

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE COSTA RICA**

**ESCUELA DE BIOLOGÍA**

**INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA**

**CENTRO DE INVESTIGACIÓN EN BIOLOGÍA CELULAR Y MOLECULAR**

**DE LA UNIVERSIDAD DE COSTA RICA**

**PROGRAMA DE BIOTECNOLOGÍA DEL ARROZ**



**EL SÍLICE, LA LUZ, LA CONCENTRACIÓN DE LOS REGULADORES DEL  
CRECIMIENTO Y DEL AGENTE GELIFICANTE EN LOS PROCESOS DE  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var. CR-5272**



**ALLAN MENESES MARTÍNEZ**

**Cartago, 2001**

**EL SÍLICE, LA LUZ, LA CONCENTRACIÓN DE LOS REGULADORES DEL  
CRECIMIENTO Y EL AGENTE GELIFICANTE EN LOS PROCESOS DE  
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var. CR-5272**

Informe Final de Práctica de Especialidad sometido a consideración ante la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica por Allan Meneses Martínez como requisito parcial para optar por el título de Ingeniero en Biotecnología.

---

M.Sc. Dora María Flores Mora

*Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica;  
Centro de Investigación en Biotecnología*

**Asesora de Tesis**

---

Ph.D. Miguel Muñoz Fonseca

*Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular;  
Universidad de Costa Rica*

**Miembro del Tribunal**

---

Licda. Annabelle Muñoz Bustos

*Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica;  
Centro de Investigación en Biotecnología*

**Miembro del Tribunal**

## RESUMEN

---

El objetivo de esta investigación fue mejorar la técnica embriogénesis somática indirecta en arroz (*Oryza sativa* L.). Se estudió la incidencia de tres factores en la frecuencia de regeneración de la variedad CR-5272 (indica).

**El sílice en los procesos de embriogénesis somática de arroz.** Debido a la importancia del sílice en los procesos fisiológicos en arroz se estudió el efecto de cuatro diferentes concentraciones de silicato de potasio incorporadas a los medios de cultivo de inducción de callogénesis (MIC) y regeneración (MSR). Se observó un incremento en el peso fresco de los callos cultivados en medios MIC con  $250 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{KSiO}_2$ , sin embargo no se aumentó la biomasa. En la etapa de regeneración se presentó una severa necrosis, por lo que sólo se obtuvo un 1.5% de plantas regeneradas. Esto sugiere que el efecto del sílice en el cultivo *in vitro* deber ser más investigado.

**Exposición transitoria de callos de arroz a la luz y los reguladores del crecimiento durante la fase de pre-regeneración.** En el cultivo *in vitro* de arroz una variación entre la intensidad lumínica y la exposición de los callos a los reguladores del crecimiento puede inhibir o promover la formación de vitroplantas. Se evaluaron tres condiciones de luminosidad combinadas con diferentes períodos de exposición de los callos a los reguladores del crecimiento y se observó que reduciendo el período de cultivo en la fase de pre-regeneración en una semana y en la oscuridad, se aumenta el porcentaje de regeneración.

**Efecto de la concentración del 2,4-D y el agente gelificante (Phytigel™) en la regeneración *in vitro* de arroz.** Se probó el efecto de tres concentraciones de agente gelificante ( $1.8$ ,  $2.4$  y  $3.0 \text{ gL}^{-1}$ ) y cuatro concentraciones de 2,4-D ( $0.5$ ,  $1.0$ ,  $1.5$  y  $2.0 \text{ mgL}^{-1}$ ) en la etapa de inducción de callo con la finalidad de incrementar la eficiencia de regeneración. Se obtuvieron porcentajes de callogénesis similares al control ( $2.0 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D y  $3 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™) empleando medios de cultivo MIC con  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  de 2,4-D y  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™. El porcentaje de regeneración en los callos producidos este último medio fue mayor al obtenido en el tratamiento control, lo cual sugiere que al reducir la cantidad de 2,4-D endógeno en las células de los callos y al elevar la disponibilidad de los nutrientes del medio de cultivo se ve beneficiado el proceso de regeneración.

*Palabras claves:* arroz, embriogénesis somática, sílice, reguladores del crecimiento, luz, agente gelificante.

## ABSTRACT

---

The present investigation was conducted to regenerate *in vitro* rice somatic embryos (*Oryza sativa* L.) CR-5272 cultivar (Indica), evaluating three factors on regeneration frequency: 1) Effect of different silicon concentrations on somatic embryogenesis, 2) Transitory exposition of callus to the plant growth regulators on pre-regeneration phase with different light conditions and 3) Different 2,4-D (2,4 difenoxiacetic acid) and gellum agent concentrations on callus induction and its effect on regeneration phase.

Highest potassium silicate concentrations ( $250 \text{ mgL}^{-1}$ ) stimulated water absorption but no have an increasing in biomass. However necrosis was observed in many callus when were subcultivated on regeneration medium.

One week and dark conditions on pre-regeneration phase were recommended to increase the vitroplants formation. In addition to this modification, greatest callus growth has been obtain when mature embryos were cultured on MS medium containing  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D and  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™. Inducing callus on  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D and  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™ – containing medium enhanced regeneration capacity.

*Key words:* rice, somatic embryogenesis, silicon, plant growth regulators, light, gellum agent.

# TABLA DE CONTENIDOS

<b>RESUMEN</b>	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b>	<b>iv</b>
ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
AGRADECIMIENTOS	xi
INTRODUCCIÓN	12
ANTECEDENTES	13
JUSTIFICACIÓN	17
<b>EL SÍLICE EN LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ</b>	
<b>(<i>Oryza sativa</i> L.) var. CR-5272</b>	<b>19</b>
ANTECEDENTES	20
OBJETIVO GENERAL	24
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
MATERIALES Y MÉTODOS	24
Establecimiento <i>in vitro</i>	24
Selección de la variedad	24
Inducción de Callogénesis	25
Regeneración de los callos	26
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	27
Selección de la variedad	27
Inducción de callogénesis	29
Regeneración de los callos	30
CONCLUSIONES	35
RECOMENDACIONES	36

# EXPOSICIÓN TRANSITORIA DE CALLOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A LA LUZ Y A LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO DURANTE LA FASE DE PRE-

<b>REGENERACIÓN</b>	37
ANTECEDENTES	38
OBJETIVO GENERAL	41
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	41
MATERIALES Y MÉTODOS	41
Establecimiento <i>in vitro</i>	41
Inducción de Callogénesis	41
Regeneración de los Callos	42
Estudio Morfogénico del Cultivo	43
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	44
Regeneración de los callos	44
Estudio morfogénico del proceso	46
CONCLUSIONES	49
RECOMENDACIONES	50

# EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA AUXINA 2,4-D Y EL AGENTE GELIFICANTE (Phytigel™) EN LA REGENERACIÓN *IN VITRO* DE ARROZ

<b>(<i>Oryza sativa</i> L.)</b>	51
ANTECEDENTES	52
OBJETIVO GENERAL	56
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	56
MATERIALES Y MÉTODOS	56
Establecimiento <i>in vitro</i>	56
Movilidad de los nutrientes a través del medio de cultivo	57
Determinación de la densidad	57
Difusión de Sulfato de Cobre (CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O)	58
Efecto de la concentración de Phytigel™ y el 2,4-D en regeneración	59
Ensayo preliminar	59
Inducción de callogénesis	59
Regeneración de vitroplantas	60
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	61
I. MOVILIDAD DE NUTRIENTES A TRAVÉS DEL MEDIO DE CULTIVO	61
Determinación de la densidad	61
Prueba de Difusión con Sulfato de Cobre	62
II. EFECTO DEL PHYTAGEL™ Y 2,4-D EN LA REGENERACIÓN	64
Ensayo preliminar	64
Inducción de callogénesis	65
Regeneración de vitroplantas	71
CONCLUSIONES	74
RECOMENDACIONES	75
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>76</b>
<b>APÉNDICE 1. SOLUCIONES STOCK PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE &amp; SKOOG (1962)</b>	<b>80</b>
<b>APÉNDICE 2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.)</b>	<b>81</b>
<b>ANEXO 1. EVOLUCIÓN UN EMBRIÓN SOMÁTICO DURANTE EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.</b>	<b>83</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b>	Tratamientos para el ensayo de diferentes concentraciones de sílice (KSiO <sub>2</sub> ) en el cultivo <i>in vitro</i> de arroz .....	<b>25</b>
<b>Cuadro 2.</b>	Porcentajes de callogénesis y necrosis obtenidos para tres variedades de arroz cultivados <i>in vitro</i> en tres sitios diferentes .....	<b>27</b>
<b>Cuadro 3.</b>	Porcentajes de rizogénesis, necrosis y regeneración al final de la etapa de pre- regeneración según el tratamiento .....	<b>31</b>
<b>Cuadro 4.</b>	Porcentaje de plantas regeneradas, callos con zonas verdes, callos necrosados y callos con presencia de raíces a las cuatro semanas de cultivo en medios de regeneración .....	<b>44</b>
<b>Cuadro 5.</b>	Prueba de difusión con CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O en medios de cultivo con diferentes concentraciones de agente gelificante .....	<b>58</b>
<b>Cuadro 6.</b>	Concentraciones y fuente de Phytigel™ utilizados para establecer preliminarmente el efecto del agente gelificante en la inducción de callogénesis .....	<b>59</b>
<b>Cuadro 7.</b>	Concentraciones de Phytigel™ y 2,4-D evaluadas en la etapa de callogénesis de arroz .....	<b>60</b>
<b>Cuadro 8.</b>	Medios de cultivo empleados en la regeneración de vitroplantas de arroz .....	<b>60</b>
<b>Cuadro 9.</b>	Valores calculados para la densidad de los medios de cultivo según la concentración de agente gelificante.....	<b>61</b>
<b>Cuadro 10.</b>	Valores promedio para cinco variables medidas al finalizar la etapa de callogénesis .....	<b>67</b>
<b>Cuadro 11.</b>	Porcentaje de callos que no regeneraron, callos regenerados y callos necrosados a las ocho semanas en medios de regeneración .....	<b>71</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Esquema de los eventos morfogénicos y factores involucrados en la formación <i>in vitro</i> de plantas de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L.) mediante la técnica de embriogénesis somática indirecta .....	<b>16</b>
<b>Figura 2.</b>	Funciones del Sílice (SiO <sub>2</sub> ) en las plantas de arroz .....	<b>21</b>
<b>Figura 3.</b>	Peso promedio según la composición del medio de inducción de callo a las cuatro semanas de cultivo .....	<b>29</b>
<b>Figura 4.</b>	Callos de arroz ( <i>Oryza sativa</i> L. var CR-5272) cultivados en medios con sílice .....	<b>32</b>
<b>Figura 5.</b>	Esquema de los tratamientos establecidos para determinar el efecto de los reguladores del crecimiento y las condiciones lumínicas en la regeneración.....	<b>42</b>
<b>Figura 6.</b>	Diferentes eventos que se presentaron durante el ensayo de exposición transitoria a los reguladores del crecimiento y la luz. ....	<b>45</b>
<b>Figura 7.</b>	Proceso de embriogénesis somática indirecta en arroz ( <i>Oryza sativa</i> L) var. CR-5272 .....	<b>47</b>
<b>Figura 8.</b>	Desplazamiento promedio de la solución de CuSO <sub>4</sub> * 5 H <sub>2</sub> O según su concentración y la concentración de Phytigel™ utilizada para gelificar los medios de cultivo .....	<b>63</b>
<b>Figura 9.</b>	Porcentajes promedio para cada variable según la constitución del medio de cultivo .....	<b>68</b>
<b>Figura 10.</b>	Respuesta de los explantes al cultivo en medios de inducción de callo con diferentes concentraciones de 2,4-D y Phytigel™ .....	<b>70</b>
<b>Figura 11.</b>	Respuesta de los callos en la etapa de regeneración .....	<b>72</b>

## **Dedicatoria**

*A Dios, quien ha estado conmigo en todos los momentos de mi vida, y me da fortaleza.*

*A mis padres, quienes se esforzaron por que cada día fuera mejor y de quienes estoy muy orgulloso.*

*A Annabelle, quién me enseñó el verdadero significado de la palabra vida y a luchar por alcanzar mis metas a pesar de la adversidad.*

## AGRADECIMIENTOS

El autor desea expresar su agradecimiento a las siguientes personas y/o instituciones por sus valiosos aportes en el desarrollo de esta investigación:

A la Ph.D. Ana Mercedes Espinosa del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, por aceptarme en su grupo de trabajo y brindarme las facilidades para la realización de este proyecto.

A Dora Flores y Miguel Muñoz por ser mis asesores y su incondicional apoyo. Escuchar y poner en práctica los valiosos consejos que me brindaron durante la ejecución de este trabajo ha sido una experiencia muy enriquecedora para mi desarrollo profesional.

A mi segunda madre y amiga Annabelle Muñoz, para quien no tengo palabras para expresarle todo mi agradecimiento y estima.

A todo el personal del Centro de Investigación en Biotecnología por su interés y apoyo.

Al MSc. Nemesio Zúñiga por sus sugerencias y orientación en el campo de la biofísica.

Al personal de la Escuela de Biología del ITCR, especialmente a Ileana Moreira, Jaime Brenes y Vilma Jiménez, con quienes estoy muy agradecido.

A toda mi familia, la cual me apoyó en cada instante, y en especial a Dennis y Mile quienes me brindaron una gran ayuda durante la elaboración de este trabajo.

A mis amigos Manfred, Gaby, Rafa, Nefer, Raúl e Iván por ser quienes son y darme la oportunidad de compartir con ellos, y en particular a Karol, una de las personas más especiales para mí.

## INTRODUCCIÓN

---

La biotecnología tiene diversas aplicaciones que van desde la obtención de plantas haploides por cultivo de anteras, el uso de la variación somaclonal, la producción de híbridos somáticos por fusión celular y la micropropagación de material hasta la transformación genética de plantas por métodos no convencionales, como biobalística, electroporación y *Agrobacterium*.

El arroz (*Oryza sativa* L.), es el segundo alimento de importancia en el mundo, de ahí la razón por la que se han realizado numerosas investigaciones en este cultivo. En Costa Rica, los trabajos han sido orientados a mejorar la calidad de nuestras variedades, las cuales son del tipo "Indica" (como CR-5272), las cuales son caracterizadas por ser las más recalcitrantes al cultivo *in vitro* entre las variedades existentes a la fecha. Esto implica una elevada inestabilidad en los procesos de obtención de plantas por embriogénesis somática indirecta.

Entre las variedades de arroz se presentan diferencias significativas en cuanto a la eficiencia de la formación del callo, la obtención de embriones somáticos y la regeneración de plantas entre las variedades de arroz. Estas diferencias se han convertido en una de las principales limitantes para el mejoramiento genético del arroz mediante la aplicación de la biotecnología. Por lo tanto, se debe llevar a cabo investigaciones más intensivas sobre el uso de nuevos compuestos promotores de una efectiva embriogénesis somática como los reguladores del crecimiento, aminoácidos y azúcares, también deben analizarse los factores involucrados en los diferentes procesos fisiológicos, tales como el tipo y cantidad de luz, las vías de absorción, la morfogénesis de los explantes, entre otros, con el fin de lograr un buen desempeño de programas de mejoramiento genético del arroz.

## ANTECEDENTES

---

Los cereales como trigo, el maíz, la cebada y arroz constituyen una de las principales fuentes de proteínas y calorías para el ser humano, ya que más del 52% de los alimentos a escala mundial son derivados de cereales (Vega, 1996). Por ello el arroz (*Oryza sativa* L.) es considerado como uno de los recursos más importantes. Se estima que más de dos billones de personas consumen arroz, por lo que después del trigo ocupa el segundo lugar de importancia a nivel mundial (Vega, 1996 y Jain, 1997). En Costa Rica el arroz es uno de los tres alimentos básicos en la dieta de los costarricenses, ya que se consume un promedio de 45 Kg *per capita* por año, cifra considerada como un índice elevado para 1992 (Cordero, s.f.).

El arroz tiene como centro de origen China y el sureste asiático se ha considerado como una especie determinante en las culturas de África, India y Australia (Montiel, 1991). Pertenece a la familia Poaceae, subfamilia Oryzoideae y se divide en tres variedades, a saber: japónica, javanica e indica (Jain, 1997). Entre las variedades costarricenses destacan materiales tipo indica como CR-5272, que fue liberada en 1976 y que se caracteriza por ser de porte bajo, hojas erectas, macollamiento moderado y resistente al acame. Florece entre los 80 y 85 días después de la siembra y tarda de 110 a 115 días para la cosecha, por lo que constituye la variedad comercial más precoz que existe en el mercado y con un grano de excelente calidad. Es resistente a los hongos *Helminthosporium* sp. y *Rynchosporium* sp., pero susceptible a *Pyricularia* (*Magnophorthe grisea*) y al virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) (Cordero, s.f. y MAG, 1991).

En Costa Rica existen cinco zonas arroceras: Pacífico Central, Chorotega, Brunca, Huetar Norte, Huetar Atlántica, aunque en esta última el cultivo se ha visto desplazado por el cultivo de banano. El modo de cultivo es seco y bajo riego en suelos de mediana a alta fertilidad con buenos contenidos de bases y ligeramente ácidos, como los vertisoles, que difícilmente pueden ser sembrados con otros cultivos (Cordero, s.f.).

## CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES

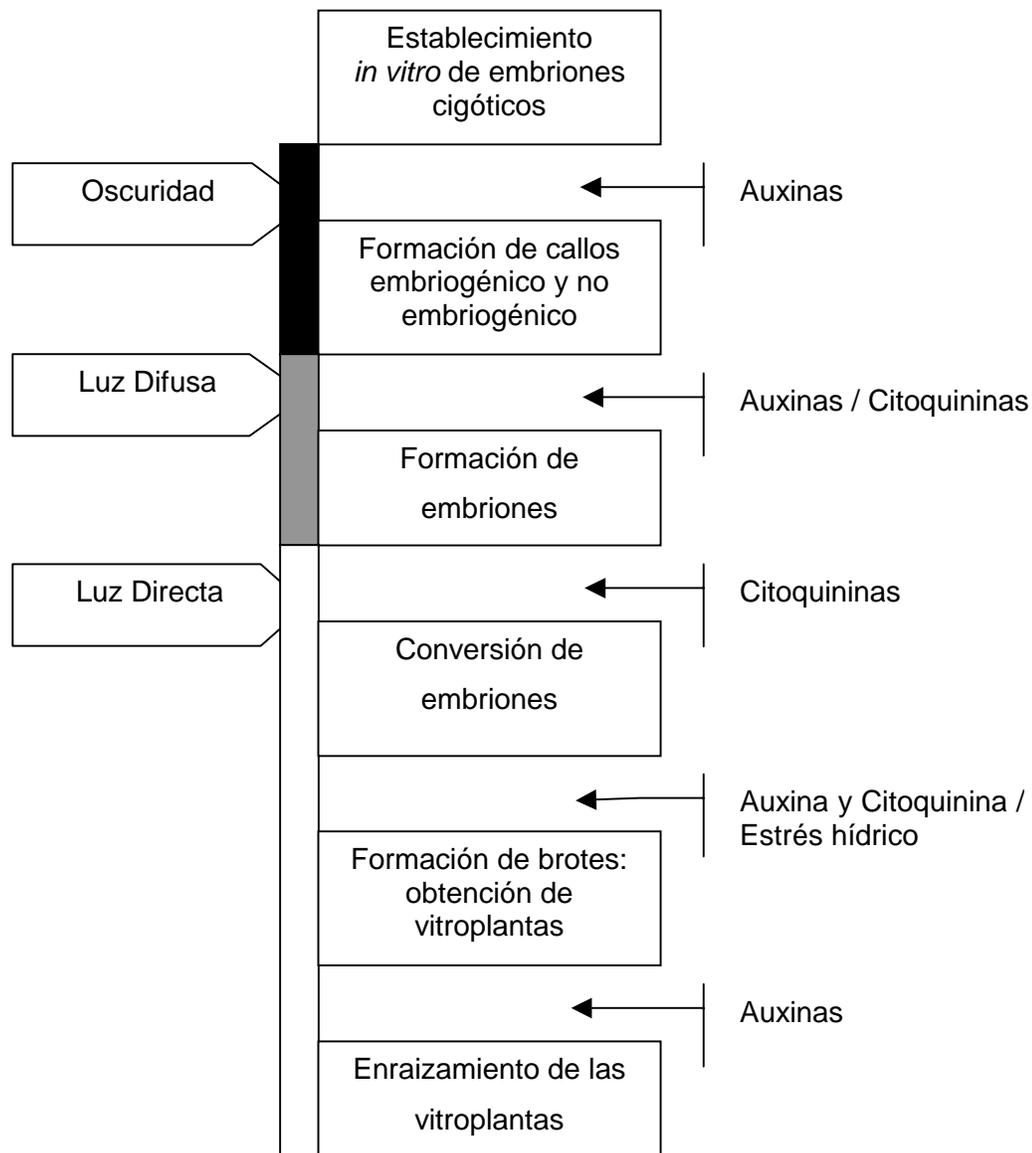
La biotecnología ha conducido al desarrollo de una serie de técnicas que permiten un adecuado aprovechamiento y conservación de los recursos genéticos (Flores y Abdelnour, 2000). Actualmente las técnicas del cultivo *in vitro* y ADN recombinante han sido utilizadas para incrementar el rendimiento y la calidad de productos agrícolas, convirtiéndose en herramientas de gran utilidad para el mejoramiento y establecimiento de sistemas altamente productivos de arroz.

El cultivo de tejidos consiste en el proceso mediante el cual se cultivan células, órganos o tejidos bajo condiciones estériles en medios de cultivo con la composición química adecuada para la producción de plantas (Flores y Brenes, 1999). Se basa en el principio de totipotencia celular, distinguiéndose dos rutas morfogénicas: la *organogénesis*, que implica la obtención directa de brotes y raíces a partir de segmentos de plantas (llamados explantes) cultivados *in vitro*. La otra vía es llamada *embriogénesis somática*, y consiste en el desarrollo de estructuras bipolares con las propiedades morfológicas de embriones cigóticos utilizando células somáticas (Endress, 1994).

La embriogénesis somática se puede realizar de manera *directa*, donde el embrión se desarrolla directamente de las células somáticas o *indirectamente*, mediante la obtención previa de callos (Endress, 1994). Sin embargo en ambos casos los embriones se caracterizan por ser estructuras bipolares con eje apical y radical que no poseen conexión vascular con el tejido materno (Jiménez, 1999).

En arroz (*Oryza sativa* L.), los procesos de embriogénesis somática indirecta han sido ampliamente estudiados para la producción y clonación de plantas bajo condiciones de laboratorio. Esta vía consta principalmente de dos etapas: la iniciación (formación de callo) y la maduración (desarrollo del embrión). Los requerimientos de luz y reguladores del crecimiento para ambas fases son diferentes: para la primer etapa el cultivo del explante se debe realizar en medios de cultivo con altos niveles de auxinas, los cuales se disminuyen en la fase de maduración de los embriones (Bains, 1993 y Payne *et al.*, 1991).

El proceso de formación de vitroplantas por embriogénesis somática es el resultado de la interacción de factores físicos como bioquímicos. En la figura 1 se observan los factores de más importancia en arroz. Se ha definido claramente que factores como la luz y los reguladores del crecimiento, tienen un papel fundamental en los eventos morfogénicos que conllevan a formación de vitroplantas. Sin embargo para el cultivo *in vitro* del arroz se encuentran marcadas diferencias entre los protocolos según el tipo de cultivar. Por ejemplo, las líneas de la variedad Indica presentan bajo potencial de regeneración en comparación con otras variedades del tipo japonica y javanica (Ogawa, 2000).



**Figura 1.** Esquema de los eventos morfogénicos y factores involucrados en la formación *in vitro* de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante la técnica de embriogénesis somática indirecta. CIBCM, 2001.

Debido a ello, se deben buscar nuevos factores promotores de la regeneración *in vitro* que mejoren la eficiencia de la embriogénesis somática, tales como compuestos orgánicos, reguladores del crecimiento y aminoácidos (Chowdhry *et al.*, 1993), así como la inducción de estrés osmótico de los callos, mediante el uso de azúcares o cloruro de sodio (Jain, 1997).

## JUSTIFICACIÓN

---

La productividad del arroz está en función del suelo, el clima, el manejo agronómico y la variedad, siendo esta última la más influyente en los bajos rendimientos. Debido al uso de las mismas variedades durante las últimas dos décadas no ha habido incremento significativo en el rendimiento y debido a los cambios en las poblaciones de patógenos y plagas se han incrementado los problemas fitosanitarios y por consiguiente los costos de producción. Otros factores que inciden en la producción son los de aspectos socioeconómicos, así como las cambiantes políticas gubernamentales, especialmente la importación de granos subsidiados (Cordero, s.f.).

Durante los últimos años el desarrollo de nuevas tecnologías y variedades, ha sido muy escaso o no ha ido acorde a los problemas agronómicos, por lo que actualmente se necesitan cultivares promisorios, o sea una variedad completamente tolerante a las principales enfermedades que afectan el cultivo de arroz en Costa Rica, como lo son *Pyricularia (Magnaporthe grisea)*, *Rhizoctonia* sp, el Virus de la Hoja Blanca del Arroz (RHBV), *Helminthosporium*, y *Rynchosporium* (Cordero, s.f. y MAG, 1991) y que a la vez produzca una alta cantidad de semilla de calidad comercial.

A pesar que desde 1980 se detectó el problema del Virus de la Hoja Blanca del Arroz (RHBV), los programas no han sido dirigidos a mejorar y seleccionar variedades resistente al virus, por lo que se ha incrementado el uso de insecticidas para combatir el insecto vector conocido como “sogata” (*Tagosodes oryziculus*) (Cordero, s.f.). Actualmente, el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular está trabajando para conferir resistencia al RHBV a las variedades costarricenses utilizando las novedosas técnicas de la ingeniería genética.

Todo proceso de transformación genética de plantas lleva consigo la interacción de la biología molecular con los procesos de obtención de plantas mediante el cultivo de tejidos. Esto debido a que la introducción de genes foráneos a cultivos de importancia requiere de un sistema de regeneración eficiente y reproducible, que produzca plantas fértiles en campo a partir de tejidos transformados (Rueb *et al.*, 1994). Este sistema debe en un principio ofrecer una alta frecuencia de regeneración y minimizar el período de cultivo *in vitro*.

En el caso de arroz se ha informado de trabajos sobre la regeneración de callos y cultivos celulares. Sin embargo la mayoría, menciona bajos porcentajes y la poca frecuencia con que esta ocurre en cultivares tipo indica. Se debe añadir el efecto del genotipo, ya que se han encontrado respuestas diferentes al cultivo *in vitro* inclusive entre variedades de la misma subespecie (Al-khayri *et al.*, 1996, Chowdhry *et al.*, 1993, Jain 1997, Tsukahara y Hirosawa 1992, Valdez *et al.*, 1996 y Vega 1996). Por lo tanto, la diferenciación de células y/o tejidos transformados a estructuras organizadas, constituye una de las principales limitantes para que los sistemas de transformación genética sean efectivos y rentables económicamente.

Con el propósito de incrementar el porcentaje de regeneración y minimizar el período de cultivo *in vitro* en arroz CR-5272 (indica) utilizando la técnica de embriogénesis somática, se plantearon tres ensayos, con el fin de evaluar el efecto de tres factores:

- Evaluar el efecto del sílice ( $\text{KSiO}_2$ ) en la embriogénesis somática de arroz (*Oryza sativa* L. var. CR- 5272.)
- Determinar el efecto del tiempo de exposición de callos de arroz (*Oryza sativa* L. var. CR-5272) a los reguladores del crecimiento y la luz en la etapa de regeneración.
- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y agente gelificante en la inducción de callos y su efecto en la fase de regeneración de arroz (*Oryza sativa* L. var. CR-5272).

# CAPÍTULO I

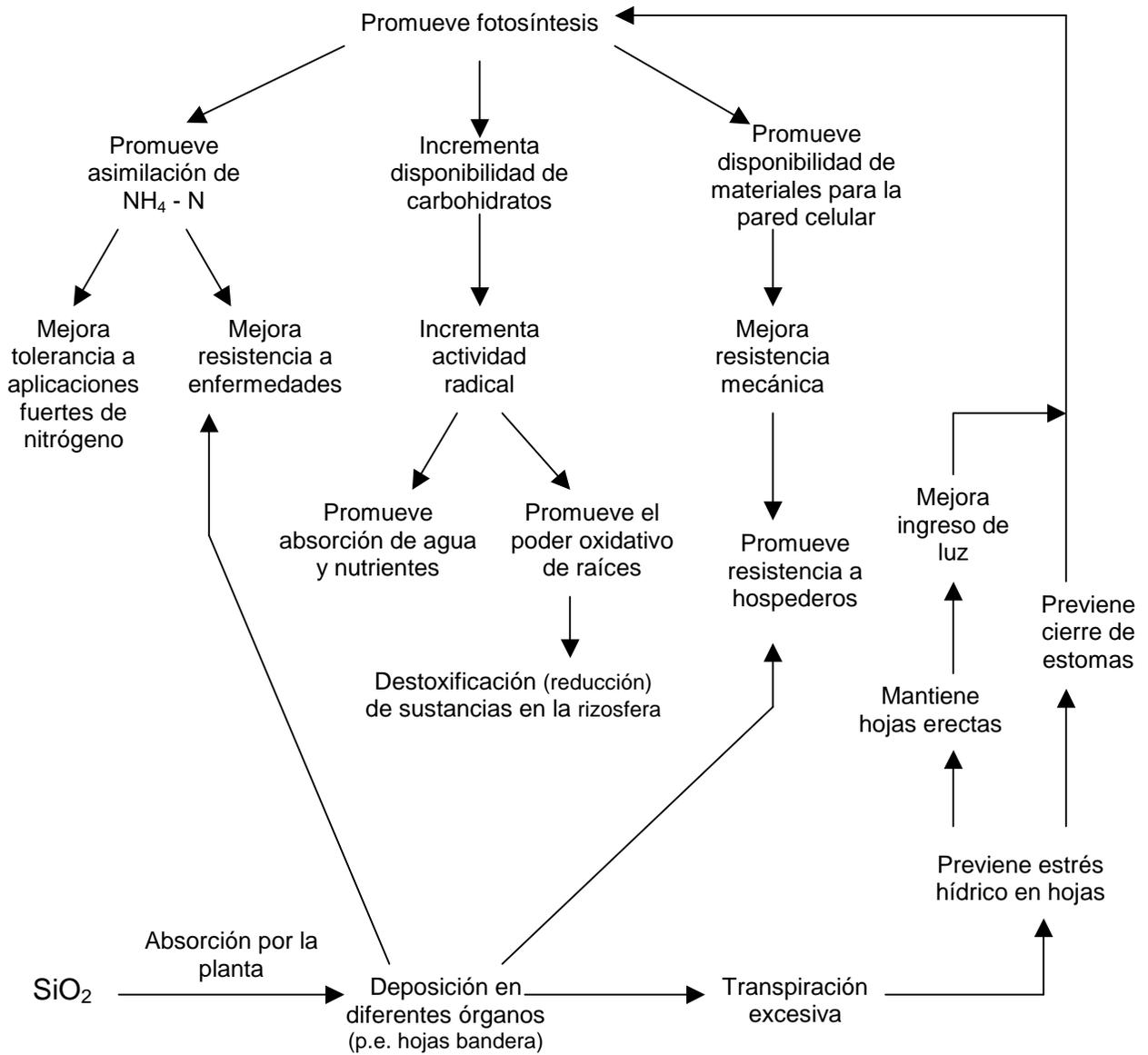
**EL SÍLICE EN LOS PROCESOS DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ  
(*Oryza sativa* L.) var. CR-5272**

## ANTECEDENTES

El sílice es el segundo elemento más abundante en la superficie terrestre y se encuentra en el suelo como  $\text{Si}(\text{OH})_4$  ó  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  (ácido silicio). Mediante la utilización de soluciones nutritivas se ha determinado que es esencial sólo para tomate (*Lycopersicon sculetum*), pepino (*Cucumis sativas*), soya (*Glycine max*) y fresa (*Fragaria x ananassa*), aunque es beneficioso para muchas especies, estimulando su crecimiento (Epstein 1999, Salisbury y Ross 1992 y Meisner, s.f.). Las plantas se han clasificado en *acumuladoras de sílice*, cuando la absorción del sílice excede la absorción de agua, detectándose más de 1% en peso seco en hojas (como por ejemplo el arroz) y en plantas *no acumuladoras*, cuando la absorción es similar o menor que el grado de absorción de agua (Takahashi y Miyake, 1977 y Epstein, 1994).

La absorción de sílice está relacionada con el metabolismo de las raíces (transporte activo, vía simplasto) y no se tienen reportes de que se vea afectada por la transpiración. Además en algunas especies la endodermis de las raíces actúa como una barrera para el transporte de radicales de sílice. Su deposición como  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  en las paredes y células epidérmicas de las hojas después de la evaporación del agua, crea una capa firme de sílice en la epidermis que funciona como barrera contra la pérdida de agua y transpiración cuticular, a la vez que reduce las infecciones fungosas. Cuando es depositado como  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  es inmóvil y no es redistribuido (Epstein, 1994). En gramíneas se encuentran considerables cantidades de sílice en la epidermis localizado intracelularmente en las células silíceas y buliformes. (Meisner, s.f.)

En el arroz el sílice constituye uno de los elementos de mayor absorción. Takahashi (1995) indica que la absorción de sílice en plantas de arroz es seis veces mayor que la del potasio, 10 veces que la nitrógeno y hasta 20 o 30 veces mayor que para el  $\text{P}_2\text{O}_5$  y el calcio, respectivamente. Interviene en varios procesos fisiológicos de importancia como el período de floración además de actuar en la economía de agua, la estimulación de la fotosíntesis y el aumento de la resistencia a enfermedades fungosas, además favorece la utilización eficiente del ácido fosfórico. En la figura 2 se muestran los beneficios del sílice en el cultivo de arroz.



**Figura 2.** Funciones del Sílice (SiO<sub>2</sub>) en las plantas de arroz. <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Tomado de Takahashi (1995) y traducido por el autor.

Las pruebas de campo han determinado que al reducir la cantidad de sílice, el arroz ha presentado síntomas de deficiencia como retardo en el crecimiento, un incremento en la transpiración de un 30%, producción de granos reducida, marchitamiento y muerte de hojas maduras (Meisner, s.f. y Takahashi, 1995). Además estudios realizados con caña de azúcar y trigo han demostrado que los enlaces de la pared celular contienen sílice probablemente como un éster derivado del  $\text{SiO}_2$ , actuando como un puente en la organización estructural formando complejos de sílice de alta estabilidad y baja solubilidad. Por lo tanto, no solo es una deposición inerte en las paredes celulares lignificadas, sino que también lo hace modulando la biosíntesis de lignina, ya que contribuye a la rigidez de las paredes e inclusive se tiene la hipótesis de que incrementa la elasticidad de la pared celular durante el crecimiento, mediante la interacción con las pectinas y polifenoles (Epstein, 1999).

Durante la fase reproductiva el sílice es transportado a la hoja bandera y una interrupción de su suministro afecta la fertilidad de las espigas, por lo que pareciera ser que no es requerido para el crecimiento vegetativo, pero si en la fase reproductiva. Sin embargo la determinación de su esencialidad para el arroz ha sido difícil debido a la gran cantidad de sílice presente en la biosfera (Epstein, 1994). Según Abdelnour (2000) para que un elemento sea catalogado como esencial debe cumplir con tres postulados:

- La planta no puede completar su ciclo de vida en su ausencia
- Es constituyente de una molécula esencial para la planta
- No puede ser reemplazado por otro elemento.

Algunos estudios han revelado que plantas de arroz con suministro de sílice ( $100 \text{ mgL}^{-1} \text{ SiO}_2$ ) durante la etapa vegetativa y reproductiva ha aumentado el porcentaje de sílice presente en brotes de un 0.05% (plantas sin sílice) a un 10.4%, notándose un incremento en el peso seco de raíces, tallos y granos (Meisner, s.f.). Aunado a ello, la adición de sílice reduce la absorción de calcio en plantas de arroz (Epstein, 1999).

Debido a que el arroz se caracteriza por ser una planta hiperacumuladora de sílice y dado a que se ha comprobado su efecto beneficioso en varios procesos involucrados en su desarrollo se tiene la hipótesis de que la incorporación de una fuente de sílice en los medios de cultivo *in vitro* puede estimular una respuesta positiva del explante. A la fecha no hay informes de su efecto en la morfogénesis del arroz, ni en procesos de embriogénesis somática, por lo que esta investigación es clave para el estudio de los efectos del sílice en el cultivo de tejidos vegetales.

## OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto del sílice ( $\text{KSiO}_2$ ) en la embriogénesis somática de arroz (*Oryza sativa* L.) var. CR- 5272.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el efecto de la incorporación de diferentes concentraciones de silicato de potasio ( $\text{KSiO}_2$ ) en los medios de inducción de callo.
- Evaluar la frecuencia de regeneración de los callos cultivados en medios con  $\text{KSiO}_2$  como fuente de sílice.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Establecimiento *in vitro*.** Se utilizaron embriones maduros de *Oryza sativa* L. variedad CR-5272 provenientes del Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica para inducir la formación de callos. Para el establecimiento *in vitro* se siguió el protocolo desarrollado por el CIBCM, el cual consiste en una desinfección superficial de las semillas sin testa con NaOCl (3.5% i.a.) + Tween 20 (Sigma) por 20 minutos en agitación, seguido de tres lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Posteriormente se vuelven a sumergir en NaOCl (3.5% i.a.) + Tween 20 (Sigma) por 20 minutos en agitación constante. Finalmente se realizan cinco lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar y se inocularon de 10 a 15 semillas por plato petri.

**2. Selección de la variedad.** Para verificar el potencial callogénico y la respuesta *in vitro* de los explantes (embriones cigóticos maduros) se indujo la formación de callo en tres variedades tipo indica (CR-5272, CR-1821 y CR-1113), bajo condiciones ambientales similares, pero en lugares diferentes. Después de la desinfección las semillas fueron inoculadas en medios de cultivo MIC (sin sílice) y se colocaron a la oscuridad a una temperatura de 27° C. A las cuatro semanas para cada una de las tres variedades se evaluó el porcentaje de callogénesis y el porcentaje de necrosis. La formación de callo se realizó en tres lugares diferentes, a saber:

**T 1:** Cuarto de crecimiento del Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica

**T 2:** Cuarto de crecimiento cálido del Centro de Investigación en Biotecnología (CIB) del Instituto Tecnológico de Costa Rica.

**T 3:** Cámara de crecimiento ubicada en el CIB.

**3. Inducción de Callogénesis:** Se indujeron callos a partir del escutelo de embriones cigóticos maduros cultivados en medio de inducción de callos (MIC, apéndice 2) de acuerdo a Valdez *et al.* (1996), suplementados con diferentes concentraciones de silicato de potasio (KSiO<sub>2</sub>) como fuente de sílice (cuadro 1). Se colocaron a la oscuridad a una temperatura promedio de 27° C, durante cuatro semanas.

**Cuadro 1.** Tratamientos para el ensayo de diferentes concentraciones de sílice (KSiO<sub>2</sub>) en el cultivo *in vitro* de arroz. CIBCM, 2000.

Concentración de KSiO <sub>2</sub> en el medio de cultivo			CALLOGÉNESIS				
			MIC 0	MIC 1	MIC 2	MIC 3	MIC 4
			0 mgL <sup>-1</sup>	31.25 mgL <sup>-1</sup>	62.5 mgL <sup>-1</sup>	125 mgL <sup>-1</sup>	250 mgL <sup>-1</sup>
<b>REGENERACIÓN</b>	<b>MSKA 0</b>	0 mgL <sup>-1</sup>	1	2	3	4	5
	<b>MSKA 1</b>	31.25 mgL <sup>-1</sup>	6	7	8	9	10
	<b>MSKA 2</b>	62.5 mgL <sup>-1</sup>	11	12	13	14	15
	<b>MSKA 3</b>	125 mgL <sup>-1</sup>	16	17	18	19	20
	<b>MSKA 4</b>	250 mgL <sup>-1</sup>	21	22	23	24	25

Se probaron 25 tratamientos, con seis repeticiones por tratamiento y 15 explantes por repetición. Las variables a evaluar fueron el porcentaje de callogénesis, peso fresco, peso seco y el porcentaje de mortalidad (necrosis) después de cuatro semanas de inducción de callo. Para la determinación del peso seco, se tomaron al azar 15 callos de cada tratamiento y distribuyeron en sobres de papel, de manera que se obtuvieron tres repeticiones (cinco callos/repetición). Se tomó el peso del sobre antes y después de haber introducido los callos (peso fresco). Posteriormente se introdujeron en un horno secador a 60° C durante 48 horas. Transcurrido este tiempo se sacaron y se dejaron enfriar a temperatura ambiente antes de pesarlos y obtener el peso seco.

**4. Regeneración de los Callos:** Callos de cuatro semanas de formación se transfirieron al medio de pre- regeneración (MSKA, apéndice 2) suplementado con 2 mgL<sup>-1</sup> de kinetina y 0.5 mgL<sup>-1</sup> de ANA y diferentes concentraciones de KSiO<sub>2</sub> como fuente de sílice (Cuadro 1). Los callos se mantuvieron por un período de dos semanas a luz difusa a 27° C y luego se subcultivaron en medios de regeneración (MSR, apéndice 2) bajo un régimen de luz directa a 27° C hasta obtener vitroplantas. En esta fase se evaluó el número de callos que presentaron regeneración, el número de callos con zonas verdes y el número de vitroplantas por callo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 1. Selección de la variedad

Para analizar el potencial callogénico y verificar la calidad de la semilla utilizada y las condiciones de los cuartos de crecimiento se estableció un ensayo, el cual consistió en inducir la formación de callo con diferentes variedades (CR-5272, CR-1821 y CR-1113), debido a que se conoce que su comportamiento en la fase de callogénesis difiere notablemente en el número de callos producidos (cuadro 3), y esto permite hacer una estimación indirecta de la calidad de la semilla.

Se determinó que la semilla CR-5272 fue la que mejor respondió a la formación de callos, ya que se obtuvieron porcentajes de callogénesis de un 79 % a un 82 %, seguida por CR-1821 (75 % a 80 %) y CR-1113 (37 % a 53 %). Además, con la variedad CR-1113 se obtuvo una alta tasa de necrosamiento de los callos producidos en comparación con los resultados obtenidos para las otras dos variedades evaluadas.

**Cuadro 2.** Porcentajes de callogénesis y necrosis obtenidos para tres variedades de arroz cultivados *in vitro* en tres sitios diferentes \*. CIBCM, 2000.

Lugar	VARIEDAD					
	CR-5272		CR-1821		CR-1113	
	Callogénesis	Necrosis	Callogénesis	Necrosis	Callogénesis	Necrosis
<b>T 1:</b> Cuarto Crecimiento CIBCM	79 %	0 %	75 %	12 %	53 %	32 %
<b>T 2:</b> Cuarto Crecimiento Cálido CIB	82 %	0 %	80 %	7 %	37 %	25 %
<b>T 3:</b> Cámara Crecimiento CIB	80 %	2 %	76 %	7 %	41 %	40 %

\* Cada tratamiento constó de 60 explantes cultivados.

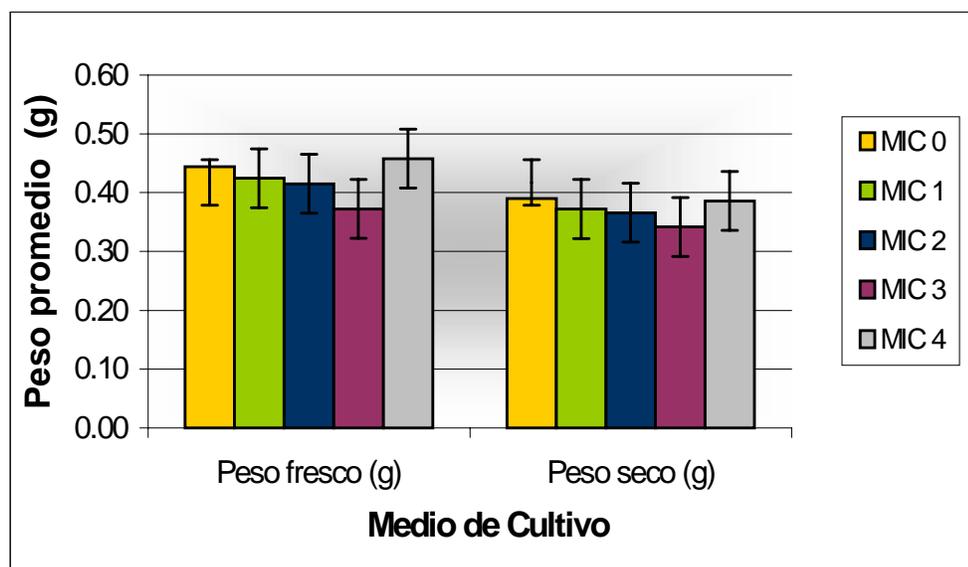
Fuente: datos de laboratorio.

Estos resultados sugieren que el lote de semillas de la variedad CR-5272 utilizado se encuentra en óptimas condiciones para ser empleado como explante inicial para procesos de cultivo *in vitro*.

## 2. Inducción de callogénesis

Durante la fase de inducción de callo, no se observó ninguna diferencia entre los tratamientos para las variables peso seco y porcentaje de callogénesis, pero sí para el valor del peso fresco. A pesar de que se esperaban resultados similares entre los tratamientos en los cuales el medio de inducción de callo fue el mismo, se observó que los valores de peso fresco y seco obtenidos para cada tratamiento difieren entre sí, inclusive para tratamientos similares.

El análisis de peso promedio fresco y seco según el medio de cultivo utilizado se observa en la figura 3, donde se aprecia que hubo aumento en el peso fresco de los callos inducidos en medios MIC 4 ( $250 \text{ mgL}^{-1}$  de  $\text{KSiO}_2$ ) con respecto al control (MIC 0). Sin embargo, la prueba de comparación de medias de Tukey determinó con un 95% de confianza que no existe diferencia significativa entre los medios de cultivo.



**Figura 3.** Peso promedio según la composición del medio de inducción de callo a las cuatro semanas de cultivo. CIBCM, 2000.

Los callos inducidos en medios sin sílice presentaron mayor peso seco, por lo tanto, se puede suponer que la incorporación de sílice ( $\text{KSiO}_2$ ) a concentraciones de  $250 \text{ mgL}^{-1}$  estimula la absorción de agua pero se refleja en un incremento de la biomasa.

### **3. Regeneración de los callos**

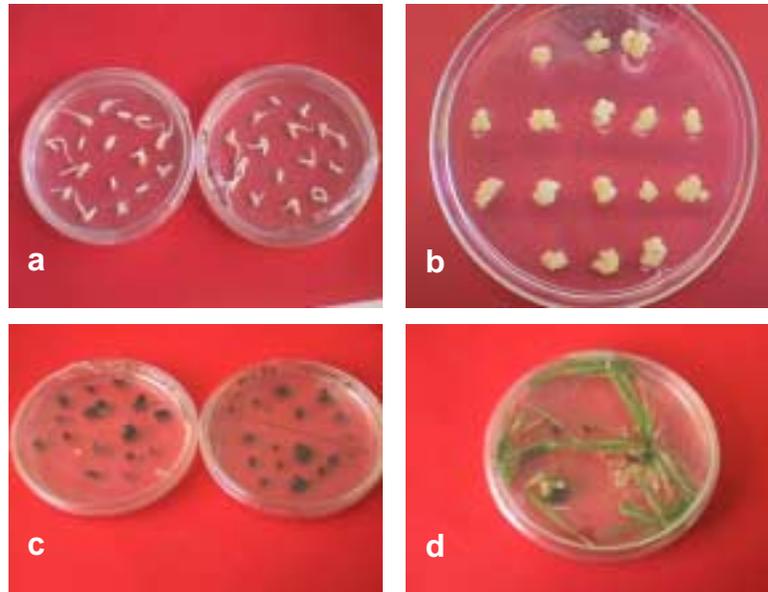
Al finalizar de la etapa de pre- regeneración se analizaron tres factores: necrosis, callos con raíces y porcentaje de número de callos con puntos verdes. Las primeras dos se evaluaron debido a que se observó una mayor incidencia de estos eventos por encima de lo que Vega (1996) y Valdez (1996) han informado para la variedad CR-5272.

Concluidas las dos semanas de cultivo en el medio de pre- regeneración se observaron altos porcentajes de rizogénesis y de necrosamiento (cuadro 2), por lo que sólo los callos de apariencia normal se subcultivaron en medios de regeneración (MSR; cuadro 1). Sin embargo en éste medio el 44 % de callos presentaron necrosis total y 43 % de callos se necrosaron parcialmente. Únicamente el 1.45% de los callos regeneraron plantas, por lo que se decidió suspender el ensayo. En la figura 4 se puede observar la evolución de los callos durante el ensayo, los cuales con el transcurso del tiempo se fueron necrosando progresivamente.

**Cuadro 3.** Porcentajes de rizogénesis, necrosis y regeneración al final de la etapa de pre- regeneración según el tratamiento \*. CIBCM, 2000.

TRATAMIENTO			VARIABLE		
Número de Identificación	Concentración KSiO <sub>2</sub> (mgL <sup>-1</sup> ) Callogénesis	Concentración KSiO <sub>2</sub> (mgL <sup>-1</sup> ) Regeneración	Porcentaje Rizogénesis	Porcentaje Necrosis	Porcentaje de Regeneración
1	0	0	5,0 %	10 %	1.2 %
2	31.25	0	5,0 %	7,5 %	1.0 %
3	62.50	0	11,3 %	6,3 %	0 %
4	125	0	12,5 %	6,3 %	0 %
5	250	0	12,5 %	10 %	0 %
6	0	31.25	18,8 %	5,0 %	0 %
7	31.25	31.25	11,3 %	2,5 %	1.4 %
8	62.50	31.25	22,5 %	5,0 %	0 %
9	125	31.25	28,75 %	2,5 %	0 %
10	250	31.25	12,5 %	3,8 %	0 %
11	0	62.50	17,5 %	12,5 %	0 %
12	31.25	62.50	18,8 %	8,8 %	0 %
13	62.50	62.50	18,8 %	7,5 %	0 %
14	125	62.50	13,8 %	6,3 %	0 %
15	250	62.50	12,5 %	6,3 %	0 %
16	0	125	7,5 %	8,8 %	0 %
17	31.25	125	5,0 %	7.5 %	0 %
18	62.50	125	7,5 %	5,0 %	0 %
19	125	125	12,5 %	7,3 %	0 %
20	250	125	18,8 %	16,3 %	0 %
21	0	250	7,5 %	11,3 %	0 %
22	31.25	250	13,8 %	6,3 %	0 %
23	62.50	250	10 %	7,5 %	0 %
24	125	250	8,8 %	10 %	0.8 %
25	250	250	11,3 %	10 %	0 %

\* Cada tratamiento constó de 60 callos.  
Fuente: datos de laboratorio.



**Figura 4.** Callos de arroz (*Oryza sativa* L. var CR-5272) cultivados en medios con sílice. a) callos de dos semanas de formación en medio de cultivo MIC; b) callos de 4 semanas en medio MIC; c) callos necrosados durante el proceso de regeneración; d) vitroplanta obtenida en medios de regeneración con  $\text{K}_2\text{SiO}_4$ . CIBCM, 2000.

Entre los posibles factores que pueden explicar las respuestas observadas en la etapa de regeneración están:

- a. El sílice es absorbido naturalmente como  $\text{H}_4\text{SiO}_4$  ó  $\text{Si}(\text{OH})_4$  y no como  $\text{SiO}_2$  incorporado a la solución de silicato de potasio ( $\text{K}_2\text{SiO}_4$ ) utilizada en el experimento.
- b. Bajo la forma  $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$  no es móvil en los tejidos vegetales por lo que no se distribuye en la planta. Además, en el callo la absorción es pasiva.
- c. Se ha determinado que la retención de sílice está relacionada con altas condiciones de luminosidad, por lo tanto en callogénesis la absorción sería nula.
- d. El alto pH obtenido en los medios de cultivo hizo necesaria una mayor adición de HCl 1N para obtener un pH de 5.8. Se podría estimar que la adición de un exceso de HCl originó una toxicidad por cloro.
- e. La absorción de sílice estimula una mayor absorción de fósforo, por lo que también pudo provocar una toxicidad por exceso de este nutriente (Salisbury y Ross, 1992).
- f. El sílice incrementa la disponibilidad fisiológica del zinc y reduce la absorción de calcio en arroz (Takahashi, 1995).

- g. El sílice podría resultar tóxico para las células en estado embrionario, convirtiéndose en un factor determinante en la necrosis observada posteriormente.

Como se mencionó anteriormente, uno de los principales problemas en durante el experimento con sílice fue el nivel de necrosis, la cual depende de factores como las condiciones ambientales y el estado del explante inicial, que, en este caso fueron semillas con embriones cigóticos maduros. La necrosis se puede deber a la liberación de polifenoles, que causan toxicidad al explante.

Otra posibilidad es que el medio de cultivo utilizado para arroz tipo Indica aún no está optimizado. Los medios de cultivo utilizados para el cultivo *in vitro* de las variedades de arroz contienen sulfato de amonio como fuente de nitrógeno, ya que la adición de iones amonio en combinación con nitrato generalmente “incrementa el porcentaje de crecimiento de células en cultivo”. Sin embargo, Ogawa (2000) señala que el sulfato de amonio inhibe el crecimiento de callos de la variedad Koshihikari (tipo japónica).

Quizá los niveles de iones nitrito estén involucrados con el alto porcentaje de necrosis obtenidos durante el ensayo. Ogawa (2000) determinó la correlación del contenido de iones nitrito ( $\text{NO}_2^-$ ), la actividad de la nitrito reductasa y la actividad de la nitrato reductasa con el porcentaje de crecimiento de callos en variedades como Nipponbare, Koshihikari (japónicas) e IR-24 (indica), por lo que se ha utilizado medios de cultivo con una fuente reducida de nitrato ( $\text{KNO}_3$ ) y sin sulfato de amonio, complementado con aminoácidos como alanina y prolina como fuente de nitrógeno, y 0.3% de maltosa con el fin de determinar el efecto del medio cultivo en la proliferación de callos en las variedades antes mencionadas. Estas modificaciones mejoraron la fase de crecimiento de los callos de IR-8, variedad madre de la mayoría de las líneas indicas utilizadas en Latinoamérica, incluidas todas las variedades costarricenses.<sup>2</sup>

---

<sup>2</sup> Muñoz, M. 2001. Variedades de arroz en Costa Rica. Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica. Comunicación personal.

Este ensayo determinó que cuando la actividad de la nitrito reductasa es baja y la actividad de la nitrato reductasa es alta, la concentraciones de iones nitrito en los tejidos es alta, observándose un escaso desarrollo de callos. Por otra parte, se ha relacionado la cantidad de ácido abscísico (ABA) presente en los callos y en los medios de cultivo con la capacidad de regeneración de los mismos, ya que en cultivo de tejidos el ABA se utiliza para aumentar la frecuencia de regeneración y se tiene la hipótesis de que altas concentraciones endógenas de este regulador del crecimiento promueven una bajo porcentaje de callogénesis, pero una habilidad de regeneración alta para variedades tipo IR-24 (Ogawa, 2000).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La incorporación de sílice no mejora el proceso de inducción de callo, pero podría ser beneficioso en etapas posteriores como enraizamiento y aclimatación. Sin embargo, esta posibilidad debe ser documentada debidamente.
- El porcentaje de callogénesis para la variedad CR-5272 en medios sin suministro de sílice es elevado en comparación a CR-1113 y CR-1821, demostrando el efecto del genotipo en los procesos de morfogénesis *in vitro*.
- En la fase de callogénesis, la necrosis fue un factor observado muy poco, debido a la ausencia de agentes oxidantes que generaran toxicidad. No obstante en regeneración está aumentó considerablemente, lo cual pudo deberse a un desequilibrio en la absorción de algunos de los principales nutrientes, como el calcio, el fósforo y el zinc.
- Dado a sus posibles efectos positivos en los sistemas de cultivo *in vitro*, es de importancia mejorar los métodos de investigación con sílice, ya que debido a su abundancia se encuentra como agente contaminante en muchas soluciones.

## RECOMENDACIONES

Entre las sugerencias están:

- Utilizar menores concentraciones de sílice, ya que se debe considerar que en el cultivo *in vitro* se requieren menores concentraciones de los nutrientes, dada la disponibilidad y movilidad de los nutrientes.
- Evaluar su uso en etapas de enraizamiento y aclimatación, debido a que la absorción se realizaría vía raíz de forma activa.
- El sílice es importante en los procesos fisiológicos y desarrollo de la planta por lo tanto, no debería usarse en la etapa de callogénesis.
- Utilizar otros compuestos diferentes al silicato de potasio ( $\text{KSiO}_2$ ) como fuente de sílice, los cuales sean de mayor movilidad y absorción, y que su pH oscile entre los 5 y 6.5.
- Realizar ensayos con medios de cultivo donde las fuentes de nitrógeno (nitrato de potasio y sulfato de amonio) sean sustituidas por aminoácidos como alanina y prolina, para mejorar las condiciones de crecimiento de callo y regeneración.
- Evaluar la metodología propuesta por Ogawa (2000) adaptado a las variedades costarricenses, reduciendo la concentración de maltosa a 0.3%, ya que altas concentraciones de azúcar están relacionadas con un alta actividad de la nitrato reductasa.

# **CAPÍTULO II**

**EXPOSICIÓN TRANSITORIA DE CALLOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A LA LUZ Y A LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO DURANTE LA FASE DE PRE- REGENERACIÓN**

## ANTECEDENTES

Durante el cultivo *in vitro* ocurren una serie de complejas interacciones entre los *parámetros físicos* (temperatura, regímenes de luz, ambiente gaseoso dentro del recipiente de cultivo) y la *composición química* del medio de cultivo (cantidad y disponibilidad de carbohidratos, vitaminas y aminoácidos), las cuales determinan el potencial morfogénico de los explantes y están relacionadas con la fisiología del cultivo donante (Jiménez, 2000).

Los reguladores del crecimiento vegetal tienen un papel importante en los procesos *in vitro*. Frecuentemente se observa que en un mismo explante se presentan células embriogénicas y no embriogénicas, lo cual significa que células idénticas genéticamente responden diferente a estímulos específicos, como los niveles de reguladores del crecimiento tanto endógenos como exógenos (Jiménez, 2000). No obstante otros factores son importantes en la embriogénesis somática; se ha determinado que cambios en la fuente de carbono de sacarosa a glicerol en *Citrus*; la concentración de iones  $\text{NH}_4^+$  y cambios de pH en los medios de cultivo de zanahoria, así como las proteínas secretadas al medio (Gavish *et al.*, 1994; Smith y Krikorian 1992 citados por Jiménez, 2000).

Las principales variables que afectan la rediferenciación de los callos de arroz en plántulas son el tiempo de subcultivo y la composición del medio de cultivo, especialmente reguladores del crecimiento (Tsukahara y Hirosawa, 1992 y Mitsuoka *et al.*, 1994). Por lo tanto, cualquier respuesta morfogénica *in vitro* está determinada por la intensidad de un estímulo (concentración de reguladores del crecimiento) y la duración del mismo (período de subcultivo).

En monocotiledóneas la embriogénesis es inducida utilizando auxinas como promotores de la desdiferenciación celular, ya que se tiene la hipótesis de que su presencia genera un cambio en la expresión de los genes al incrementar la demetilación del ADN, por lo que, en las células pro-embriónicas se encuentra ARNm y otras proteínas que generalmente inhiben la continuación del programa embriónico. Por consiguiente, al eliminar la auxina de los medios de cultivo se inactivan una serie de genes, permitiendo que el proceso continúe (Jiménez, 2000), y posteriormente se promueve el desarrollo del embrión mediante la adición de citoquininas durante la regeneración (figura 1).

Generalmente en arroz el período de obtención de callo a partir de embriones cigóticos maduros dura entre dos y cuatro semanas, y se utilizan períodos de regeneración de tres a ocho semanas, donde el suministro tanto de citoquininas como auxinas es continuo. Sin embargo puede ser que la presencia constante de citoquininas esté inhibiendo la germinación de los embriones somáticos a largo plazo y debido a ello los porcentajes de regeneración sean bajos.

Otro factor de importancia es la luz. En *Arabidopsis thaliana* y *Cydonia oblonga* Mill. (membrillo) se ha estudiado la relación entre la calidad de la luz (tipo) y la embriogénesis somática con la finalidad de atribuir funciones específicas a las diferentes longitudes de onda del espectro, ya que se ha considerado de interés obtener información acerca de la posible correlación de los fotorreceptores en la inducción o modificación de los procesos de embriogénicos *in vitro* (Kaldenhoff *et al.*, 1994 y D'Onofrio *et al.*, 1998).

Estos estudios determinaron que condiciones de luz roja promueven un alto nivel de producción de embriones somáticos, ya que se asocian a los más altos niveles de fotoequilibrio (0.86). A su vez, se observó un decrecimiento progresivo con la transición a condiciones de luz blanca y azul, debido a que ejercen un efecto adverso (disminuyendo la producción de embriones), sugiriendo la influencia de los fitocromos en la embriogénesis (D' Onofrio *et al.*, 1998). No obstante, también se debe considerar la intensidad del estímulo lumínico (Michler y Lineberger, 1987 y Newcom y Wetherell, 1970; mencionados por D' Onofrio *et al.*, 1998). Por lo tanto es necesario determinar el período mínimo para que un estímulo como el suministro de reguladores del crecimiento y la condición lumínica produzca el efecto esperado.

## OBJETIVO GENERAL

- Determinar el efecto de la luz y del tiempo de exposición de callos de arroz a los reguladores del crecimiento en las etapas de pre- regeneración y regeneración.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Evaluar la respuesta de los callos a tres condiciones lumínicas durante la etapa de pre- regeneración.
- Determinar el período óptimo de exposición de los callos a los reguladores del crecimiento para estimular el proceso de regeneración.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Establecimiento *in vitro*.** Se utilizaron embriones maduros de *Oryza sativa* L. variedad CR-5272 provenientes del Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica para inducir la formación de callos. Para el establecimiento *in vitro* se siguió el protocolo desarrollado por el CIBCM, el cual consiste en una desinfección superficial de las semillas sin testa con NaOCl (3.5% i.a.) + Tween 20 (Sigma) por 20 minutos en agitación, seguido de tres lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Posteriormente se vuelven a sumergir en NaOCl (3.5% i.a.) + Tween 20 (Sigma) por 20 minutos en agitación constante. Finalmente se realizan cinco lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar y se inocularon de 10 a 15 semillas por plato petri.

**2. Inducción de Callogénesis.** Se indujo la formación de callo según Valdez *et al.* (1996), cultivando 15 semillas previamente esterilizadas en medios de cultivo MIC (apéndice 2).

**3. Regeneración de los Callos.** Callos de cuatro semanas de formación se subcultivaron en medios de regeneración (MSKA y MSR; apéndice 2) variando el tiempo de cultivo que permanecieron los callos en tres condiciones lumínicas (figura 5). Las variables a analizar fueron: necrosis, número de callos verdes, número de plantas regeneradas y callos con raíces.

Identificación del Tratamiento						
1	2F/2D	Luz Difusa	Luz Difusa	Luz Directa	Luz Directa	
2	1O/2D	Oscuridad	Luz Directa	Luz Directa		
3	2O/1D	Oscuridad	Oscuridad	Luz Directa		
4	3O	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad		
5	2O/2D	Oscuridad	Oscuridad	Luz Directa	Luz Directa	
6	3O/2D	Oscuridad	Oscuridad	Oscuridad	Luz Directa	Luz Directa
7	1F/2D	Luz Difusa	Luz Directa	Luz Directa		
8	2F/1D	Luz Difusa	Luz Difusa	Luz Directa		
9	3F	Luz Difusa	Luz Difusa	Luz Difusa		

Simbología:

	Etapa de Pre- Regeneración
	Etapa de Regeneración

*Numeral:* número de semanas

Intensidad lumínica:

**O:** Oscuridad = 0 Lux

**F:** Luz Difusa =  $592 \pm 2.76$  Lux

**D:** Luz Directa =  $2067 \pm 17.49$  Lux

**Figura 5.** Esquema de los tratamientos establecidos para determinar el efecto de los reguladores del crecimiento y las condiciones lumínicas en la regeneración. (Nota: cada cuadro equivale a una semana de cultivo.) CIBCM, 2000.

**4. Estudio Morfogénico del Cultivo.** Durante este ensayo se realizó un estudio morfogénico del proceso, con la finalidad de determinar los estadios de desarrollo de los embriones somáticos durante las diferentes fases del cultivo *in vitro*. Se tomaron muestras al azar para cada fase y se analizaron a través de un estereoscopio "Optima". Posteriormente, las imágenes se capturaron mediante el programa "BioVid™, versión 3.0 para Windows®".

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Regeneración de los callos

El protocolo frecuentemente utilizado para la regeneración *in vitro* de arroz por embriogénesis somática incluye una etapa de pre-regeneración durante un período de dos semanas bajo un régimen de luz difusa y posteriormente, el subcultivo de los callos a medios de regeneración a luz directa hasta la obtención de las vitroplántulas, subcultivándolos a medio fresco cada tres semanas con la finalidad de mantener una fuente continua de los reguladores. Para mejorar este proceso se estudió el efecto de diferentes regímenes de luminosidad y en las etapas de pre-regeneración y regeneración. En el cuadro 4 se observan los resultados obtenidos. La prueba comparación de medias de Tukey indicó que sólo hubo diferencias significativas entre las medias para la variable callos con zonas verdes.

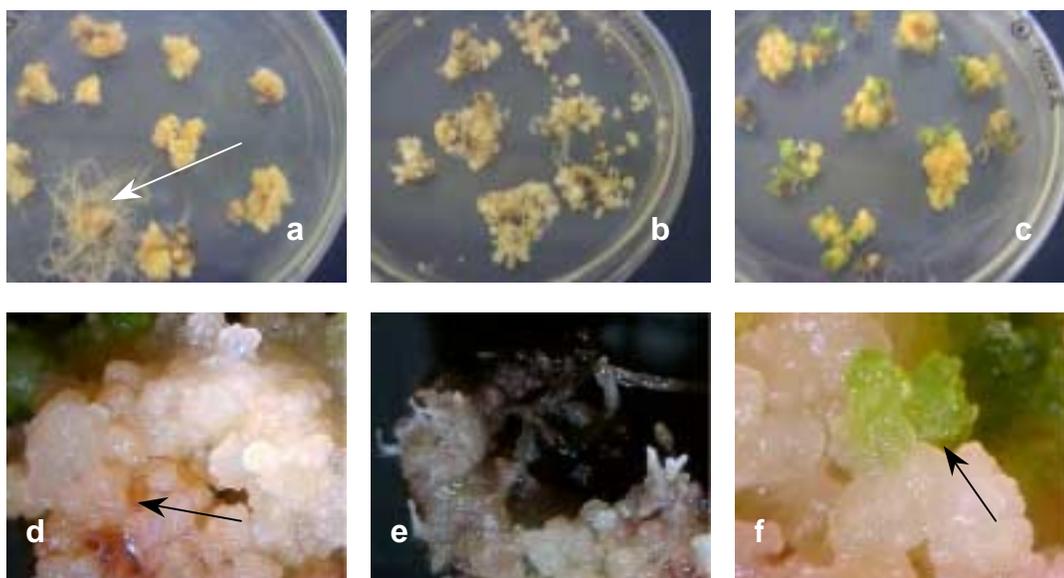
**Cuadro 4.** Porcentaje de plantas regeneradas, callos con zonas verdes, callos necrosados y callos con presencia de raíces a las cuatro semanas de cultivo en medios de regeneración. CIBCM. 2001.

Tratamiento	Plantas regeneradas	Callos con zonas verdes	Callos necrosados	Callos con raíces
1 2F/2D	3 % a <sup>3</sup>	86 % a	11 % a	2 % a
2 1O/2D	13 % a	85 % a b	13 % a	2 % a
3 2O/1D	0 % a	53 % a b	2 % a	2 % a
4 3O	0 % a	0 % c	8 % a	6 % a
5 2O/2D	11 % a	65 % a b	9 % a	0 % a
6 3O/2D	0 % a	48 % a b	9 % a	2 % a
7 1F/2D	11 % a	74 % a b	9 % a	0 % a
8 2F/1D	4 % a	63 % a b	19 % a	0 % a
9 3F	2 % a	29 % b c	2 % a	0 % a

Fuente: datos de laboratorio.

<sup>3</sup> No hay diferencia significativa ( $\alpha=95\%$ ) entre los tratamientos con las misma letra.

En la figura 6 algunos se presentan algunos de los eventos observados durante el ensayo de exposición transitoria.



**Figura 6.** Diferentes eventos que se presentaron durante el ensayo de exposición transitoria a los reguladores del crecimiento y la luz. a) callo con alta presencia de raíces; b) callos no embriogénicos en medios de regeneración; c) regeneración de vitroplantulas; d) callo con necrosis parcial (A: 4x); e) callo necrosado totalmente (A: 4x); f) callo con presencia de zonas verdes no regenerables (A: 4x). CIBCM, 2001.

El porcentaje de plantas regeneradas en el control fue de 3%, mientras que en los ensayos donde se redujo el período de cultivo en pre-regeneración a sólo una semana fue de 13 % (tratamiento 2) y 11 % (tratamiento 7), por lo que se sugiere que el estrés osmótico originado por una alta concentración de gelificante en el medio de cultivo resulta inhibitorio durante el proceso de germinación de los embriones somáticos. No obstante, varios autores recomiendan promover el estrés en callos de arroz mediante el uso de altas concentraciones de azúcares y gelificantes (Tsukahara y Hirosawa, 1992; Jain, 1997; Al-Khayri *et al*, 1996). Además no se obtuvo diferencia entre mantener los cultivos a la luz difusa o a la oscuridad durante una semana, ya que para ambos tratamientos se presentó un alto porcentaje de callos con puntos verdes (85 % en la oscuridad y un 74 % para luz difusa) y similar porcentaje de plantas regeneradas (13 % y 11 % respectivamente).

En el tratamiento 5 (2O/2D) también se presentó un 11 % de regeneración, sin embargo, dado que el período de cultivo no fue minimizado, se tiene una baja presencia de callos con zonas verdes y el porcentaje de callos necrosados es alto, no representa uno de los mejores tratamientos para la obtención de vitroplantas.

Los callos que se mantuvieron a la oscuridad en la fase de pre- regeneración, durante la fase de regeneración no presentaron indicio alguno de regeneración, ya que los callos tomaron una coloración blanquizca y consistencia friable conforme avanzó el tiempo de cultivo. Se sabe que la presencia de luz es un evento promotor de la producción de embriones somáticos (D' Onofrio *et al.*, 1998), por consiguiente, durante esta fase se activaron mecanismos de rizogénesis, observándose una elevada producción de raíces con respecto a los demás tratamientos.

### **Estudio morfogénico del proceso**

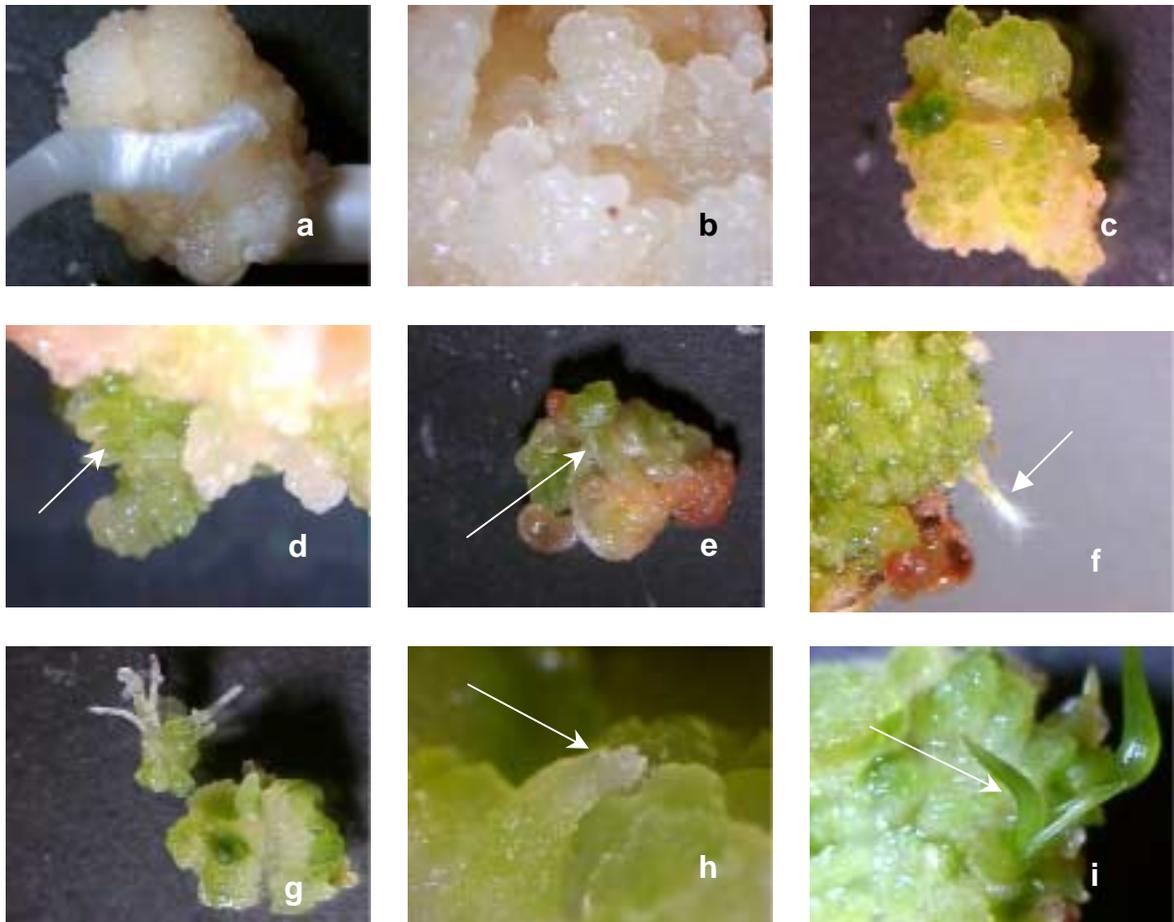
En estudios previos se determinó que durante la fase de inducción se da una alta frecuencia de formación de callos con células embriogénicas a partir de semillas del cultivar CR-5272 cultivadas en medios MIC. No obstante, el proceso de diferenciación en tejidos especializados ocurre en muy baja frecuencia (de 0 % a 13 %), a pesar de que se obtienen porcentajes altos de callos con zonas verdes que oscilan desde un 48 % hasta un 86 %, los cuales no desarrollan las plantas (Vega, 1996).

En la figura 7 se presentan los diferentes estadios de desarrollo de un embrión durante en cultivo *in vitro* producido por la técnica embriogénesis somática indirecta. Durante la fase de callogénesis se observó un alto número de embriones, los cuales perdieron su capacidad regenerativa cuando fueron sometidos al proceso de regeneración debido a circunstancias que aún no han sido bien dilucidadas. Una posible causa podría ser la presencia de la auxina sintética 2,4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) en las células embriogénicas<sup>4</sup>.

---

<sup>4</sup> Flores, D. 2001. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Comunicación personal.

El 2,4-D es un herbicida utilizado para la clonación de plantas vía organogénesis indirecta (mediante la formación de callo) y se ha determinado que la frecuencia de rediferenciación en arroz es inversamente proporcional a la concentración intercelular de 2,4-D al inicio de la fase de regeneración, o sea probablemente trazas de este regulador del crecimiento ejercen un efecto inhibitorio de la germinación *in vitro* (Mitsuoka *et al.*, 1994).



**Figura 7.** Proceso de embriogénesis somática indirecta en arroz (*Oryza sativa* L var. CR-5272). a) desarrollo de callo a partir del escutelo (A: 4x); b) callo embriogénico (A: 10x); c) callo en fase de pre-regeneración (A: 4x); d) embriones somáticos en estado globular (A: 10x); e) embrión somático en estado de torpedo tardío (A: 10x); f) diferenciación en una zona radical (A: 10x); g) formación de raíz (A: 4x); h) diferenciación en una zona apical (A: 10x); i) vitroplántula de arroz (A: 10x). CIB, 2001.

Otro factor a considerar es el genotipo, ya que se ha determinado que las variedades de arroz tipo Indica son recalcitrantes en el cultivo *in vitro* (Al-Khayri *et al.*, 1996, Jain *et al.*, 1996, Ogawa, 2000 y Chowdhry *et al.*, 1993).

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- Aunque se incrementó el número de plantas regeneradas, el proceso aún no es eficiente, por lo que es necesario investigar otros factores que influyen en el cultivo *in vitro* de la variedad CR-5272, como el uso de osmoreguladores y el tipo de longitud de onda apropiada.
- Períodos cortos de una semana en pre- regeneración aumentan la regeneración de plantas, reduciendo a la vez el tiempo de cultivo.
- La luz es un factor importante en la producción de embriones somáticos, ya que influye directamente en el proceso, induciendo la activación de los mecanismos de morfogénesis de los embriones somáticos.
- La rizogénesis es estimulada por la permanencia en los callos del 2,4-D y su exposición a la oscuridad, debido a que un suministro continuo de ambas variables induce la formación de raíces.
- Los altos porcentajes de callos con zonas verdes indican que los procesos fotosintéticos (síntesis de clorofila) inician al ser expuestos los callos a un estímulo lumínico. Sin embargo se necesita más que este estímulo para activar los procesos de morfogénesis.

## RECOMENDACIONES

Entre las sugerencias están:

- Evaluar el efecto de diferentes longitudes de onda y tiempos de exposición en la embriogénesis somática en arroz, dado que se informa que exposiciones de callos a la luz rojo lejano produce un efecto positivo en la frecuencia de regeneración.
- Realizar pruebas de viabilidad a los tejidos durante el proceso de cultivo *in vitro*, con el fin de determinar su estado fisiológico.
- Determinar el número y tiempo de subcultivo apropiado para que los embriones formados en la fase de inducción mantengan su capacidad de regeneración.
- Cultivar los callos en medios de cultivo libres de reguladores por una semana antes de iniciar la fase de regeneración para eliminar los posibles “residuos tóxicos” de la auxina promotora de callogénesis (2,4-D), dado a que se ha informado a cerca del efecto inhibitorio que ejerce en la regeneración de los callos de arroz.

# **CAPÍTULO III**

**EFFECTO DE LA CONCENTRACIÓN DE LA AUXINA 2,4-D Y EL AGENTE GELIFICANTE (Phytigel™) EN LA REGENERACIÓN *in vitro* DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)**

## ANTECEDENTES

Actualmente se tiene el conocimiento de que además del efecto del genotipo, existen otros factores del medio de cultivo determinantes en la regeneración de vitroplantas por embriogénesis somática en arroz, ejemplo de ello es la concentración del agente gelificante, la osmolaridad y la combinación de los reguladores del crecimiento (Tsukahara, y Hirosawa, 1992; Jain, 1997).

Las hormonas vegetales conocidas como *auxinas* constituyen cuatro compuestos derivados del triptófano y que son sintetizados naturalmente en las plantas: el ácido indol-acético (AIA), el ácido indol-butírico (AIB), el ácido fenilacético (APA) y el ácido 4-cloroindolacético (4-cloroAIA). Sin embargo, existen compuestos sintéticos que causan respuestas fisiológicas comunes a las auxinas naturales, por lo que son considerados como reguladores del crecimiento vegetal, entre ellos el ácido naftalenacético (ANA) y el 2,4- diclorofenoxiacético (2,4-D) (Salisbury y Ross, 1992).

Las auxinas estimulan la producción de etileno en muchos tipos de células vegetales *in vivo*, y ello ha sido relacionado con la inhibición de la elongación de raíces, por lo que no se debe descartar la posibilidad de que el uso de cantidades relativamente elevadas de auxinas durante el cultivo *in vitro* genere el mismo efecto. Otra función de las auxinas es la de promover la dominancia apical, donde la yema apical ejerce una fuerza inhibitoria sobre las yemas laterales, impidiendo o retardando su desarrollo. Además se ha comprobado que el 2,4-D y el ANA poseen una alta fitotoxicidad por lo que son eficaces como herbicidas (especial contra dicotiledóneas), ya que se cree que estos compuestos alteran tanto la transcripción del ADN de las enzimas necesarias para coordinar el crecimiento no se producen adecuadamente (Weaver, 1976; Salisbury y Ross, 1992).

Las *citoquininas* constituyen otro grupo de reguladores del crecimiento de importancia para las plantas. Se caracterizan por ser compuestos derivados de adenina, que promueven la división de células en sistemas de cultivo de tejidos estimulando la transición de la fase G2 a mitosis, mediante el incremento en la rapidez de síntesis de proteínas, o sea, actúan en el citosol a nivel traduccional. Se sabe que las citoquininas tienen un efecto promotor en la síntesis de ARN y enzimas, ya que su efecto se ve bloqueado por inhibidores de la síntesis de ambos, y aunque la adición de citoquininas exógenas con frecuencia promueve la división celular, no se ha reportado algún efecto específico en la síntesis de ADN (Salisbury y Ross, 1992).

Las citoquininas y auxinas son utilizados como promotores de la desdiferenciación de estructuras organizadas, siendo la auxina sintética 2,4-D la más efectiva a concentraciones de  $10^{-5}$  a  $10^{-7}$  M (Endress, 1994) y en cereales es el regulador del crecimiento más comúnmente utilizado para la obtención de callos<sup>5</sup>, ya que la inducción de callos embriogénicos está caracterizada por un alto nivel de actividad mitótica en las células que son sensibles a este regulador y además es importante para mantener callos indiferenciados (Jiménez, 2000).

Sin embargo, la presencia de altas concentraciones de 2,4-D en los embriones somáticos ejerce un potente efecto inhibitorio en la regeneración de vitroplantas, por lo que varios autores han recomendado tres acciones para estimular la diferenciación de embriones somáticos (Mitsuoka *et al.*, 1994; Endress, 1994 y D' Onofrio *et al.*, 1998):

- a) reducir su concentración en el medio de cultivo
- b) sustituirla por una auxina menos potente (como por ejemplo ANA)
- c) cultivar los embriones en medios libres de reguladores del crecimiento

---

<sup>5</sup> Masa de células poliploides no especializadas (Salisbury y Ross, 1992).

Es importante considerar que una de las principales funciones de las citoquininas es promover la división celular, por lo que al incluir una citoquinina a los medios de cultivo se promueve en gran medida la citocinesis. Esto se realiza de forma efectiva cuando se tiene una relación alta de citoquinina/auxina, dando como resultado la producción de células meristemáticas en el callo, las cuales se dividen y generan otras que se desarrollan para formar yemas, tallos, hojas y raíces (Salisbury y Ross, 1992).

Entre los mecanismos utilizados para promover la regeneración de vitroplantas a partir de callos está el de promover estrés osmótico al explante mediante el uso de poliaminas, azúcares, NaCl, deshidratación de los callos y agentes gelificantes. En arroz se ha informado que la colocación de callos con bajo contenido de agua en un medio con manitol y alta concentración de agente gelificante incide directamente en la eficiente regeneración (Al-Khayri *et al.*, 1996 y Jain *et al.*, 1997).

Los gelificantes son incorporados a los medios de cultivo para formar una matriz que permita la inoculación de los explantes sobre una superficie semi- sólida. Entre los más utilizados para el cultivo de tejidos vegetales está el PhytageI™ (SIGMA) debido a que produce un gel claro e inoloro y de alta resistencia; está compuesto de ácido glucorónico, ramnosa y glucosa y contiene un 0.69% de calcio, 0.22% de magnesio y 0.82% de sodio (SIGMA, 1999).

En el proceso de cultivo *in vitro* de arroz se emplea una etapa de pre- regeneración en la cual los callos son cultivados en medios de regeneración pero con doble concentración de agente gelificante de la que se utiliza regularmente en el laboratorio (apéndice 2). Esto se realiza con la finalidad de promover un estrés hídrico, ya que se informa que plantas estresadas debido a un faltante de agua muestran una alta biosíntesis de ABA (ácido abscísico), aumentando el contenido de este regulador del crecimiento en los embriones y por ende promoviendo la embriogénesis somática. Sin embargo la reducción del contenido de agua no es suficiente para la estimulación de la regeneración y por ello se deben adicionar al medio otros estimulantes como son el ANA y la kinetina (Xu *et al.*, 1995, Tsukahara y Hirose, 1992 y Jain, 1997).

El planteamiento sugerido es que una disminución en la densidad de los medios de cultivo, permitirá reducir la concentración de 2,4-D; obteniendo altos porcentajes de calogénesis y frecuencias de regeneración.

## OBJETIVO GENERAL

- Evaluar el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y agente gelificante en la inducción de callos y su efecto en la fase de regeneración.

## OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar la densidad de los medios de cultivo según la concentración de Phytigel™ utilizada.
- Inferir sobre la velocidad y movilización de los nutrientes hacia el explante según la densidad del medio de cultivo.
- Determinar las concentraciones mínimas de 2,4-D y Phytigel™ para una efectiva inducción de callo embriogénico.
- Evaluar la regeneración de vitroplantas a partir de callos producidos en medios con bajas concentraciones de 2,4-D.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**1. Establecimiento *in vitro*.** Se utilizaron embriones maduros de *Oryza sativa* L. variedad CR-5272 provenientes del Centro de Investigación en Granos y Semillas (CIGRAS) de la Universidad de Costa Rica para inducir la formación de callos. Para el establecimiento *in vitro* se siguió el protocolo desarrollado por el CIBCM, el cual consiste en una desinfección superficial de las semillas sin testa con NaOCl (3.5% i.a.) + Tween 20 (Sigma) por 20 minutos en agitación, seguido de tres lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar. Posteriormente se vuelven a sumergir en NaOCl (3.5% i.a.) + Tween 20 (Sigma) por 20 minutos en agitación constante. Finalmente se realizan cinco lavados con agua destilada estéril en la cámara de flujo laminar y se inocularon de 10 a 15 semillas por plato petri.

## 2. Movilidad de los nutrientes a través del medio de cultivo.

**2.1. Determinación de la densidad.** *Se determinó la densidad de los medios de cultivo según la concentración (expresada en gramos de Phytigel™ por litro de medio de cultivo) usada para gelificar, a fin de obtener un resultado más preciso y exacto sobre la elasticidad del gel y a su vez inferir en la movilidad de los nutrientes debido al efecto de resistencia que se presenta según la cantidad y estado del agente gelificante.*

Se prepararon 250 ml de cada medio de cultivo a utilizar en este ensayo (cuadro 6), se dispensaron en erlenmeyers y se autoclavaron a una temperatura de 121° C. En cámara de flujo laminar se dispensaron 25 ml de medio de cultivo en probetas esterilizadas previamente. Con una balanza y un Bernier se midió la masa y la altura, respectivamente, en tres períodos diferentes: al dispensar el medio (aún sin gelificar), una hora y 12 horas después de haberse dispensado, con el fin de poder hacer corrección de los resultados por efecto de la temperatura. Se midió el radio de cada probeta para calcular el volumen de cada recipiente mediante la fórmula:

$$V = \pi r^2 l, \text{ donde} \quad \begin{array}{l} r: \text{radio de la probeta} \\ l: \text{altura del medio de cultivo} \end{array}$$

Con los valores obtenidos se calculó la densidad de cada medio de cultivo, utilizando la fórmula:

$$d = m / V, \text{ donde} \quad \begin{array}{l} d: \text{densidad} \\ m: \text{masa del medio de cultivo} \\ v: \text{volumen del medio de cultivo} \end{array}$$

Para verificar los resultados obtenidos mediante el método directo descrito anteriormente se implementó una prueba indirecta sencilla. Ésta consistió en cortar secciones de 1 cm<sup>2</sup> de cada gel evaluado y agregarlas en recipientes que contenían soluciones de densidad conocida.

Según los valores obtenidos con el primer método se escogieron soluciones patrón, el agua ( $d= 1 \text{ g/cm}^3$ ) y glicerol ( $d= 1,26 \text{ g/cm}^3$ ). Se observó el comportamiento de una sección de medio de cultivo en cada solución, esto es, si flotó (implica que es menos denso que la sustancia) o si se hundió (es más denso que la sustancia).

**2.2. Difusión de Sulfato de Cobre ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$ ). Se preparó medio de cultivo MIC (apéndice 2) con seis diferentes concentraciones de Phytigel™ (cuadro 5) y se dispensaron alícuotas de 30 ml en tubos de ensayo. Se autoclavó a una temperatura de  $121^\circ \text{ C}$  y se dejó enfriar a temperatura ambiente.**

**Cuadro 5.** Prueba de difusión con  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$  en medios de cultivo con diferentes concentraciones de agente gelificante. CIB, 2001.

		Concentración de Phytigel™ ( $\text{gL}^{-1}$ )					
		1.8	2.4	3.0	3.6	4.8	6.0
Concentración $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	10 %	1	2	3	4	5	6
	20 %	7	8	9	10	11	12
	30 %	13	14	15	16	17	18

Nota: Cada tratamiento constó de 3 repeticiones.

Se prepararon soluciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre pentahidratado) a concentraciones de 10% (m/v), 20% (m/v) y 30% (m/v). Posteriormente a cada tubo se le agregaron 2 ml de cada solución (cuadro 8). Utilizando una cinta de papel milimétrico adherida a cada tubo se midió el avance de la solución (de color azul) a través del medio. El avance se evaluó a las 0, 3, 6, 9, 24 y 48 horas después de agregada la solución.

### 3. Efecto de la concentración de Phytigel™ y el 2,4-D en regeneración

**3.1. Ensayo preliminar.** Para observar la respuesta de los explantes, se inoculó semilla desinfectada en medios de cultivo MIC (apéndice 2) con tres concentraciones de agente gelificante (Phytigel™) (cuadro 6). A su vez se utilizó Phytigel™ proveniente de dos lotes diferentes, que corresponde al utilizado en el Centro de Investigación en Biotecnología del Instituto Tecnológico de Costa Rica y en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica, al momento de realizar los ensayos. A las cuatro semanas se observó la respuesta de los explantes según cada tratamiento.

**Cuadro 6.** Concentraciones y fuente de Phytigel™ utilizados para establecer preliminarmente el efecto del agente gelificante en la inducción de callogénesis. CIB, 2001.

Ensayo preliminar		Concentración de Phytigel™ (gL <sup>-1</sup> ) en los medios de cultivo		
		1.8	2.3	3.0
Fuente	CIB	1	2	3
	CIBCM	4	5	6

**3.2 . Inducción de callogénesis.** A partir de los resultados obtenidos en el ensayo preliminar se estableció el procedimiento para evaluar el efecto de la concentración del agente gelificante y de la auxina 2,4-D en la regeneración de vitroplantas de arroz (*Oryza sativa* L. var CR-5272). Se evaluaron 12 tratamientos, cada uno consistió de 5 repeticiones con 17 semillas inoculadas por repetición (cuadro 7). A las 4 semanas se evaluó el número de callos necrosados, el número de callos con raíces, el número de plantas formadas y el porcentaje de callogénesis.

**Cuadro 7.** Concentraciones de Phytigel™ y 2,4-D evaluadas en la etapa de callogénesis de arroz. CIB, 2001.

I. Etapa de Callogénesis		Concentración de Phytigel™ (gL <sup>-1</sup> )		
		1.8	2.3	3.0
Concentración de 2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	0.5	1	2	3
	1.0	4	5	6
	1.5	7	8	9
	2.0	10	11	12

**3.3 . Regeneración de vitroplantas.** Para evaluar la incidencia de la concentración del agente gelificante y de la auxina 2,4-D en la obtención de vitroplantas, los mejores callos obtenidos en los tratamientos 7, 8 y 12 fueron subcultivados en medios para regeneración (cuadro 8). Cada tratamiento constó de 40 callos (4 repeticiones de 10 callos cada una). A las siete semanas de subcultivados los callos en medios de regeneración se contó el número de callos con zonas verdes, el número de plantas por callo (frecuencia de regeneración) y el porcentaje de necrosis.

**Cuadro 8.** Medios de cultivo empleados en la regeneración de vitroplantas de arroz. CIB, 2001.

II. Etapa de Regeneración	Medio de Cultivo	
	MS sin reguladores del crecimiento	MS + 2 mgL <sup>-1</sup> Kin + 0.5 mgL <sup>-1</sup> ANA
Tratamiento	A	B

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### I. MOVILIDAD DE NUTRIENTES A TRAVÉS DEL MEDIO DE CULTIVO

#### *Determinación de la densidad*

Una propiedad fundamental de cualquier sustancia es su densidad, la cual se define como la masa por unidad de volumen ( $d = m/V$ ). La diferencia de densidad entre las sustancias se debe en parte, a sus diferentes pesos atómicos y a la diferencia en los espaciamientos atómicos y en los arreglos atómicos de sus estructuras (Serway, 1992).

Los valores para la densidad cambian ligeramente con la temperatura debido a que esta variable afecta el volumen de una sustancia, y por ende la densidad. Por eso, las mediciones de altura y peso final se realizaron cuando los geles se encontraron a temperatura ambiente ( $23^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ ).

Al determinar la densidad para los medios de cultivo según la concentración del agente gelificante se obtuvo que los medios con  $1.8 \text{ gL}^{-1}$  de gel presentaron una densidad más baja con respecto a los medios donde se utilizaron concentraciones de  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  y  $3.0 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™ (cuadro 9).

**Cuadro 9.** Valores calculados para la densidad de los medios de cultivo según la concentración de agente gelificante. CIB,2001

Concentración Phytigel™	Densidad Promedio ( $\text{g/cm}^3$ )
$1.8 \text{ gL}^{-1}$	$1.14 \pm 0.08$
$2.4 \text{ gL}^{-1}$	$1.18 \pm 0.22$
$3.0 \text{ gL}^{-1}$	$1.26 \pm 0.13$

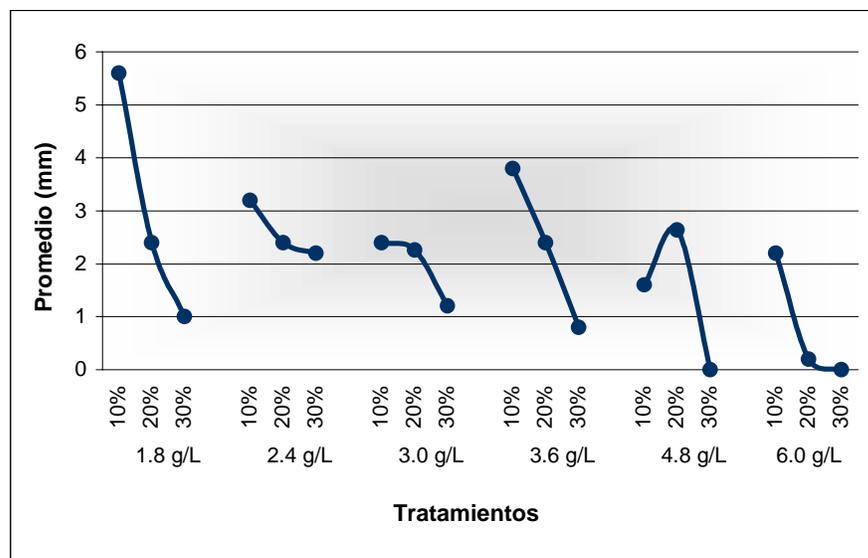
Fuente: datos calculados

Mediante el uso de soluciones de glicerol ( $d = 1.26 \text{ g/cm}^3$ ) y agua ( $d = 1 \text{ g/cm}^3$ ) se demostró que los valores presentados en el cuadro 9, son verdaderos, debido a que todas las secciones se hundieron al ser colocadas en recipientes con agua, lo cual implica que su densidad es mayor que la de esta sustancia. Cuando se agregaron en glicerol se observó que las secciones provenientes de medios con  $1.8 \text{ gL}^{-1}$  y  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™ flotaron dentro de la misma y una pequeña capa de glicerol cubrió las secciones. Para la sección proveniente de medios con  $3 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™ se notó que flotó al mismo nivel, ya que ambas densidades tienen el mismo valor.

Este ensayo permitió determinar que la resistencia que presentan los medios de cultivo con  $3.0 \text{ gL}^{-1}$  es mayor en comparación con las otras concentraciones evaluadas. Por cada  $1 \text{ cm}^3$  de medio de cultivo se tiene una masa de  $1.26 \pm 0.13$  gramos de agente gelificante. Esto implica que el número de partículas (átomos) que forman la matriz es mayor, originando una reducción en el tamaño de los poros formados por el Phytigel™, aumentando la resistencia del gel al flujo de sustancias entre el medio de cultivo y el explante, o sea, la movilidad de los nutrientes disminuye.

### ***Prueba de Difusión con Sulfato de Cobre***

El  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (sulfato de cobre pentahidratado) es un compuesto utilizado comúnmente en la agricultura por presentar actividad funguicida, algicida y bactericida. También se utiliza para preservar madera, como aditivo de comidas y como pigmento en tintas. Su composición consta de 39,81% de cobre, 40,10% de oxígeno y 20,09% de azufre. Es muy soluble en agua, metanol y glicerol y, en ensayos de fisiología vegetal es utilizado para demostrar el efecto de la concentración en la difusión. Debido a sus propiedades físicas y químicas, el  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  no altera significativamente el movimiento de agua, por lo que es idóneo para el estudio de difusión y ósmosis de agua en sistemas biológicos. En la figura 8 se muestra el desplazamiento de la solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  en los 18 tratamientos evaluados. Nótese que se evaluó tanto el efecto de la concentración del gel como de las soluciones de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (de 10% a 30%).



**Figura 8.** Desplazamiento promedio de la solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$  según su concentración y la concentración de Phytigel<sup>TM</sup> utilizada para gelificar los medios de cultivo. CIB, 2001.

Conforme se fue aumentando la concentración de Phytigel<sup>TM</sup> en el medio, se dio una disminución gradual en el desplazamiento de la solución de sulfato de cobre a través del medio de cultivo. Aunado a ello, la movilidad fue menor en los tratamientos donde se utilizó la solución de  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 30 % (más concentrada), por lo tanto se puede inferir que para este tipo de sistemas, tanto la concentración del agente gelificante como de la solución influyen en la velocidad de difusión.

Los callos obtenidos cuando se trabaja con sistemas de embriogénesis somática indirecta (como en arroz) presentan patrones de absorción pasiva de agua, esto es, a favor de un gradiente de energía (Salisbury y Ross, 1992), por lo que nutrientes, reguladores del crecimiento y otros compuestos del medio de cultivo ingresan al explante como resultado del flujo de agua hacia las células del callo. Esto sugiere que cuando se trabaja con medios de cultivo con altas concentraciones de gelificante, la absorción de agua se ve dificultada, reduciéndose proporcionalmente el ingreso de nutrientes en el explante. Como resultado se provoca una baja respuesta del material o bien, el crecimiento y/o desarrollo puede ser lento o nulo.

## II. EFECTO DEL PHYTAGEL™ Y 2,4-D EN LA REGENERACIÓN

### ***Ensayo preliminar***

Para obtener medios de consistencia semi- sólida óptima para el cultivo de tejidos vegetales la casa comercial SIGMA recomienda utilizar de 1.5 a 2.0 g de Phytigel™ por cada litro de solución. No obstante, la escogencia de la concentración adecuada depende del criterio del personal que trabaje con el producto, los fines de la actividad que se este realizando así como el estado del producto.

En los ensayos *in vitro* en arroz que se realizan en la Unidad de Transformación Genética y Cultivo de Tejidos del CIBCM se emplea una concentración de 3.0 gL<sup>-1</sup> de Phytigel™, la cual supera la cantidad recomendada. Debido a ello, se utiliza una concentración relativamente elevada (2.0 a 2.5 mgL<sup>-1</sup>) de la auxina promotora de la callogénesis (2,4-D), lo cual trae consigo un encarecimiento de los costos de producción, la posible inhibición de la regeneración y un aumento en la probabilidad de que ocurran eventos de variación somaclonal.

El ensayo preliminar aportó información de interés con el fin de definir los tratamientos a ejecutar para establecer si la concentración de 2,4-D y Phytigel™ en la fase de callogénesis está relacionada con la frecuencia y efectividad de la regeneración de plantas de arroz. Se utilizó medio MIC (apéndice 2) suplementado con diferentes concentraciones de Phytigel™.

A las tres semanas se evaluaron los tratamientos y se observó que un alto número de semillas inoculadas en medios de cultivo con  $1.8 \text{ gL}^{-1}$  de gelificante no presentaron respuesta callogénica y los pocos callos formados se caracterizaron por ser de color amarillo intenso, muy pequeños y compactos. Con  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™ se produjeron callos color amarillo intenso (similar que con  $1.8 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™) con zonas tanto friables como globulares. Por último, se observó que los callos inducidos en medios con  $3.0 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™ (tratamiento control) eran de color amarillo claro, además se observó que el porcentaje de callogénesis y el tamaño del callo fueron mejores que los obtenidos en los otros tratamientos.

### ***Inducción de callogénesis***

El 2,4-D intracelular es necesario para la formación de callos embriogénicos de arroz, pero afecta negativamente el proceso de rediferenciación de los mismos (Mitsuoka *et al.*, 1994), por lo tanto se prevee que al bajar su concentración en los medios de cultivo MIC (apéndice 2), se podría beneficiar el proceso de regeneración. Sin embargo, al considerar una reducción en la concentración de 2,4-D en el medio de inducción se tomó en cuenta la concentración del agente gelificante, debido a que estudios de difusión realizados previamente determinaron que la concentración de gelificante en el medio de cultivo influye en la movilidad y disponibilidad de los componentes del medio hacia los explantes.

En el campo de la nutrición mineral se ha establecido que para cada elemento absorbido por una planta *in vivo* se encuentran diferentes requerimientos cuantitativos a nivel tisular, los cuales se comportan de forma sigmoidal (Salisbury y Ross, 1992 y Muñoz, 1998). Al analizar el comportamiento se distinguen cuatro zonas:

- *Zona de deficiencia*: donde el crecimiento aumenta rápidamente al ingresar una sustancia.
- *Zona de concentración crítica*: cuando la concentración presente en el tejido estimula un crecimiento de aproximadamente 90%, y un incremento en la concentración no afecta el crecimiento de forma apreciable.
- *Zona de concentración adecuada*: en la cual se da un consumo extra de la sustancia y ésta es almacenada.

- *Zona de toxicidad:* donde un incremento continuo produce toxicidad y baja de crecimiento.

Este mismo patrón de comportamiento podría presentarse para la absorción de nutrientes en sistemas *in vitro*, por lo que es importante determinar los posibles niveles o zonas de absorción de los nutrientes minerales así como de los reguladores del crecimiento para determinar el mejor protocolo para el cultivo en laboratorio. La movilidad y disponibilidad de los nutrientes bajo condiciones *in vitro* es inversamente proporcional a la densidad del medio de cultivo, por que al determinar la concentración más efectiva de 2,4-D en arroz se tomó en consideración esta variable.

En el cuadro 10 se presentan los resultados obtenidos después de cuatro semanas de iniciado el proceso de inducción de callo.

**Cuadro 10.** Valores promedio para cinco variables medidas al finalizar la etapa de callogénesis .  
CIB,2001.

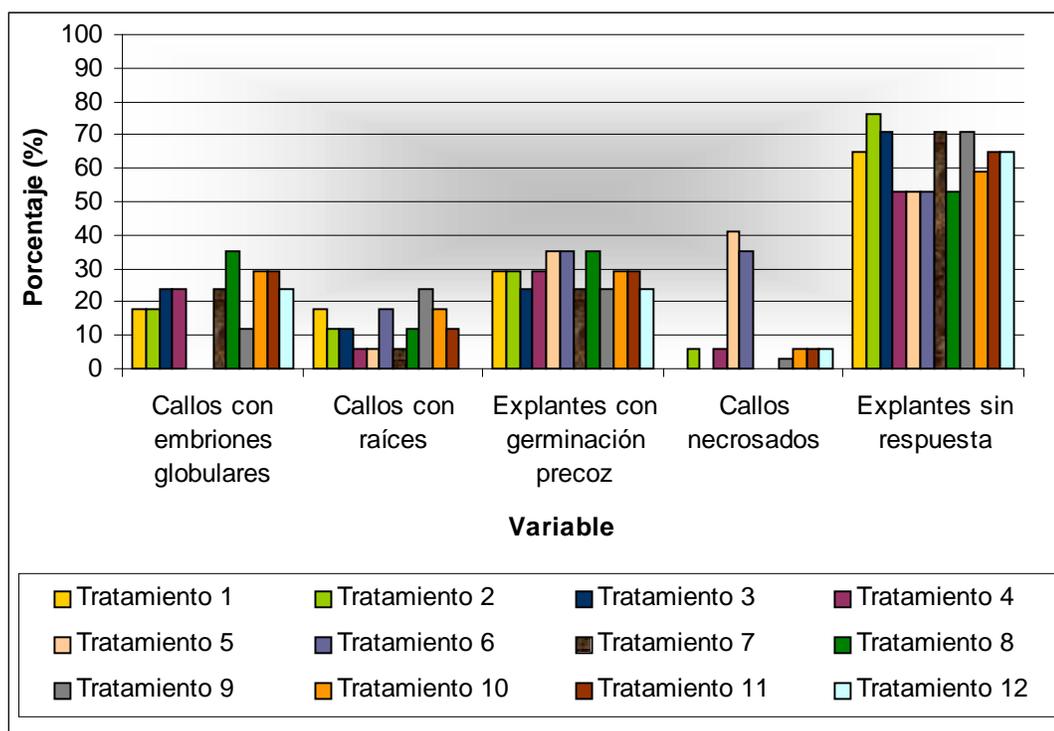
TRATAMIENTO			VARIABLES				
Número Identificación	Concentración 2,4-D (mgL <sup>-1</sup> )	Concentración Phytigel™(gL <sup>-1</sup> )	CEG	CR	GP	CN	SR
1	0.5	1.8	3 a c <sup>6</sup>	3 a b	5 a	0 c	11 a
2	0.5	2.3	3 a b c	2 a b c	5 a	1 c	13 a
3	0.5	3.0	4 a b c	2 a b c	4 a	0 c	12 a
4	1.0	1.8	4 a b c	1 a b c	5 a	1 c	9 a
5	1.0	2.3	0 c	1 b c	6 a	7 a	9 a
6	1.0	3.0	0 c	3 a b	6 a	6 a b	9 a
7	1.5	1.8	4 a b c	1 b c	4 a	0 c	12 a
8	1.5	2.3	6 a	2 a b c	6 a	0 c	9 a
9	1.5	3.0	2 b c	4 a	4 a	3 b c	12 a
10	2.0	1.8	5 a b	3 a b	5 a	1 c	10 a
11	2.0	2.3	5 a b c	2 a b c	5 a	1 c	11 a
12	2.0	3.0	4 a b c	0 c	4 a	1 c	11 a

Fuente: datos de laboratorio

Nota: *CEG*: Callos con embriones en estado globular; *CR*: Callos con raíces; *GP*: explantes que presentaron germinación precoz; *CN*: Callos necrosados; *SR*: Explantes que no respondieron.

<sup>6</sup> Diferencias significativas según prueba de comparación de medias de Tukey ( $\alpha=95\%$ )

En el cuadro 10 se observa que no hubo diferencias significativas para el número de callos con vitroplantas (germinación precoz) y el número de explantes sin respuesta callogénica. Esto implica que, a pesar de las diferencias entre los tratamientos, el número de explantes que no respondieron y que germinaron precozmente fue similar estadísticamente, por lo tanto, en la escogencia del mejor tratamiento no constituyen variables de importancia. En la figura 9 se muestra el porcentaje total obtenido para cada variable según la constitución del medio de cultivo.



**Figura 9.** Porcentajes promedio para cada variable según la constitución del medio de cultivo . CIB, 2001.

El tratamiento 5 ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D /  $2.4 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™) y el tratamiento 6 ( $1 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D /  $3.0 \text{ gL}^{-1}$  Phytigel™) fueron los que se presentaron mayor porcentaje de callos necrosados (41 % y 35 %, respectivamente) y no se produjeron callos globulares para continuar el proceso de regeneración *in vitro*, por lo que se tuvieron que eliminar del ensayo. Para ambas variables la prueba de comparación de medias de Tukey, determinó que existieron diferencias significativas con respecto a los demás tratamientos (cuadro 10).

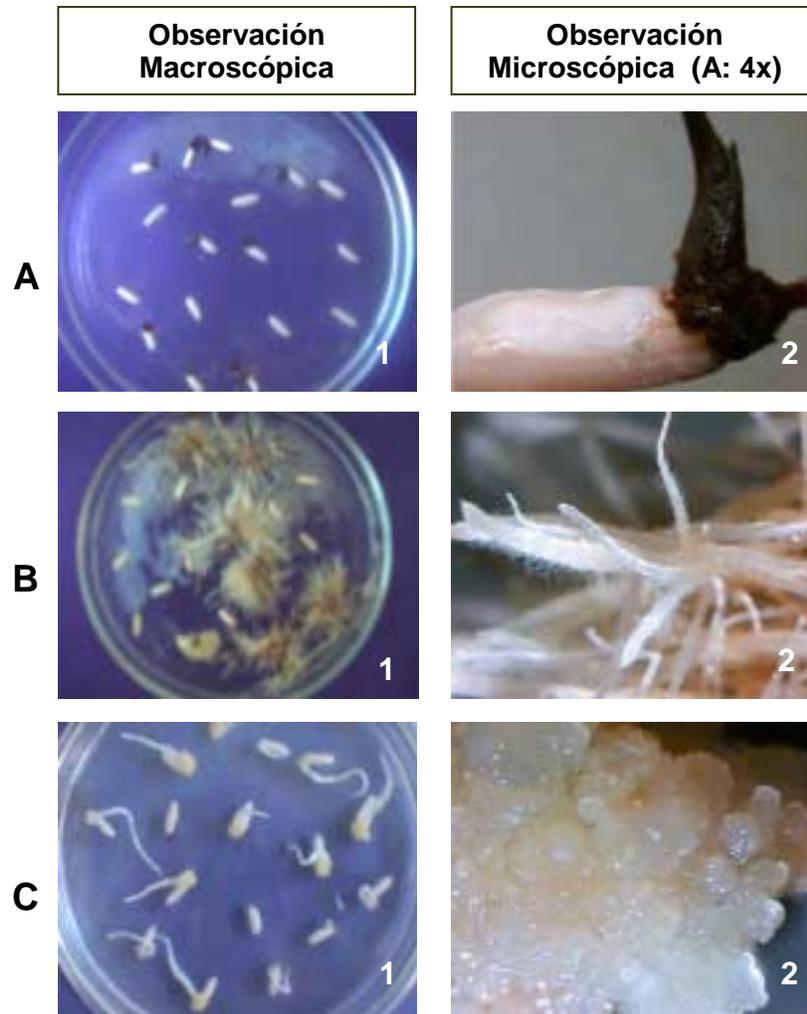
El número de callos necrosados osciló entre 0 y 1 para el 83 % de los tratamientos. La presencia de callos con actividad rizogénica se detectó en todos los tratamientos, sin embargo se observó que el tratamiento 12 (2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D / 3 gL<sup>-1</sup> Phytigel™) y el tratamiento 7 (1.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D / 1.8 gL<sup>-1</sup> Phytigel™) presentaron la mayor inhibición de rizogénesis. Estas bajas incidencias no interfirieron en el proceso de cultivo *in vitro*, pero el alto porcentaje de explantes que no respondieron (de un 53 % a un 76 %) ocasionó una baja considerable en la obtención de callos con embriones globulares los cuales, pudieran ser subcultivados en medios de regeneración.

Para el tratamiento 8 (1.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D / 2.3 gL<sup>-1</sup> Phytigel™) se obtuvo un 35 % de callos en buen estado, mientras que para el control (tratamiento 12; 2.0 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D / 3.0 gL<sup>-1</sup> Phytigel™) el porcentaje fue de 24 %.

Estudios previos determinaron que semillas inoculadas en medios MS (1962) con 4% de azúcar, 10 gL<sup>-1</sup> de agar - agar y de 0.5 mgL<sup>-1</sup> a 1 mgL<sup>-1</sup> de 2,4-D produjeron raíces y tallos debido a la baja concentración de la auxina, y que, en las cultivadas en medios con 2 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D se inhibió el proceso de germinación y formaron callo directamente de regiones embrionarias como el escutelo (Al-Khayri *et al.*, 1996).

Como se mencionó anteriormente durante el ensayo se presentaron eventos de germinación precoz, necrosis, rizogénesis y callogénesis de acuerdo a la combinación de 2,4-D y Phytigel™ utilizada en cada medio de inducción de callo.

En la figura 11 se muestran tres eventos que ocurrieron durante la etapa de inducción de callo. Se aprecia que semillas expuestas a una baja concentración de 2,4-D con 2.3 ó 3.0 gL<sup>-1</sup> Phytigel™ presentaron una necrosis total antes de la formación de callo (figura 11A). En la figura 11B se observa la alta proliferación de raíces en callos cultivados en medios con una baja concentración de Phytigel™ (1.8 gL<sup>-1</sup>), y esto se debe a la alta movilidad del regulador, ya que para todas las concentraciones de 2,4-D evaluadas, se presentó una mayor incidencia de rizogénesis en los medios con menor densidad.



**Figura 10.** Respuesta de los explantes al cultivo en medios de inducción de callo con diferentes concentraciones de 2,4-D y Phytigel™ (Sigma). A) necrosis del material debido a bajas concentraciones de 2,4-D y alta densidad de los medios de cultivo; B) estimulación de rizogénesis por alta movilidad del 2,4-D; C) producción de callos globulares en medios con 1.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D y 2.3 gL<sup>-1</sup> de Phytigel™. CIB, 2001.

Al analizar el arreglo experimental, se obtuvo que el tratamiento 8 (1.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D y 2.3 gL<sup>-1</sup> de Phytigel™) fue el mejor, seguido respectivamente por el tratamiento 7 (1.5 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D y 1.8 gL<sup>-1</sup> de Phytigel™) y el tratamiento 12 (*control*; 2.0 mgL<sup>-1</sup> 2,4-D y 3.0 gL<sup>-1</sup> de Phytigel™). Como el objetivo en esta fase fue disminuir la concentración de 2,4-D para que los callos ingresen a la fase de regeneración con la menor cantidad posible de auxina intracelular, se continuó la investigación utilizando callos provenientes de los mejores tres tratamientos (incluido el control) en los medios de regeneración.

## Regeneración de vitroplantas

La frecuencia de rediferenciación es inversamente proporcional a la concentración de 2,4-D intracelular al inicio de la fase de regeneración (Mitsuoka *et al.*, 1994). Para promover la conversión de los embriones somáticos a vitroplantas, los callos globulares obtenidos en la etapa de callogénesis se subcultivaron en el medio de regeneración utilizado comúnmente (apéndice 2) y en medio de cultivo MS (1962) sin auxinas y citoquininas. Este último medio se evaluó debido a que se ha informado que embriones somáticos de cereales como el maíz (*Zea mays*) forman vitroplantas al ser subcultivados en medios libres de reguladores del crecimiento (Jiménez, 2000). En esta fase se evaluó el porcentaje de callos que no regeneraron, el porcentaje de callos regenerados y el porcentaje de necrosis. En el cuadro 11 se muestran los resultados obtenidos.

**Cuadro 11.** Porcentaje de callos que no regeneraron<sup>7</sup>, callos regenerados y callos necrosados a las ocho semanas en medios de regeneración. CIB, 2001.

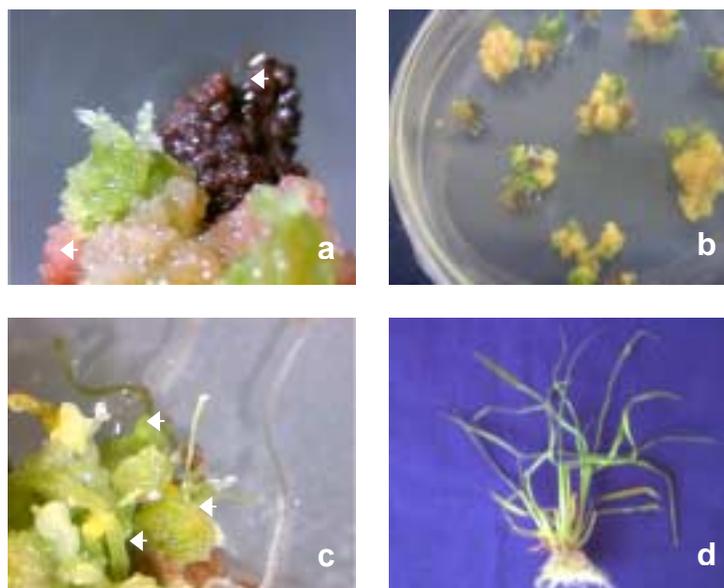
TRATAMIENTO EN CALLOGÉNESIS						
Identificación		T 7	T 8	T 12 (control)		
Concentración de 2,4-D		1.5 mgL <sup>-1</sup>	1.5 mgL <sup>-1</sup>	2.0 mgL <sup>-1</sup>		
Concentración de Phytigel™		1.8 gL <sup>-1</sup>	2.3 gL <sup>-1</sup>	3.0 gL <sup>-1</sup>		
TRATAMIENTO EN REGENERACIÓN	MS sin reguladores	Callos que no regeneraron	84 %	87 %	79 %	
		Callos con vitroplantas	6 %	7 %	9 %	
		Callos necrosados	10 %	6 %	12 %	
	MS+ ANA+ Kin	Callos que no regeneraron	77 %	74 %	81 %	
		Callos con vitroplantas	18 %	22 %	16 %	
		Callos necrosados	5 %	4 %	3 %	

Fuente: datos de laboratorio.

<sup>7</sup> Incluye los callos con zonas verdes y los que no presentaron ninguna respuesta al tratamiento.

Para todos los tratamientos se obtuvo un alto porcentaje de callos que no regeneraron, esto no presentaron evidencia alguna de regeneración o solamente produjeron zonas verdes no regenerables. Entre 6 % (T7) y 9 % (T12) de los callos cultivados en medios libres de reguladores del crecimiento presentaron regeneración, mientras que en los cultivados en medios con MSR (con ANA y kinetina) se obtuvo un valor máximo de 22% (T 8) y un mínimo de 16 % (control). Esto sugiere que la adición de una fuente de auxinas es innecesaria para la conversión de los embriones a vitroplantas, sin embargo, parece ser que la presencia de citoquininas si es importante para lograr porcentajes de regeneración relativamente altos.

En la figura 11 se presentan las respuestas obtenidas con los diferentes medios de regeneración. Se observa que la frecuencia de regeneración en medios MSR fue alta y que los callos produjeron vitroplantas con un buen sistema aéreo y radical sin necesidad de un subcultivo posterior en medio de enraizamiento (MSE; apéndice 2).



**Figura 11.** Respuesta de los callos en la etapa de regeneración. a) callo con secciones necrosadas y zonas verdes no regenerables en medio MS sin reguladores del crecimiento (A: 4x); b) callos de dos semanas en medio MSR; c) brotes producidos en medio MSR (A: 4x); d) vitroplanta formada a las siete semanas de iniciada la etapa de regeneración. CIB, 2001.

En los explantes cultivados en medios sin reguladores, la necrosis se presentó en niveles más altos (entre 6 % y 12 %) que en los cultivados con un suministro continuo de reguladores, esto quizá se deba al estrés provocado por una disminución en los niveles endógenos de reguladores del crecimiento. No obstante, es importante recalcar que estos porcentajes están muy por debajo a los observados en los ensayos anteriores.

Por otra parte, en ambos medios de cultivo se observó que los callos no producen vitroplantas de manera sincronizada, y esto se puede deber a que la concentración de 2,4-D decae conforme aumenta el período de subcultivo (Mitsuoka *et al.*, 1994), por lo que en las zonas donde se va disminuyendo la concentración de la auxina se van activando los mecanismos de regeneración. Por ello, es que el número de semanas de cultivo es proporcional al aumento en la regeneración (Al-Khayri *et al.*, 1996), y de ahí la importancia de que la cantidad de 2,4-D intercelular sea la mínima antes del inicio del proceso de formación de vitroplantas.

## CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos permiten concluir que:

- La cantidad de agente gelificante esta relacionada proporcionalmente con la densidad del medio del cultivo y por ende en la resistencia que éste ofrece al flujo de sustancias a los explantes.
- La concentración de Phytigel™ en el medio de cultivo afecta directamente la movilidad del agua y por ende influye en la absorción de nutrientes.
- Una disminución en la densidad de los medios permite una mayor disponibilidad fisiológica de los compuestos del medio, por lo que las concentraciones de los reguladores pueden ser disminuidas.
- Medios de callogénesis con  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D y  $2.3 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™ fueron los más efectivos para la inducción de callo.
- El uso de citoquininas en la fase de regeneración es necesaria para la conversión de los embriones somáticos a vitroplantas.
- La eficiencia de regeneración se ve influenciada por la cantidad de 2,4-D utilizada en los medios de callogénesis.

## RECOMENDACIONES

Entre las sugerencias están:

- Utilizar medios de inducción de callo con  $1.5 \text{ mgL}^{-1}$  2,4-D y  $2.3 \text{ gL}^{-1}$  de Phytigel™ en los futuros trabajos en arroz.
- Determinar la concentración endógena de 2,4-D en los callos durante la fase de callógenesis, antes y durante la fase de regeneración para correlacionar directamente su efecto en la regeneración de vitroplantas.
- Estudiar que variables físicas afectan la absorción y movilidad de los nutrientes en los sistemas de cultivo *in vitro*.

## BIBLIOGRAFÍA

---

- ABDELNOUR, A. 2000. Manual de Laboratorio de Fisiología Vegetal. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. p.14.
- AL-KHAYRI, J; SHAMBLIN, C; MCNEW, R. AND ANDERSON, E. 1996. Callus induction and plant regeneration of U.S. rice genotypes as affected by medium constituents. In vitro cell. Dev. Biol-Plant 32:227-232.
- ALVARENGA, S. 1999. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos I. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. p.11.
- BAINS, W. 1993. Biotechnology from A to Z. Oxford University Press. USA. p.121, 313.
- CHOWDHRY, C; TYAGI, A.K; MAHESHWARI, N AND MAHESHWARI, S.C. 1993. Effect of L-Proline and L- Tryptofan on somatic embryogenesis and regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). Plant Cell and Organ Culture. 32: 357-361.
- CORDERO, A. s.f. Situación actual, logros y perspectivas del cultivo del arroz en Costa Rica. Centro de Investigaciones Agronómicas. Universidad de Costa Rica. 28 p.
- CORREA-VICTORIA, F; DATNOFF, L; OKADA, K; FRIESEN, D; SANZ, J AND ZINDER, G. 1999. Effects of silicon fertilization on disease development and yields of rice in Colombia. Annual Report. Mimeografiado.
- D' ONOFRIO, C; MORINI, S Y BELLOCCHI, G.1998. Effect of light quality on somatic embriogénesis of quince leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 53: 91-98.
- ENDRESS, R. 1994. Plant Cell Biotechnology. Springer- Verlag. Berlin, Alemania. 353p.
- EPSTEIN, E. 1994. The anomaly of silicon in plant biology. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91:11-17.
- EPSTEIN, E. 1999. Silicon. Annual Reviews Plant Physiol. Plant Mol. 50: 641-644.
- FLORES, D; ABDELNOUR, A. 2000. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos II. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. p.11.
- FLORES, D; BRENES, J. 1999. Producción en Invernadero de semilla de papa a partir de vitroplantas. Instituto Tecnológico de Costa Rica Centro de Información Tecnológica. Serie Información Tecnología Apropiaada N° 26. p.5.
- JAIN, R.K; JAIN, S. AND WU, R. 1996. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic Indica rice varieties. Plant Cell Reports. 15 (6): 449-454.
- \_\_\_\_\_. 1997. Effect of some factors on plant regeneration from indica rice cells and protoplast – A Review. Indian Journal of Experiment Biology. Vol. 35; pp. 323-331.

- JIMÉNEZ, V. 1999. Embriogénesis Somática. Instituto Tecnológico de Costa Rica, Escuela de Biología. Cartago, Costa Rica.
- JIMÉNEZ, V. 2000. Endogenous Hormone Levels in Wheat, Maize, Barley, Carrot, Grapevine and *Citrus* Tissues and relationship to their *in vitro* somatic embryogenesis. Verlag Grauder, Stuttgart, Germany. pp.1-67.
- KALDENHOFF, R; HENNINGSSEN, U AND RICHTER, G. 1994. Gene activation in suspension-cultured cells of *Arabidopsis thaliana* during blue light-depended plantlet regeneration. *Planta* 195: 182-187.
- MAG (MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERÍA, CR.). 1991. Aspectos técnicos sobre 45 cultivos agrícolas de Costa Rica. Boletín Técnico N° 74. San José, Costa Rica.
- MEISNER. s.f. Mineral Nutrition of Higher Plants: Silicon. p .417-426.
- Merk Index. 1996. The Merk Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals. 20 ed. Merck Research Laboratories. Merck & CO, INC. USA. p.447, 743, 763.
- MITSUOKA, K; HONDA, H; XING, H. AND UNNO, H. 1994. Effect of intracellular 2,4 - D concentration on plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Appl. Microbiol Biotechnol.* 42: 364- 366.
- MONTIEL, M. 1991. Introducción a la flora de Costa Rica. 2 ed. Editorial de la Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. pp. 1991,193.
- MUÑOZ, A. 1998. Fisiología vegetal: nutrición mineral. Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. Material mimeografiado.18p.
- OGAWA, T. 2000. Improvement of cell culture conditions for rice. *JARQ* 34(4): 215 – 223. También disponible en <http://ss.jircas.affrc.go.jp>.
- PAYNE, G; BRINGI, V; PRINCE, C Y SHULER, M. 1991. Plant Cell and Tissue Culture in Liquid Systems. Oxford University Press. USA. p. 313- 322.
- RUEB, S; LENEMAN, M; SCHILPEROOT, R.A. AND HENSGENS, L. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 36: 259-264.
- SALISBURY, F. AND ROSS, C. 1992. Fisiología Vegetal. 4 ed. Traducido por Biol.. Virgilio González Velásquez. Editorial Iberoamérica. pp.135-136.
- SERWAY, R. 1992. Física: Tomo I. 3 ed. McGraw- Hill. México. p. 405-407; A-15.
- SIGMA. 1999. Technical Information: Plant Tissue Culture. USA.

- SUPRASANNA, P; GANAPATHI, T.R. AND RAO, P.S. 1997. Embryogenic ability in long term callus cultures of rice (*Oryza sativa* L.). Cereal Research Communications. 25(1): 27-33.
- TAKAHASHI, E. 1995. Uptake mode and physiological functions of silica. *In*; Science of rice plant. Vol. 2: Physiology. p. 420-433.
- TSUKAHARA, M. AND HIROSAWA, T. 1992. Simple dehydration treatment promotes plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. Plant Cell Reports. 11: 550-553.
- VALDEZ, M; MUÑOZ, M; VEGA, J AND ESPINOZA, A. 1996. Plant regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars from mature embryo- derived calli. Rev. Biol. Trop. 44 (3) / 45 (1): 1996-1997.
- VEGA, J. 1996. Embriogénesis somática en arroz (*Oryza sativa* L. cultivar CR-5272): Anatomía e Histología de los procesos embriogénicos. Tesis de Maestría. Sistema de Estudios de Posgrado. Escuela de Biología. Universidad de Costa Rica. 98p.
- WEAVER, R. 1976. Reguladores del crecimiento de las plantas en la agricultura. Traducido por Agustín Contin. Editorial Trillas. México. 621p.
- XU, Z.J; FUJINO, K; FURAYA, C. AND KIKUTA, Y. 1995. Plantlet regeneration and novel synthesis in a long- term cultured callus of rice in response to abscisic acid. Japanese Journal of Crop Science. 64 (1): 109-114.

# APÉNDICES

## APÉNDICE 1. SOLUCIONES STOCK PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIO DE CULTIVO MURASHIGE & SKOOG (1962)<sup>8</sup>

<b>MACROELEMENTOS MS</b>	Cantidad (1X)	2 L (20 X)	
KNO <sub>3</sub>	1.9 gL <sup>-1</sup>	38 g	
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1.65 gL <sup>-1</sup>	33 g	
CaCl <sub>2</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	440 mgL <sup>-1</sup>	8.8 g	
MgSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	370 mgL <sup>-1</sup>	7.4 g	Alícuota 100 mL <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170 mgL <sup>-1</sup>	3.4 g	

<b>MICROELEMENTOS MS</b>	Cantidad (1X)	1 L (500 X)	
MnSO <sub>4</sub> • 4 H <sub>2</sub> O	22.3 mgL <sup>-1</sup>	11.15 g	
ZnSO <sub>4</sub> • 7 H <sub>2</sub> O	8.6 mgL <sup>-1</sup>	4.3 g	
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.2 mgL <sup>-1</sup>	3.1 g	
KI	0.83 mgL <sup>-1</sup>	0.415 g	
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> • 2 H <sub>2</sub> O	0.25 mgL <sup>-1</sup>	0.125 g	
CuSO <sub>4</sub> • 5 H <sub>2</sub> O	0.025 mgL <sup>-1</sup>	0.0125 g	Alícuota 2 mL <sup>-1</sup>
CoCl <sub>2</sub> • 6 H <sub>2</sub> O	0.025 mgL <sup>-1</sup>	0.0125 g	

<b>HIERRO MS</b>	Cantidad (1X)	½ L (100 X)	
Fe- EDTA	43 mgL <sup>-1</sup>	4.3 g	Alícuota 5mL <sup>-1</sup>

<b>VITAMINAS MS</b>	Cantidad (1X)	1 L (200 X)	
Myo – Inositol	100 mgL <sup>-1</sup>	20 g	
Glicina	2 mgL <sup>-1</sup>	0.4 g	
Ácido Nicotínico	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.1 g	
Piridoxina – HCl	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.1 g	Alícuota 5 mL <sup>-1</sup>
Tiamina – HCl	0.1 mgL <sup>-1</sup>	0.02 g	

<sup>8</sup> Alvarenga, S. (1999).

## APÉNDICE 2. MEDIOS DE CULTIVO EMPLEADOS EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)<sup>9</sup>

		MIC	MSKA	MSR	MSE
Sales Vitaminas		MS (1962)	MS (1962)	MS (1962)	MS (1962)
Reguladores del Crecimiento	2,4-D	2 mgL <sup>-1</sup>	-	-	-
	ANA	-	0.5 mgL <sup>-1</sup>	0.5 mgL <sup>-1</sup>	2.5 mgL <sup>-1</sup>
	Kinetina	-	2 mgL <sup>-1</sup>	2 mgL <sup>-1</sup>	-
Aminoácidos	L- Prolina	500 mgL <sup>-1</sup>	-	-	-
	L- Triptófano	50 mgL <sup>-1</sup>	-	-	-
Maltosa		3%	3%	3%	3%
pH		5.8	5.8	5.8	5.8
Phyta- Gel		3 gL <sup>-1</sup>	6 gL <sup>-1</sup>	3 gL <sup>-1</sup>	3 gL <sup>-1</sup>
Condición		Oscuridad	Luz Difusa	Luz Directa	Luz Directa

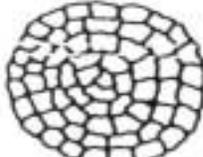
### Abreviaciones:

MIC	Medio de Inducción de Callo
MSKA	Medio de Pre - regeneración
MSR	Medio de Regeneración
MSE	Medio de Enraizamiento
2, 4- D	Ácido 2, 4-diclorofenoxiacético
ANA	Ácido Naftalenacético

<sup>9</sup> MUÑOZ, M. Y ARRIETA, G.2000. Medios de cultivo utilizados en la embriogénesis somática de arroz. CIBCM. (Comunicación personal)

# ANEXOS

## ANEXO 1. EVOLUCIÓN UN EMBRIÓN SOMÁTICO DURANTE EL PROCESO DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.<sup>10</sup>

Horas de diferenciación	Número de células	Diámetro (mm)	Estructura anatómica	Nombre de la estructura
0	1			
				Agregados de células pro-embriogénicas
140	420	0.2		Estado Globular
165	1100	0.5		Estado de Corazón
195	2500	> 1.0		Estado de Torpedo

<sup>10</sup> Tomado de Endress (1994). Traducido y editado por el autor.