https://www.conarroz.com/userfile/file/INFORME_ANUAL_ESTADISTICO_PERIODO_2018_2019.pdf
- Dai, S., Zhenng, P., Marmey, P., Zhang, S., Tian, W., Chen, S., Beachy, R. N., & Fauquet, C. (2001). Comparative analysis of transgenic rice plants obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation and particle bombardment. *Molecular Breeding*, *7*, 25–33. <https://doi.org/10.1023/A:1009687511633>
- Datta, K., & Datta, S. K. (2006). Indica rice (*Oryza sativa*, BR29 and IR64). In K. Wang (Ed.), *Agrobacterium Protocols. Methods in Molecular Biology* (pp. 201–212). Humana Press Inc. <https://doi.org/10.1385/1597451304>
- Deeba, F., Hyder, M. Z., Shah, S. H., & Naqvi, S. M. (2014). Multiplex PCR assay for identification of commonly used disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strains. *SpringerPlus*, *3*, Article 358. <https://doi.org/10.1186/2193-1801-3-358>
- Food and Agriculture Organization. (2004). *Rice and human nutrition*. Food and Agriculture Organization.
- Fukagawa, N. K., & Ziska, L. H. (2019). Rice: Importance for global nutrition. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology*, *65*, S2–S3. <https://doi.org/10.3177/jnsv.65.S2>
- García-Arias, C. (2011). Transformación del genoma de arroz (*Oryza sativa* L.) con el gen Vip3A de *Bacillus thuringiensis* para conferir tolerancia a *Spodoptera frugiperda* (J.E SMITH) [Tesis de Maestría, no publicada]. Universidad de Costa Rica.
- He, X., Batheja, M., & Fuqua, C. (2005). Promoter-probe cassettes with the gusA (β -glucuronidase) reporter gene and several different antibiotic resistance markers. *Journal of Microbiological Methods*, *60*, 281–283. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2004.10.005>

- Hiei, Y., & Komari, T. (2006). Improved protocols for transformation of indica rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 85, 271–283. <https://doi.org/10.1007/s11240-005-9069-8>
- Hiei, Y., Ohta, S., Komari, T., & Kumashiro, T. (1994). Efficient transformation of rice (*Oryza sativa*) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *Plant Journal*, 6(2), 271–282. <https://doi.org/10.1046/j.1365-313x.1994.6020271.x>
- Hoque, M. E., Mansfield, J. W., & Bennett, M. H. (2005). *Agrobacterium*-mediated transformation of indica rice genotypes: an assessment of factors affecting the transformation efficiency. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 82, 45–55. <https://doi.org/10.1007/s11240-004-6154-3>
- Jefferson, R. A., Burgess, S.M., & Hirsh, D. (1986). β -Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 83(22), 8447–8451. <https://doi.org/10.1073/pnas.83.22.8447>
- Kosugi, S., Ohashi, Y., Nakajima, K., & Arai, Y. (1990). An improved assay for β -glucuronidase in transformed cells: Methanol almost completely suppresses a putative endogenous β -glucuronidase activity. *Plant Science*, 70, 133–140. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(90\)90042-M](https://doi.org/10.1016/0168-9452(90)90042-M)
- Kumar, K. K., Maruthasalam, S., Loganathan, M., Sudhakar, D., & Balasubramanian, P. (2005). An improved *Agrobacterium* mediated transformation protocol for recalcitrant elite indica rice cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter*, 23, 67–73. <https://doi.org/10.1007/BF02772648>
- Kuta, D., & Tripathi, L. (2005). *Agrobacterium*- induced hypersensitive necrotic reaction in plant cells: a resistance response against *Agrobacterium*-mediated DNA transfer. *African Journal of Biotechnology*, 4, 752-757.
- León, J., & Arroyo, N. (2011). *Producción, tecnología y comercialización del arroz en Costa Rica 1950-2005*. Universidad de Costa Rica.
- Lin, Y., & Zhang, Q. (2005). Optimising the tissue culture conditions for high efficiency transformation of indica rice. *Plant Cell Reports*, 23, 540–547. <https://doi.org/10.1007/s00299-004-0843-6>
- Murashige, T., & Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473–497. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nishimura, A., Aichi, I., & Matsuoka, M. (2006). A protocol for *Agrobacterium*-mediated transformation in rice. *Nature protocols*, 1(6), 2796-2802. <https://doi.org/10.1038/nprot.2006.469>
- Opabode, J. T. (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of plants: emerging factors that influence efficiency. *Biotechnology and Molecular Biology Review*, 1(1), 12–20.
- Patel, M., Dewey, R. E., & Qu, R. (2013). Enhancing *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation efficiency of perennial ryegrass and rice using heat and high maltose treatments during bacterial infection. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 114, 19–29. <https://doi.org/10.1007/s11240-013-0301-7>
- R Core Team. (2015). *R: A language and environment for statistical computing*. R Foundation for Statistical Computing. <https://www.R-project.org>.
- Ramesh, S., Nagadhara, D., Reddy, V. D., & Rao, K. V. (2004). Production of transgenic indica rice resistant to yellow stem borer and sap-sucking insects, using super-binary vectors of *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Science*, 166, 1077–1085. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2003.12.028>

- Ramesh, M., & Gupta, A. (2005). Transient expression of beta-glucuronidase gene in indica and japonica rice (*Oryza sativa* L.) callus cultures after different stages of co-bombardment. *African Journal of Biotechnology*, 4(7), 596–600. <https://doi.org/10.5897/AJB2005.000-3108>
- Reddy, V. S. (2008). *Meetings and courses: Theoretical and practical course “Transgene expression in plants”*. International Centre for Genetic Engineering and Biotechnology.
- Saharan, V., Yadav, R. C., Yadav, N. R., & Ram, K. (2004). Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*, 3(11), 572–575. <https://doi.org/10.4314/ajb.v3i11.15020>
- Saikat, P., & Aryadeep, R. (2019). Comparative analyses of regeneration potentiality of eight indigenous aromatic indica rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *International Journal of Scientific Research in Biological Sciences*, 6(1), 55–64. <https://doi.org/10.26438/ijrsbs/v6i1.5564>
- Sawant, G. B., Sawardekar, S. V., Bhave, S. G., & Kshirsagar, J. K. (2018). Effect of acetosyringone and age of callus on *Agrobacterium* - mediated transformation of rice (*Oryza sativa* L.) calli. *International Journal of Chemical Studies*, 6(3), 82–88.
- Schneider, C. A., Rasband, W. S., & Eliceiri, K. W. (2012). NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nature Methods*, 9(7), 671–675. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2089>
- Shri, M., Rai, A., Verma, P. K., Misra, P., Dubey, S., Kumar, S., Verma, S., Gautam, N., Tripathi, R., Trivedi, P., & Chakrabarty, D. (2013). An improved *Agrobacterium*-mediated transformation of recalcitrant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Protoplasma*, 250, 631–636. <https://doi.org/10.1007/s00709-012-0439-x>
- Sood, P., Bhattacharya, A., & Sood, A. (2011). Problems and possibilities of monocot transformation. *Biología plantarum*, 55(1), 1–15. <https://doi.org/10.1007/s10535-011-0001-2>
- Sudan, C., Prakash, S., Bhomkar, P., Jain, S., & Bhalla-Sarin, N. (2006). Ubiquitous presence of β -glucuronidase (gus) in plants and its regulation in some model plants. *Planta*, 224(4), 853–864. <https://doi.org/10.1007/s00425-006-0276-2>
- Sundararajan, S., Sivaraman, B., Rajendran, V., & Ramalingam, S. (2017). Tissue culture and *Agrobacterium*- mediated genetic transformation studies in four commercially important indica rice cultivars. *Journal of Crop Science and Biotechnology*, 20(3), 175–183. <https://doi.org/10.1007/s12892-017-0045-0>
- Tan, L. W., Rahman, Z. A., Goh, H. H., Hwang, D. J., Ismail, I., & Zainal, Z. (2017). Production of transgenic rice (indica cv. MR219) overexpressing ABP57 gene through *Agrobacterium*-mediated transformation. *Sains Malaysiana*, 46(5), 703–711. <https://doi.org/10.17576/jsm-2017-4605-04>
- Tie, W., Zhou, F., Wang, L., Xie, W., Chen, H., Li, X., & Lin, Y. (2012). Reasons for lower transformation efficiency in indica rice using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation: lessons from transformation assays and genome-wide expression profiling. *Plant Molecular Biology*, 78, 1–18. <https://doi.org/10.1007/s11103-011-9842-5>
- Toki, S. (1997). Rapid and efficient *Agrobacterium* mediated transformation in rice. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(1), 16–21. <https://doi.org/10.1007/BF02772109>
- Toriyama, K., & Hinata, K. (1985). Cell suspension and protoplast culture in rice. *Plant Science*, 41, 179–183. [https://doi.org/10.1016/0168-9452\(85\)90086-X](https://doi.org/10.1016/0168-9452(85)90086-X)

- Tripathi, R. M., Bisht, H. S., & Singh, R. P. (2010). Effect of acetosiringone and callus age on transformation for scutellum-derived callus of rice. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*, 1(4), 163–171.
- Tzfira, T., Jensen, C.S, Wang, W., Zuker, A., Vinocur, B., Altman, A., & Vainstein, A. (1997). Transgenic *Populus tremula*: a step-by-step protocol for its *Agrobacterium*- mediated transformation. *Plant Molecular Biology Reporter*, 15(3), 219–235.
- United Nations. (2019). (2020, January 7). *World population prospects*. <https://population.un.org/wpp/>
- Valdés, V., Aguilar, J., & Sanabria, A. (1992). *Tecnología de producción para el cultivo de arroz en riego: Mejores alternativas en el distrito de riego Arenal* (Cuaderno informativo para productores No. 2). MAG-SENARA-IICA.
- Vega, R., Vásquez, N., Espinoza, A. M., Gatica, A., & Valdez-Melara, M. (2009). Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Revista Biología Tropical*, 57(1), 141–150.
- Yookongkaew, N., Srivatanakul, M., & Narangajavana, J. (2007). Development of genotype-independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. *indica*). *Journal of Plant Research*, 120(2), 237–245.