

TECNOLÓGICO DE COSTA RICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIONES
INMADUROS DE ARROZ (*Oryza sativa*) SUBESPECIE *INDICA*:
OPTIMIZACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE VITROPLANTAS

Informe de trabajo final de graduación para optar por el título de
Ingeniería en Biotecnología con el grado académico de Bachillerato.

Daniela Vega Gutiérrez

CARTAGO, 2011

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA*) SUBESPECIE *INDICA*: OPTIMIZACIÓN DE LA REGENERACIÓN DE VITROPLANTAS

Daniela Vega Gutiérrez

RESUMEN

La presente investigación tuvo como objetivo optimizar la regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos producidos de embriones inmaduros de arroz (*Oryza sativa*. L var. CR-5272). Para ello, se recolectaron cariósides en estado de llenado del grano (leche media) de plantas cultivadas en invernadero. Se realizó el procedimiento adaptado de Christou *et al.* (1991) y Christou & Ford (1995). Se extrajeron 30 embriones inmaduros, se midieron con un vernier (Mitutoyo) y se sometieron a un proceso de callogénesis en medio CC suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y caseína hidrolizada (Potrykus *et al.*, 1979). Se introdujo un total de 150 embriones (cinco repeticiones de 30 embriones cada una). Posteriormente, se evaluó su regeneración a tres dosis de kinetina y ácido naftalenacético. Se utilizaron los callos provenientes de 10 embriones por tratamiento. Se evaluó la cantidad de vitroplantas obtenidas de cada embrión, así como la cantidad de callos necrosados u oxidados. Se obtuvo un número variable de vitroplantas por embrión, desde cero hasta 79 vitroplantas por embrión, con un promedio de $5,39 \pm 12,06$ vitroplantas por embrión. La mayor cantidad de vitroplantas se obtuvo al utilizar embriones de entre 1,9 y 2 mm de longitud e inoculados en medio suplementado con 1mg/L de kinetina y 0,25 mg/L de ácido naftalenacético.

Palabras clave: callogénesis; embriogénesis somática; embriones inmaduros; regeneración; arroz; *Oryza sativa*; indica; CR-5272.

- INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2011.

SOMATIC EMBRYOGENESIS FROM IMMATURE EMBRYOS OF *INDICA* RICE
(*ORYZA SATIVA*): OPTIMIZATION OF PLANT REGENERATION

Daniela Vega Gutiérrez

ABSTRACT

The main objective of this investigation was to optimize the regeneration of plants from embryogenic calli induced from immature embryos of rice (*Oryza sativa*. L var. CR-5272). To accomplish this, immature seeds in filling state (medium milk) were collected from greenhouse-cultured plants. A procedure adapted from Christou *et al.* (1991) and Christou & Ford (1995) was performed. Thirty immature embryos were extracted, measured with a vernier (Mitutoyo) and callogenesis was induced by culture on CC media supplemented with 2 mg/L of 2,4-D and hydrolyzed casein (Potrykus *et al.*, 1979). A total of 150 embryos were introduced (five repetitions of 30 embryos each). Later, their regeneration was evaluated at three concentrations of kinetin and naphthalenacetic acid. Calli obtained from ten embryos were inoculated on each treatment. The amount of plants obtained from each embryo was evaluated, along with the amount of oxidized and necrotized calli. A variable number of plants per embryo was obtained, from zero to 79 plants per embryo, with an average of $5,39 \pm 12,06$ plants per embryo. The largest amount of plants was achieved by using embryos between 1,9 and 2 mm long and inoculating them on CC media supplemented with 1mg/L kinetin and 0,25 mg/L naphthalenacetic acid.

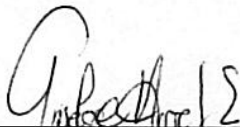
Keywords: callogenesis; somatic embryogenesis; immature embryos; regeneration; rice; *Oryza sativa*; indica; CR-5272.

- INFORME DE TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN, Escuela de Biología, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago, 2011.

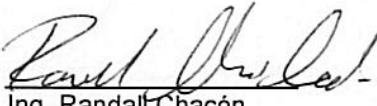
EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA A PARTIR DE EMBRIONES INMADUROS DE
ARROZ (*ORYZA SATIVA*) SUBESPECIE *INDICA*: OPTIMIZACIÓN DE LA
REGENERACIÓN DE VITROPLANTAS

Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica
como requisito parcial para optar al título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología.

Miembros del Tribunal


M.Sc. Griselda Arrieta Espinoza
Asesora
Centro de Investigación en
Biología Celular y Molecular


M.Sc. Dora Flores Mora
Profesora Asesora
Instituto Tecnológico de
Costa Rica


Ing. Randal Chacón
Cerdas
Lector
Instituto Tecnológico de
Costa Rica

DEDICATORIA

A mis padres, por apoyarme siempre y otorgarme mi educación.

A Alonso, por su apoyo incondicional durante mi formación profesional.

A mi hija Arianna, por ser la motivación de mi vida.

Daniela

AGRADECIMIENTOS

La autora desea manifestar su agradecimiento a los siguientes organismos y personas, por su colaboración en el presente trabajo:

Al Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular, por el apoyo financiero y logístico para la ejecución del proyecto.

A los miembros del Tribunal evaluador, por su valiosa guía. A Griselda Arrieta Espinoza, por permitirme ser parte del grupo de trabajo del Laboratorio del Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos, por todo el conocimiento compartido conmigo y por su apoyo. A la profesora Dora Flores por sus consejos y su apoyo constante. Y al profesor Randall Chacón, por sus numerosas enseñanzas y por el tiempo que invirtió en ayudarme.

Al grupo de trabajo del Laboratorio del Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos, por toda su ayuda, compañerismo y amistad.

Finalmente, a todos mis compañeros del TEC, gracias por su valiosa amistad y su apoyo durante estos cinco años de estudio. Aprendí más de ustedes que en cualquier libro y agradezco a Dios por haberlos puesto en mi camino, serán siempre una parte importante de mi vida.

ÍNDICE GENERAL

RESUMEN	1
ABSTRACT	2
DEDICATORIA.....	4
AGRADECIMIENTOS	5
ÍNDICE DE TABLAS	7
ÍNDICE DE FIGURAS	7
ÍNDICE DE ANEXOS	8
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	9
CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA.....	12
CAPÍTULO 3. OBJETIVOS	18
3.1 Objetivo General.....	18
3.2 Objetivos Específicos.....	18
CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS	19
4.1. Optimización de la desinfección.....	19
4.2. Desinfección de los granos de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.) e introducción de los embriones inmaduros.....	20
4.3. Subcultivo de los callos embriogénicos formados a partir de los embriones inmaduros	21
4.4 Ensayo de regeneración de vitroplantas utilizando tres combinaciones de concentraciones de kinetina y ácido naftalenacético.....	21
4.5. Análisis Estadístico.....	22
CAPÍTULO 5. RESULTADOS.....	23
CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN	37

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	46
CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA	48
CAPÍTULO 9. ANEXOS	54

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 4.1. Tratamientos para la regeneración de brotes a partir de callos provenientes de embriones inmaduros de arroz CR- 5272	22
Tabla 5.1. Valor del estadístico p para las pruebas de varianza GLM para las variables de respuesta: Brotes/embrión y Vitroplantas/embrión. Nivel de confianza del 95%.....	30

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 5.1. Porcentaje de embriones inmaduros introducidos a medio de callogénesis que formó callo, que no reaccionó ante la inducción y que se contaminó.	24
Figura 5.3. Callos inducidos a partir de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272.....	26
Figura 5.4. Embriones somáticos observados en los callos inducidos a partir de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272.....	27
Figura 5.5. Secuencia del desarrollo de vitroplantas a partir de embriones inmaduros de arroz CR-5272 mediante embriogénesis somática indirecta.....	28
Figura 5.7. Efecto de los factores tratamiento y tamaño del embrión sobre el número de brotes obtenidos por embrión.....	31
Figura 5.8. Efecto de los factores tratamiento y tamaño del embrión sobre el número de vitroplantas obtenidas por embrión..	33

Figura 5.9. Resumen del número de brotes y vitroplantas (medias) obtenidos por embrión a partir de los embriones de cada tamaño inoculados en cada tratamiento.35

Figura 5.10. Algunas observaciones realizadas durante la fase de regeneración de vitroplantas a partir de cellos inducidos de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272.....37

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 9.1. Composición del medio de callogénesis 54

Anexo 9.2. Componentes de medio de regeneración. 55

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El arroz pertenece al género *Oryza* y está conformado por 23 especies de las cuales se cultivan dos: *Oryza sativa*, proveniente de Asia, y *Oryza glaberrima*, de África Occidental. Las variedades de la especie *sativa* han evolucionado independientemente en 3 subespecies: *indica*, *japonica* y *javanica* (Molina *et al.*, 2011). El arroz que se cultiva en Costa Rica pertenece a la subespecie *indica* y actualmente se comercializan variedades como la CR-5272, CR-4477, SENUMISA15, PALMAR 18, CFX-18, entre otras (Oficina Nacional de Semillas, 2011).

El arroz proporciona el 20% del suministro de energía alimentaria del mundo, mientras que el trigo y el maíz aportan el 19% y el 5% respectivamente (FAO, 2004), lo cual refleja la importancia de este cultivo para la salud nutricional de la población. Así mismo, desde un punto de vista económico, los sistemas de producción y el manejo postcosecha del arroz son una fuente de trabajo para aproximadamente 1 000 millones de personas de las zonas rurales de países en vías de desarrollo, siendo los principales países productores China, India, Indonesia, Bangladesh y Vietnam (FAO, 2004).

A nivel mundial, el cultivo del arroz está sometido a limitaciones importantes, el sistema de cultivo de regadío requiere de abundante agua y las tierras cultivables disminuyen debido a la urbanización, desecación y salinización (Coudert *et al.*, 2010). Esto representa un grave problema ya que, según las Naciones Unidas, el crecimiento demográfico actual requerirá de un aumento de la producción del arroz en un 40% para cubrir con la demanda del cereal para el 2030 (Coudert *et al.*, 2010).

En Costa Rica, la superficie cosechada de arroz ha aumentado con el paso de los años, pero por el contrario su rendimiento ha disminuido; en 1990 se cosecharon 58 000 ha con un rendimiento promedio de 4.3 ton/ha (CEPAL, 2011) mientras que en el 2010 se cultivaron 66 415 ha pero con un rendimiento de 3,78 ton/ha (Conarroz, 2011). Esta situación se vio reflejada en el 2007, con el hecho de que la producción per cápita de arroz fue de 25,6 Kg mientras que el consumo aparente fue de 64,4 Kg/per capita (CEPAL, 2011); en el país sólo se produce aproximadamente la mitad del arroz que consume la población, para abastecer la demanda, la brecha se ha cubierto mediante la importación del grano (Conarroz, 2006). Para disminuir esta problemática es vital minimizar las importaciones de arroz, lo cual se puede lograr solamente mediante el incremento del rendimiento de la producción de arroz nacional.

Esta situación demuestra la necesidad (tanto a nivel nacional como mundial) del desarrollo de variedades de arroz mejoradas, las cuales pueden producirse por medio de mejoramiento convencional o por medio de técnicas como las que ofrecen la ingeniería genética de plantas y el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales. Estas técnicas deben dirigirse al aumento en la productividad del arroz, la resistencia a plagas como el picudo acuático (*Lissorhoptrus* sp.) y la sogata (*Tagosodes oryziculus*) (Ramírez, 2003), enfermedades como el virus de la hoja blanca RHBV (Espinoza & Arrieta-Espinoza, 2007) y la pudrición del tallo (*Sclerotium* sp.) (García & Lozoya, 2004; Ramírez, 2003) y condiciones ambientales extremas como la sequía y la salinidad (Levitus, 2006). La ingeniería genética de plantas, mediante la transformación genética, permite la inserción de genes foráneos en las plantas que les confieran características deseadas (Coudert *et al.*, 2010; Ramírez, 2003). Esta transformación se puede lograr mediante procedimientos como la biobalística y la transformación con *Agrobacterium tumefaciens* (Ramírez, 2003). Sin embargo, la transformación genética mediante el bombardeo de partículas se considera una técnica más eficiente y consistente para la inserción de genes en arroz de las subespecies *japonica* e *indica* (Abdul *et al.*, 2010).

No obstante, el éxito de la transformación aún depende de la regeneración de vitroplantas a partir de los tejidos transformados, proceso ligado a varios factores como: el genotipo, el tipo explante, la subespecie, variedad y los protocolos de cultivo de tejidos que se utilizan en el proceso de transformación (Carsono & Yoshida, 2006; Saharan *et al.*, 2004).

Por esta razón la transformación genética de las variedades de arroz requiere de protocolos optimizados para la regeneración de plantas a partir del tejido transformado, por lo que se deben ajustar las condiciones de cultivo *in vitro* de acuerdo a cada subespecie y variedad (Valdivia *et al.*, 2010). Valdez *et al.*, (1998) reportan la regeneración de vitroplantas transgénicas a partir de callos derivados de embriones maduros de arroz CR-5272, no obstante el número de plantas que se produce es bajo, pues sólo obtuvieron siete plantas a partir de 175 embriones. En esta investigación, se pretende optimizar un protocolo de cultivo de tejidos que incremente la regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos derivados de embriones inmaduros de la variedad CR-5272, con la finalidad de incrementar el porcentaje de regeneración de plantas en los procesos de transformación genética con esta variedad.

CAPÍTULO 2. REVISIÓN DE LITERATURA

El mejoramiento genético del arroz mediante técnicas biotecnológicas, como por ejemplo la variación somaclonal, la selección *in vitro*, la producción de dobles haploides a partir del cultivo de anteras y la transformación genética, puede ser la solución para lograr la obtención de variedades de arroz con características beneficiosas o deseables. Sin embargo, el prerrequisito básico para el uso potencial de la biotecnología en el mejoramiento del arroz es la habilidad para regenerar plantas de arroz, lo cual depende principalmente de factores como el genotipo, tipo de explante, composición del medio, reguladores de crecimiento y condiciones de cultivo (Thadavong *et al.*, 2002), parámetros que se deben establecer mediante un el desarrollo de un protocolo de cultivo *in vitro* óptimo.

La técnica del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales se basa en la totipotencialidad de las células vegetales, que le permite a cualquier célula diferenciada que posea núcleo regenerar una nueva planta completa mediante organogénesis o embriogénesis somática (Vega *et al.*, 2009). La regeneración en masa de plantas diploides a partir de tejido somático cultivado, se ha convertido en una fuente rica y novedosa para la regeneración de plantas de arroz, ya que por este medio la gran mayoría de las plantas regeneradas expresan cambios genéticos deseables, como la resistencia a enfermedades, tolerancia a la salinidad y otras características fisiológicas (Hossain *et al.*, 2006).

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual estructuras bipolares, semejantes a los embriones zigóticos, se desarrollan a partir de células somáticas, pero sin que medie la fusión de gametos (Vega *et al.*, 2009); en este tipo de regeneración la parte apical y radical de la planta se desarrollan simultáneamente a partir de una misma célula (Thadavong *et al.*, 2002).

Esto garantiza la formación de plantas clonales y no quiméricas; por el contrario, en los procesos organogénicos se da el desarrollo de un órgano a partir de estructuras de tejido diferenciado, lo que generalmente causa la obtención de plantas quiméricas (Christou, *et al.*, 1991).

La embriogénesis somática puede darse en forma directa (ESD) o indirecta (ESI). El proceso directo consiste en la inducción de embriones somáticos a partir de células pro-embriogénicas de hojas, tallo o protoplastos. Por otro lado, durante la embriogénesis somática indirecta los embriones somáticos se desarrollan a partir de callos friables inducidos a partir del explante, lo que requiere una re-determinación de las células diferenciadas del mismo (Vega *et al.*, 2009). En este último caso, la multiplicación de los callos obtenidos puede permitir la generación de una mayor cantidad de embriones somáticos a partir de un mismo explante. En el arroz, se pueden inducir cuatro tipos de callo: el tipo I es de color crema, compacto y organizado, el tipo II es amarillo y organizado, el III es amarillo o café y desorganizado y el IV es un callo altamente desorganizado que puede ser de color blanco, amarillo o café; de interés para este trabajo son los dos primeros tipos, pues son embriogénicos. En arroz, la embriogénesis somática es la vía más común utilizada para la regeneración de plantas, y se ha obtenido a partir de tejidos como las semillas inmaduras, los embriones zigóticos maduros e inmaduros, raíces, cariósides, protoplastos, células en suspensión e inflorescencias jóvenes (Carsono & Yoshida, 2006; Vega *et al.*, 2009). Las células embriogénicas muestran características propias de tejidos meristemáticos tales como altas tasas de división celular, forma isodiamétrica y pequeña con citoplasma denso con granos de almidón, núcleo grande, nucléolo prominente, vacuolas pequeñas, paredes celulares delgadas y alta actividad metabólica. Sin embargo, la principal característica de los embriones somáticos es su bipolaridad y la ausencia de conexión con el tejido vascular del explante (Vega *et al.*, 2009).

Se ha observado que el arroz de la subespecie *indica* presenta una menor formación de callo luego de su inducción que la que se da en plantas de la subespecie *japónica*; de igual manera, se ha visto que la embriogénesis somática y la regeneración de plantas también son inferiores en el arroz *indica*, lo que puede limitar el éxito en la transformación de este tipo de arroz (Carsono & Yoshida, 2006; Saharan *et al.*, 2006). En Costa Rica, se consume principalmente el arroz de tipo *indica*, y una de las variedades de mayor importancia es la CR-5272, por lo tanto, es necesario el desarrollo de una metodología óptima que permita aumentar la regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos.

En este sentido, se han reportado diversas metodologías que intentan aumentar la regeneración en la variedad CR-5272, por ejemplo, las descritas por Valdez y colaboradores (1998) y Vega y colaboradores (2009) quienes utilizaron embriones maduros para la inducción de callo embriogénico y la posterior regeneración de plantas. Sin embargo, en el primer caso, sólo se obtuvieron siete plantas y transformadas a partir de 175 embriones maduros, y en el segundo, se obtuvieron 83 plantas a partir de 120 callos embriogénicos, lo cual a pesar de representar una mejora, sigue siendo un porcentaje bajo de regeneración, pues al reportar los resultados no se está tomando en cuenta el callo no embriogénico que se obtuvo a partir de los embriones iniciales.

Pocos laboratorios han logrado la obtención de plantas transgénicas de la subespecie *indica*, por lo cual se clasifica como recalcitrante para el cultivo de tejidos (Qian *et al.*, 2004). El tipo de tejido que se utilice como objeto de transformación es uno de los factores más importantes que afectan la transferencia exitosa de genes de interés al arroz; este tejido debe ser capaz de producir plantas fértiles luego del procedimiento de cultivo *in vitro* (Abdul *et al.*, 2010). Además, el origen, el estado fisiológico, la edad y el grado de diferenciación del tejido del explante, se han reportado como los factores principales que influyen la regeneración a través de embriogénesis somática (Hoque & Mansfield, 2004).

Los embriones inmaduros y tejidos meristemáticos, al estar constituidos por células indiferenciadas, son en general más apropiados para la inducción de callo y la posterior regeneración de plantas, que los tejidos maduros (Carsono & Yoshida, 2006; Hoque & Mansfield, 2004). De acuerdo a Abdul *et al.* (2010) el cultivo de callos derivados de embriones inmaduros tiene el potencial de regenerar un gran número de plantas de arroz fértiles y Saharan y colaboradores (2006) explicaron que esto se debe a la alta totipotencialidad de las células producidas de estos callos. Por ello, una de las estrategias que se propone en este trabajo es el empleo de embriones inmaduros extraídos de carióspsides de arroz como explantes para la callogénesis y posterior regeneración de plantas, en sustitución de los embriones maduros que se han utilizado para este objetivo (Vega *et al.*, 2009 y Valdez *et al.* 1998).

Se ha observado que los callos embriogénicos inducidos de embriones inmaduros mediante técnicas de cultivo *in vitro* son efectivos para la transformación genética mediante bombardeo de partículas o por *Agrobacterium tumefaciens* (Carsono & Yoshida, 2006).

La eficiencia de la transformación en arroz depende en gran medida de la combinación del método de transformación, el protocolo de cultivo de tejidos apropiados y el carácter embriogénico de los tejidos (Abdul *et al.*, 2010) que permitirán una mayor frecuencia de regeneración de plantas que los no embriogénicos (Thadavong *et al.*, 2002). Asimismo, algunos componentes orgánicos que se añaden al medio de inducción de callo tales como el triptófano, la prolina, la caseína hidrolizada y el agua de coco, pueden aumentar la eficiencia y frecuencia de producción de callo embriogénico (Saharan *et al.*, 2006; Thadavong *et al.*, 2002). Por ejemplo para el cultivo de embriones inmaduros del arroz tipo *indica*, se reporta que un medio de cultivo adecuado es el CC (Potrykus *et al.*, 1979) suplementado con caseína hidrolizada (Christou, *et al.*, 1991).

Por otra parte, los reguladores del crecimiento cumplen un rol fundamental en los eventos morfogénicos que llevan a la formación de vitroplantas a partir de callos embriogénicos (Ogawa, 2000). Las citoquininas y auxinas son utilizadas como promotores de la desdiferenciación de estructuras organizadas, siendo el 2,4-D el más efectivo (Endress, 1994) y en arroz es utilizado para la obtención de callos (Jiménez, 2000). De acuerdo a los estudios realizados, en los embriones de la variedad CR-5272, se da la formación de callos amarillos y friables a partir del escutelo después de dos semanas de cultivo en el medio de inducción de callo. Inicialmente, se da la aparición de regiones embriogénicas a partir de las células epiteliales del escutelo con mayor actividad mitótica. Luego de diez días de cultivo, se observan agrupaciones de células proembriogénica de la región periférica del callo. Finalmente, luego de 20 días en cultivo, las estructuras proembriogénicas siguen una serie de divisiones organizadas y originan embriones somáticos globulares. La principal función de las células epiteliales del escutelo del arroz es la absorción de azúcares y reguladores de crecimiento vegetales, lo cual explica su alta actividad metabólica y su facilidad para desdiferenciarse y generar callos embriogénicos en comparación con el resto de las células del escutelo. Los embriones somáticos globulares pasan a ser embriones somáticos en fase de corazón después de diez días de haber sido cultivados en medio de regeneración. Posteriormente, después de quince días en medio de regeneración, es posible observar embriones somáticos en fase de torpedo, los cuales muestran una polarización con los meristemos apical y radical en polos opuestos (Vega *et al.*, 2009).

Para la regeneración de vitroplantas a partir callos embriogénicos se suele añadir al medio una combinación de reguladores de crecimiento del tipo citoquinina y auxina, que inducen la conversión a plantas y enraizamiento respectivamente (Meneses *et al.*, 2005). El proceso depende principalmente de la proporción de estos dos tipos de reguladores de crecimiento adicionada al medio de cultivo.

La generación de brotes se logra mediante una relación baja de auxina - citoquinina, mientras que el enraizamiento se induce mediante una relación alta de auxina - citoquinina (Thadavong *et al.*, 2002).

Para la regeneración a partir de callos obtenidos de embriones maduros se reporta el uso de las citoquininas bencil amino purina (BAP) y kinetina (KIN) y de las auxinas ácido naftalenacético (ANA) e ácido indol acético (AIA) (Abdul *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2006; Khalequzzaman *et al.*, 2005; Saqlan *et al.*, 2006; Saharan *et al.*, 2004 y Valdivia *et al.*, 2010). Para embriones inmaduros se han utilizado el BAP y la zeatina, en combinación con AIA (Christou *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2002). En este estudio se utilizará la kinetina en conjunto con el ácido naftalenacético, esto debido a que en estudios anteriores llevados a cabo en este laboratorio se han obtenido buenos rendimientos de regeneración con el uso de estos reguladores en variedades costarricenses (Chan, 2001).

CAPÍTULO 3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Optimizar la regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos producidos de embriones inmaduros de arroz (*Oryza sativa*. L var. CR-5272).

3.2 Objetivos Específicos

- a) Comprobar la eficiencia de los embriones inmaduros como explante para la regeneración de vitroplantas.
- b) Determinar el estadio de desarrollo óptimo de los embriones inmaduros de arroz que permita la mayor regeneración de vitroplantas
- c) Comparar la eficiencia de diferentes concentraciones de Kinetina (KIN) y Ácido naftalenacético (ANA) para la regeneración de vitroplantas de arroz a partir de callos embriogénicos.

CAPÍTULO 4. MATERIALES Y MÉTODOS

La investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica.

4.1. Optimización de la desinfección

Primero, se determinó la metodología de desinfección óptima, de la siguiente manera: Se recolectaron veintiún carióspsides de arroz (*Oryza sativa*. L var. CR-5272) en estado de llenado del grano (leche media) de plantas cultivadas en el invernadero. Se desinfectaron en 10 mL de alcohol 75° durante un minuto. Luego, se expusieron a 15 mL de cloro comercial (NaOCl 3% i.a.) y cuatro gotas de Tween 20 durante diez minutos con agitación constante. Se decantó el cloro y se lavaron las carióspsides seis veces con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro y el Tween 20. Seguidamente, en el estereoscopio, y con ayuda de pinzas y bisturíes estériles, se removieron la lemma y la palea que cubren la carióspside, se desinfectaron las carióspsides desnudas con 15 mL de cloro comercial (NaOCl 3% i.a.) y cuatro gotas de Tween 20 durante diez minutos con agitación constante. Luego, se decantó el cloro y se lavaron las carióspsides seis veces con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro y el Tween 20. A siete de las carióspsides se les extrajo el embrión y se sembraron en medio CC suplementado con 2,4-D y caseína hidrolizada (Potrykus *et al.*, 1979). Las otras catorce carióspsides se desinfectaron con 15 ml de Kilol al 50% durante un minuto con agitación suave. Luego, se lavaron cinco veces con agua destilada estéril. A siete de las carióspsides se les extrajo el embrión en una gota de Kilol al 50% y a las otras siete en una gota de Kilol al 1%. Se sembraron los siete embriones de cada metodología en una placa petri con medio CC suplementado con 2,4-D y caseína hidrolizada (Potrykus *et al.*, 1979) y se escogió el procedimiento con el cual se mantuviera la viabilidad de los embriones y se observara la menor contaminación.

Una vez determinada la metodología de desinfección óptima, ésta se acopló al procedimiento desarrollado en esta investigación, el cual se adaptó del descrito por Christou y colaboradores (1991) y Christou & Ford (1995) de acuerdo con lo especificado a continuación. De este procedimiento se llevaron a cabo cinco repeticiones.

4.2. Desinfección de los granos de arroz (*Oryza sativa* L.) e introducción de los embriones inmaduros

En cámara de flujo laminar, se desinfectaron treinta cariósides de arroz en estado de leche media en 10 mL de alcohol 75° por un minuto. Luego, se expusieron a 15 mL de cloro comercial (NaOCl 3% i.a.) y cuatro gotas de Tween 20 durante diez minutos con agitación constante. Se decantó el cloro y se lavaron las cariósides seis veces con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro y el Tween 20.

Seguidamente, en un estereoscopio (marca Optima, modelo ZM-160A), y con ayuda de pinzas y bisturíes estériles, se removieron la lemma y la palea que cubren la cariósida, se desinfectaron las cariósides desnudas con 15 mL de cloro comercial (NaOCl 3% i.a.) y cuatro gotas de Tween 20 durante diez minutos con agitación constante. Luego, se decantó el cloro y se lavaron las cariósides seis veces con agua destilada estéril hasta eliminar el cloro y el Tween 20.

Posteriormente, se realizó otra desinfección de las cariósides con 15 ml de Kilol al 50% durante un minuto con agitación suave. Luego, se realizaron cinco lavados con agua destilada estéril. En una gota de Kilol al 1%, se removió el embrión inmaduro de cada cariósida; se sembraron cinco embriones por placa petri con medio CC suplementado con 2,4-D y caseína hidrolizada (Potrykus *et al.*, 1979) (Anexo 1), con el escutelo en contacto con el medio. Con un vernier (Mitutoyo) se midió cada embrión y luego se colocaron en oscuridad a 25°C durante dos semanas.

4.3. Subcultivo de los callos embriogénicos formados a partir de los embriones inmaduros

En la cámara de flujo laminar, utilizando el estereoscopio y con ayuda de pinzas y bisturíes estériles, se separaron los callos formados de la raíz germinada y se dividió cada callo en aproximadamente cuatro partes iguales. Estos callos se sembraron en medio CC suplementado con caseína y 2,0 mg/L de 2,4-D, agrupando e identificando los callos provenientes de un mismo embrión, y se colocaron en oscuridad a 25°C durante dos semanas. Posteriormente, en cámara de flujo laminar, se dividieron los callos nuevamente y se seleccionaron de ellos las partes embriogénicas. Los callos embriogénicos se subcultivaron en placas petri con medio CC suplementado con caseína y 2,4-D, agrupando nuevamente los callos provenientes de un mismo embrión. Se colocaron las placas en oscuridad a 25°C durante otras dos semanas. Este procedimiento se siguió como parte del protocolo ya establecido de callogénesis, para optimizar el porcentaje de tejido embriogénico que se cultiva en medio de regeneración.

4.4 Ensayo de regeneración de vitroplantas utilizando tres combinaciones de concentraciones de kinetina y ácido naftalenacético.

Una vez transcurrida la fase de inducción de callogénesis y optimización del porcentaje de tejido embriogénico, se subcultivaron los callos en el medio de regeneración adaptado de Zhang *et al.* (2006) (Anexo 2), suplementado con 1, 1.5 y 2 mg/L de kinetina y 0.25, 0.38 y 0.5 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) respectivamente (Cuadro 1). De cada repetición, conformada por treinta embriones, se subcultivaron los callos provenientes de diez embriones en cada tratamiento, de manera que se colocaron cerca de 50 callos en cada uno.

Tabla 4.1. Tratamientos para la regeneración de brotes a partir de callos provenientes de embriones inmaduros de arroz CR- 5272

Tratamiento	Concentración de KIN (mg/L)	Concentración de ANA (mg/L)
1	1	0.25
2	1.5	0.38
3	2	0.5

Estos tratamientos se sometieron a un fotoperiodo de 16 horas luz/ 8 horas oscuridad y a 26°C, subcultivando los callos en medio fresco cada dos semanas durante aproximadamente un mes y medio.

Los callos se evaluaron semanalmente, registrando la cantidad de callos con puntos verdes, callos con brotes, número de brotes, callos sin respuesta y callos necrosados. Posteriormente se registró la cantidad de vitroplantas obtenidas por embrión.

Se evaluó la cantidad de vitroplantas obtenidas de cada embrión, así como la cantidad de callos necrosados u oxidados, con el fin de determinar el tratamiento óptimo para la regeneración de vitroplantas.

4.5. Análisis Estadístico

Se utilizó un Modelo Lineal General (MLG) para determinar diferencias significativas entre los factores: tratamiento y tamaño de embrión, así como su interacción para el número de brotes y de vitroplantas obtenidas a partir de embriones inmaduros. Se comprobó la homogeneidad de varianzas de los datos mediante la prueba Levene (robusta al supuesto de normalidad).

Se graficó la interacción de los factores en un gráfico de medias ajustadas para cada variable de respuesta individual y las interacciones de los factores según un gráfico lineal de medias para ambas variables en una matriz por niveles. Todas las pruebas se analizaron con un nivel de confianza del 95%.

CAPÍTULO 5. RESULTADOS

Las metodologías de desinfección en las que se usó Kilol al 50% para desinfectar las cariósides fueron las que presentaron menor contaminación (datos no mostrados), sin embargo, la desinfección de los embriones con Kilol al 50% causa que éstos pierdan su viabilidad, razón por la cual se empleó Kilol al 1%

El protocolo de inducción de callogénesis a partir de los embriones zigóticos inmaduros permitió la inducción de callos embriogénicos y la reconversión en vitroplantas a partir de los mismos. Un 76% de los embriones inmaduros inoculados en medio de callogénesis formó callo, un 6% de los embriones no reaccionó al tratamiento de callogénesis y un 18% se contaminaron (Figuras 5.1 y 5.2), a pesar del proceso de optimización de la desinfección de los granos y embriones, la contaminación de los mismos sigue siendo importante.

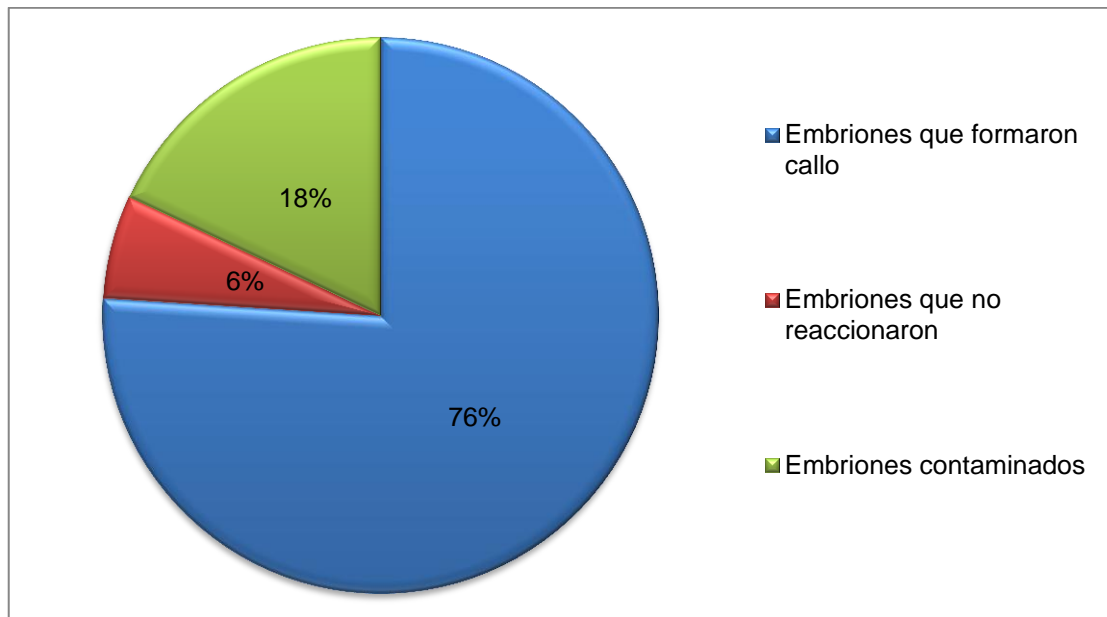


Figura 5.1. Porcentaje de embriones inmaduros introducidos a medio de callogénesis que formó callo, que no reaccionó ante la inducción y que se contaminó.



Figura 5.2. Algunas situaciones observadas después de la introducción de algunos embriones inmaduros de arroz (*Oryza sativa*) de la variedad CR-5272. a) Embrión inmaduro que no reaccionó ante la inducción de callogénesis. b) y c) Embriones inmaduros contaminados por bacterias. d) Embrión inmaduro contaminado por hongo.

Los callos obtenidos se formaron a partir del escutelo de los embriones inmaduros a las dos semanas de cultivo en el medio de callogénesis (Figura 5.5. b). Al subcultivarlos, duplicaron su tamaño después de dos semanas. Se formaron callos de todos los tipos: de color crema, compactos y organizados (tipo I), amarillos y organizados (tipo II), amarillos y desorganizados (tipo III) y blancos y altamente desorganizado (tipo IV) (Vega *et al.*, 2009). Se observó que aproximadamente la mitad de los callos obtenidos fueron embriogénicos. (Figura 5.3). Los callos presentaron buen crecimiento y no se dio oxidación o necrosamiento de los mismos.

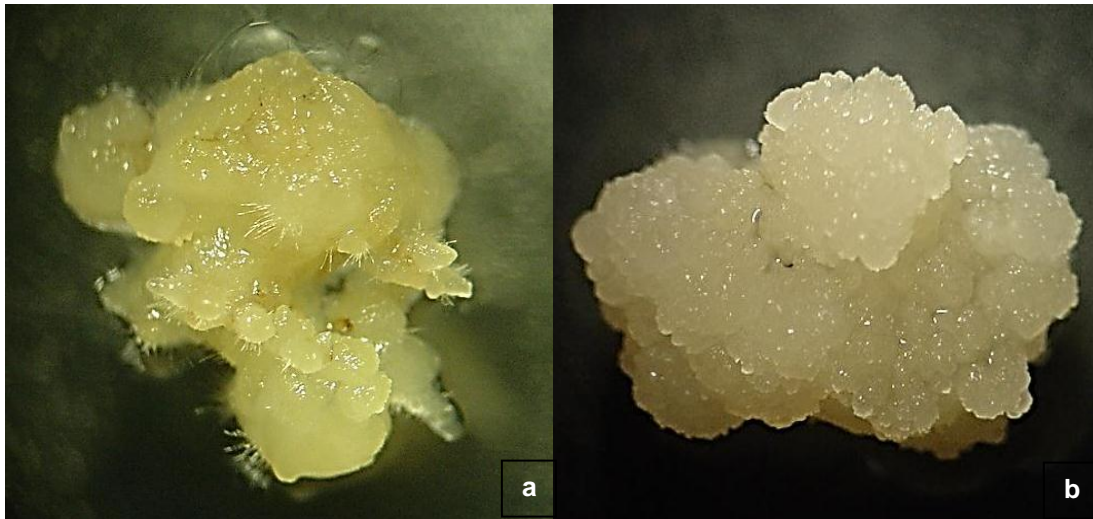


Figura 5.2. Callos inducidos a partir de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272. a) Callo no embriogénico. b) Callo embriogénico

Además, durante el desarrollo de los callos, a las tres a cuatro semanas de estar en medio de calogénesis, se observó la aparición de embriones somáticos en los mismos (Figura 5.4).

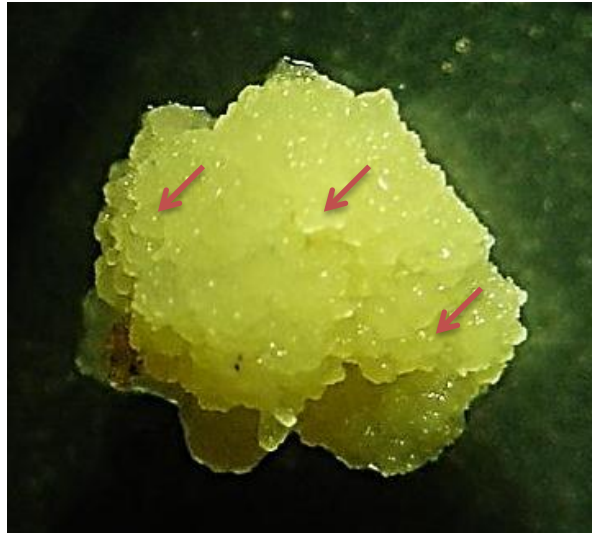


Figura 5.3. Embriones somáticos observados en los callos inducidos a partir de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272.

Por medio de la metodología de regeneración propuesta en este trabajo, se consiguió la regeneración de vitroplantas a partir de los mismos (Figura 5.5). Después de la primera semana en el medio de regeneración, se dio la aparición de zonas verdes en los callos (Figura 5.5, d) y luego de tres semanas en medio de regeneración se formaron los primeros brotes (Figura 5.5, g); para finalmente alcanzar la obtención de las primeras vitroplantas a las cinco semanas en medio de regeneración. La utilización de embriones inmaduros para la inducción de callos permitió la obtención de un número variable de plantas por embrión que fue desde cero hasta 79 vitroplantas por embrión con un promedio de $5,39 \pm 12,06$ vitroplantas por embrión.



Figura 5.4. Secuencia del desarrollo de vitroplantas a partir de embriones inmaduros de arroz CR-5272 mediante embriogénesis somática indirecta. a) Embrión inmaduro recién inoculado (día cero) de 1,9 mm de longitud. b) Formación de callo a las dos semanas en el medio de calogénesis. c) Callo embriogénico a las cuatro semanas en el medio de calogénesis. d) Aparición de zonas verdes, aproximadamente a los diez días en medio de regeneración. e) Formación de zonas meristemáticas a las dos semanas en medio de regeneración. f) Desarrollo de brotes de las tres a seis semanas en medio de regeneración. g) Elongación de brotes de las tres a seis semanas en medio de regeneración. h) Formación de vitroplantas de las cinco a seis semanas en medio de regeneración. i) Enraizamiento y separación en vitroplantas individuales después de seis semanas en regeneración.

Al separar las vitroplantas obtenidas del callo del que provenían, se observó un suspensor que conectaba ambas estructuras (Figura 5.6).



Figura 5.6. Suspensor que conecta las vitroplantas obtenidas con los callos de los que provienen.

No se encontraron diferencias significativas en relación al número de brotes ($p > 0,146$) ni el número de vitroplantas ($p > 0,257$) según el tratamiento aplicado; tampoco se observaron diferencias significativas entre los tamaños del embrión en cuanto a la formación de brotes ($p > 0,276$) o vitroplantas ($p > 0,807$). Asimismo, la prueba de varianza GLM no demostró interacción entre el tratamiento y el tamaño del embrión para ninguna de las dos variables evaluadas, brotes por embrión ($p > 0,832$) y vitroplantas por embrión ($p > 0,569$) (Tabla 5.1).

Tabla 5.1. Valor del estadístico p para las pruebas de varianza GLM para las variables de respuesta: Brotes/embrión y Vitroplantas/embrión. Nivel de confianza del 95%.

Factor	Valor de p según variable de respuesta	
	Brotes/embrión (DE 10,99; R ² 6,98%)	Vitroplantas/embrión (DE 12,15; R ² 2,81%)
Tratamiento	0,146	0,257
Tamaño del embrión	0,276	0,807
Tratamiento X Tamaño del embrión	0,832	0,569

DE= Desviación Estándar

R²= Coeficiente de determinación

Fuente: Laboratorio de Biotecnología del Arroz, Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos, CIBCM

Además, mediante la prueba de varianza de MLG se comprobaron los supuestos de normalidad de los residuos y aleatorización de los datos. Adicionalmente, mediante la prueba de Levene, se demostró que existe igualdad de varianzas para las variables de respuesta, brotes ($p=0,838$) y vitroplantas ($p=0,751$). Se utilizó la prueba de Levene ya que es robusta al supuesto de normalidad de los datos, por lo cual es adecuada para el análisis de datos que, al ser respuestas de organismos biológicos, suelen tener una distribución poco normal. Al comprobarse los supuestos de normalidad de los residuos, aleatorización de los datos e igualdad de varianzas, se demuestra que la prueba de varianza MLG es apropiada y estadísticamente válida para el análisis de los datos de esta investigación.

Por otro lado, aunque no se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre los factores evaluados, sí se obtuvieron tendencias, las cuales se pueden observar en los gráficos de las figuras 5.7, 5.8 y 5.9.

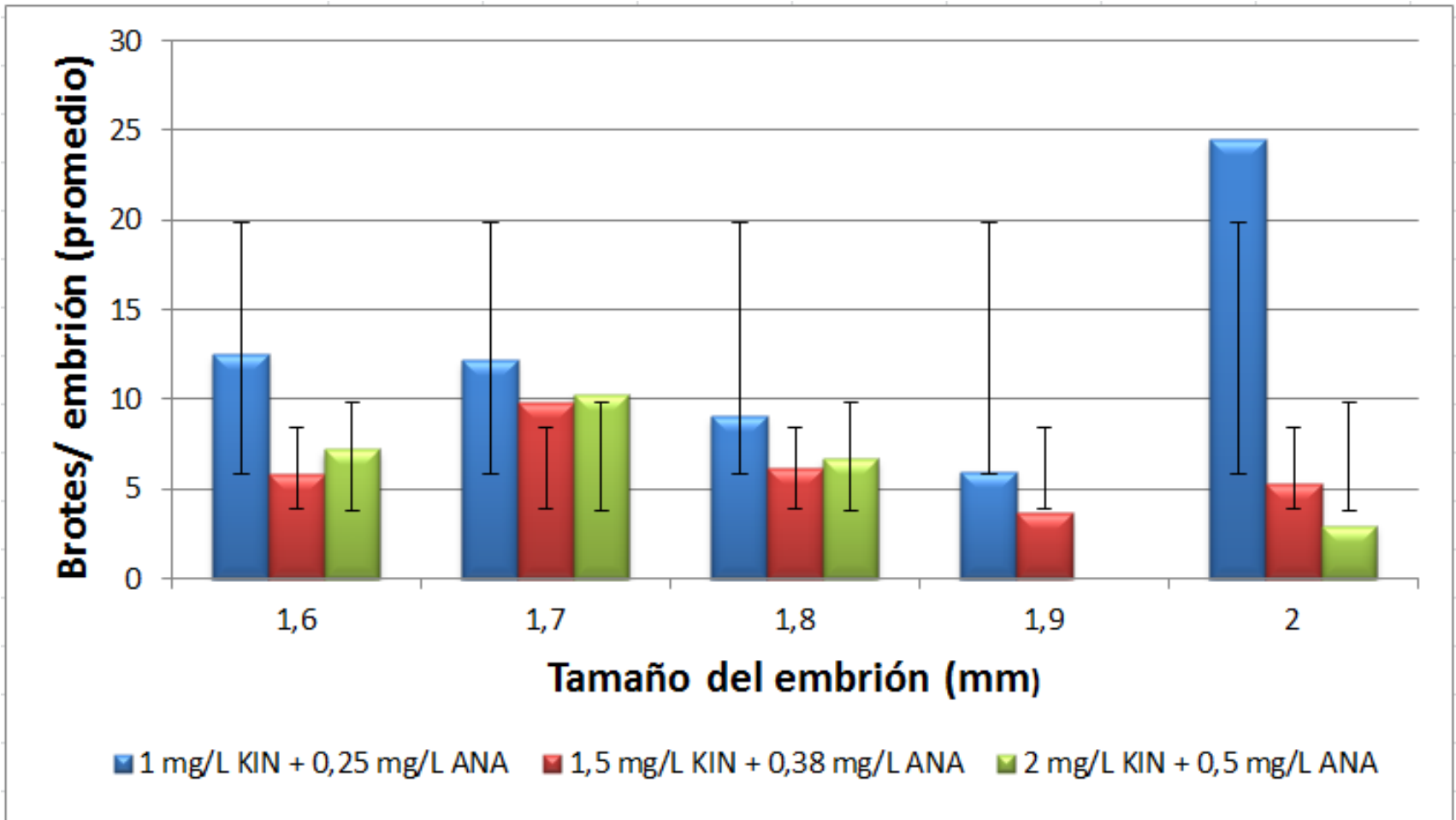


Figura 5.5. Efecto de los factores tratamiento y tamaño del embrión sobre el número de brotes obtenidos por embrión. Fuente: Laboratorio de Biotecnología del Arroz, Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos, CIBCM. Las barras representan la desviación estándar de los datos de un mismo tratamiento.

En la figura 5.7 se observa que en promedio para los embriones de todos los tamaños el mayor número de brotes se obtuvo en el tratamiento en el que la regeneración se realizó en un medio CC suplementado con 1 mg/l KIN + 0.25 mg/l ANA. Así mismo, la mayor cantidad de brotes se obtuvo utilizando embriones de 2,0 mm de longitud, en los que en promedio se cuantificaron $25 \pm 16,26$ brotes por embrión.

Por otro lado, el mayor número de vitroplantas se obtuvo al utilizar embriones de 1,9 a 2,0 mm de longitud con este tratamiento. Cabe destacar que en el caso de los embriones de menor tamaño ,1,6 y 1,7 mm, el mayor número de plantas se obtuvo en un medio con el tratamiento en el que se utilizó el doble de la concentración de los reguladores (2 mg/l KIN + 0.5 mg/l ANA) (Figura 5.8).

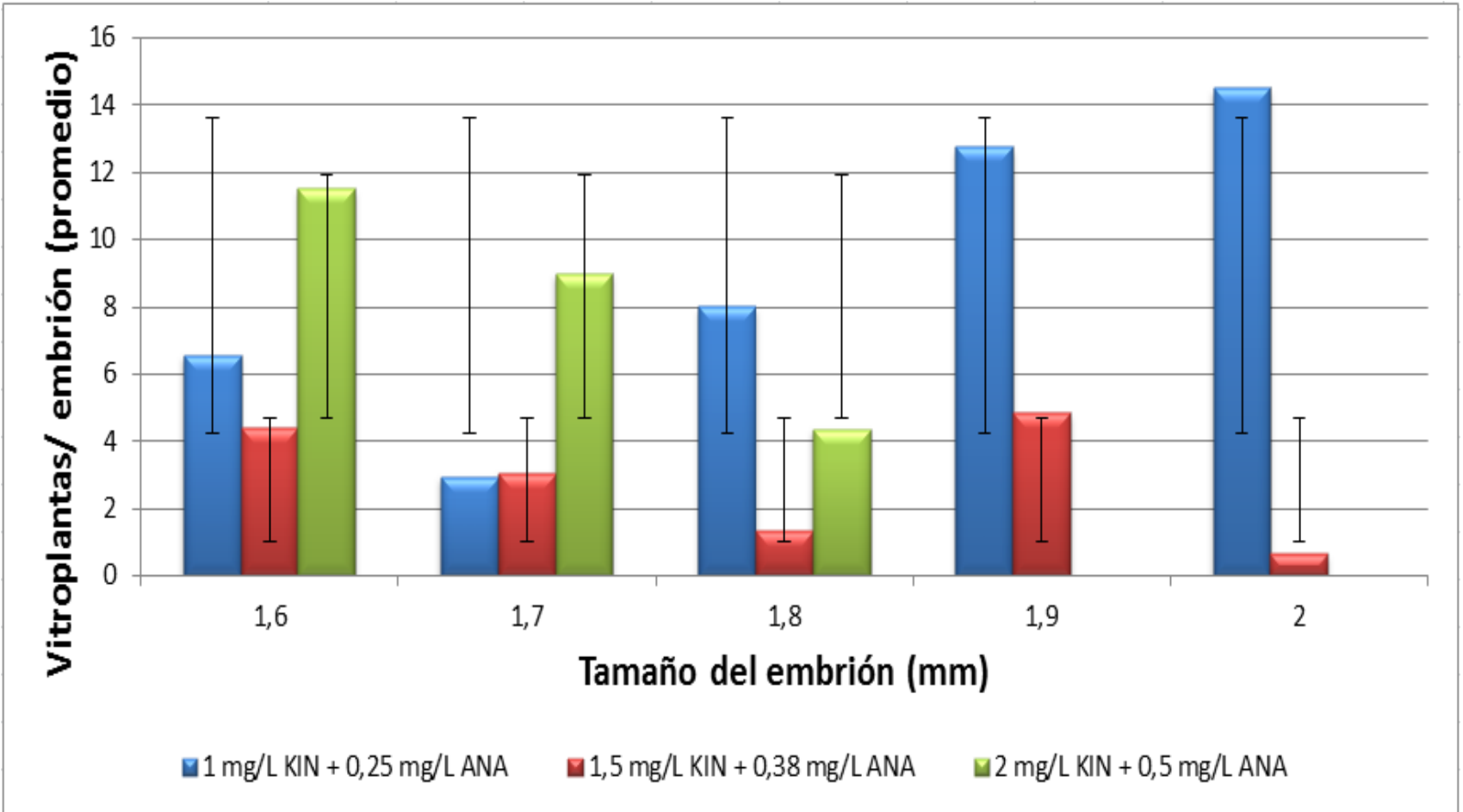


Figura 5.6. Efecto de los factores tratamiento y tamaño del embrión sobre el número de vitroplantas obtenidas por embrión. Fuente: Laboratorio de Biotecnología del Arroz, Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos, CIBCM. Las barras representan la desviación estándar de los datos de un mismo tratamiento.

En general, el mayor número de brotes y vitroplantas se obtuvo inoculando embriones de 2 mm de longitud en medio con el tratamiento de 1mg/L de KIN + 0,25 mg/L de ANA (Figura 5.9). Es importante notar que con este tamaño de embrión a las seis semanas de estar en el medio de regeneración todavía se tiene una mayor proporción de brotes que de vitroplantas (0,59 vitroplantas por cada brote), por lo cual se puede suponer que si los brotes se dejan más tiempo en medio de regeneración podría obtener un mayor número de plantas que el reportado en este trabajo. Por el contrario, se puede notar que a las seis semanas en medio de regeneración la mayor proporción de vitroplantas con respecto a brotes se obtuvo inoculando un embrión de 1,9 mm de longitud en medio de cultivo con el tratamiento de 1mg/L de KIN + 0,25 mg/L de ANA, se tendrán 2,13 vitroplantas por cada brote. Esto significa que al final de este intervalo de tiempo la mayoría de los brotes se habrán convertido en vitroplantas y que por lo tanto este tamaño de embrión es más apropiado cuando se desea que el mayor potencial de regeneración se haya alcanzado a las seis semanas de estar en este tipo de medio de cultivo. Por otro lado, no hubo regeneración (de brotes o vitroplantas) al inocular embriones de 1,9 mm en medio de cultivo con el tratamiento de 2mg/L de KIN + 0,5 mg/L de ANA, y tampoco se dio la formación de vitroplantas al inocular embriones de 2 mm en este mismo tratamiento (Figura 5.9).

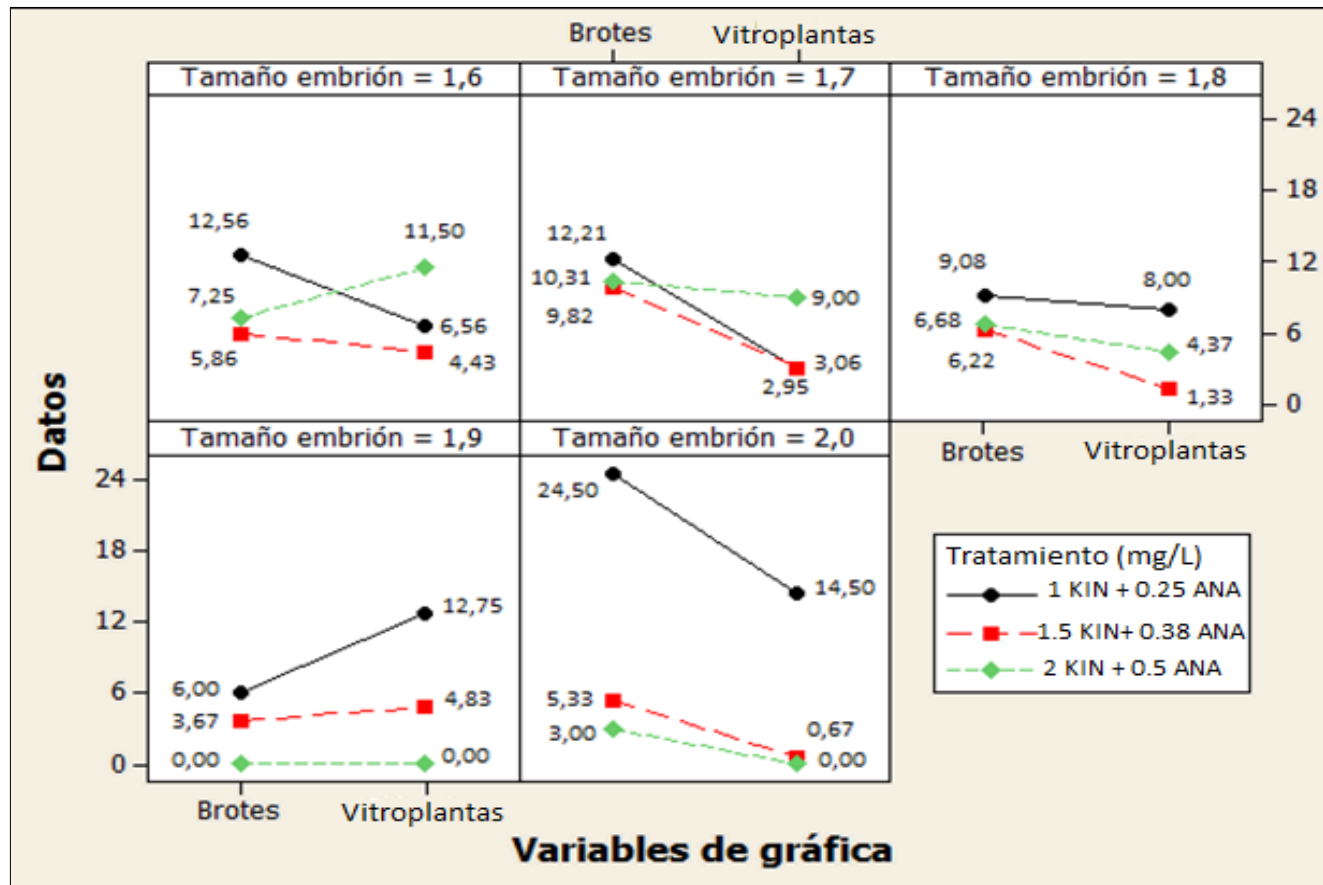


Figura 5.7. Resumen del número de brotes y vitroplantas (medias) obtenidos por embrión a partir de los embriones de cada tamaño inoculados en cada tratamiento. Fuente: Laboratorio de Biotecnología del Arroz, Programa de Mejoramiento Genético de Cultivos, CIBCM.

Es importante destacar que durante la fase de regeneración se observó una oxidación significativa y progresiva de los callos con cada subcultivo (Figura 5.10.a). Cada vez que los callos se subcultivaron se les eliminó las zonas necrosadas, pero al evaluarlos una semana después de haber sido subcultivados, se observó que varios de ellos se oxidaron completamente y que casi la totalidad de los mismos presentaron una oxidación parcial en las zonas en las que habían sido cortados (para eliminar las zonas necrosadas) y en las que estaban en contacto con el medio. Posteriormente, los callos y las zonas oxidadas se necrosaron en todos los casos. Esta oxidación se observó primero en los callos en los que no se dio regeneración y llegó a afectar a todos estos callos. Con cada subcultivo se oxidaron más callos, y un número importante de los que se oxidaron completamente perdieron los brotes que poseían. Los callos que se necrosaron parcialmente lograron conservar la mayoría de sus brotes, especialmente si éstos presentaban un crecimiento significativo al momento del subcultivo. También se observó la oxidación del medio alrededor de los callos oxidados, formando un halo cuyo diámetro aumentaba con el paso del tiempo. Algunos halos de oxidación llegaron a afectar callos vecinos y a propiciar su oxidación.

Por otro lado, se dio la contaminación de algunos callos por una bacteria rosada (Figura 5.10.b), lo cual, al igual que la oxidación, se dio primero en los callos que no presentaron regeneración, y posteriormente llegó a afectar callos con brotes y vitroplantas. Esta bacteria presentó un crecimiento muy rápido y una alta capacidad para infectar callos vecinos, pues en pocos días se transmitía a los demás explantes contenidos en una placa petri, llevando a la necrosis de los callos afectados por ella. La contaminación por esta bacteria no se considera un caso aislado, pues se dio, en menor o mayor proporción, en las cinco repeticiones del experimento de este trabajo.

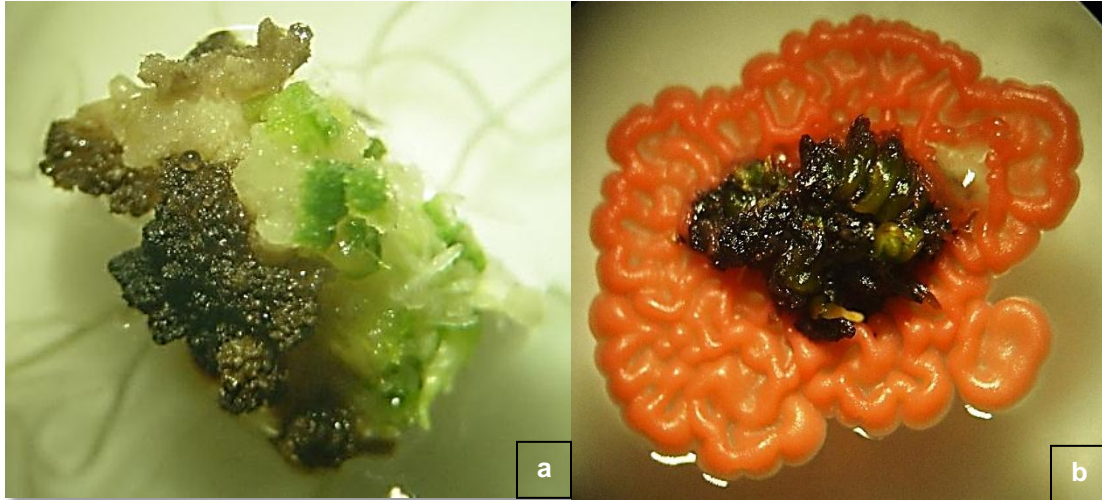


Figura 5.8. Algunas observaciones realizadas durante la fase de regeneración de vitroplantas a partir de cellos inducidos de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272. a) Oxidación de los callos durante la fase de regeneración. b) Contaminación de los callos por una bacteria rosada no identificada.

CAPÍTULO 6. DISCUSIÓN

Al utilizar embriones inmaduros, se observó una contaminación importante de los mismos, a pesar del proceso de optimización de la metodología de desinfección que se realizó. Durante la extracción del embrión de la semilla inmadura, ésta todavía posee endospermo líquido el cual entra en contacto con y llega a recubrir el embrión. Se cree que la gran cantidad de nutrientes que posee este endospermo pudo propiciar la contaminación de los embriones.

En cuanto a la eficiencia de regeneración a partir de embriones inmaduros, el número de vitroplantas obtenidas en promedio ($5,39 \pm 12,06$ por embrión) concuerda con lo reportado por Hiei & Komari (2008), quienes lograron regenerar de cinco a trece vitroplantas de cada embrión inmaduro de tres variedades de arroz de la subespecie *indica*, y lo supera si se toma en cuenta en la presente investigación se logró obtener hasta 79 vitroplantas de un solo embrión.

En comparación con estudios anteriores realizados en el Laboratorio de Biotecnología del Arroz del CIBCM al utilizar callos derivados de embriones maduros de arroz CR-5272 se obtuvieron alrededor de 0,26 vitroplantas por embrión, variando desde 0,02 hasta 1 planta por embrión y regenerados en un medio MS con 2 mg/L KIN¹, lo cual demuestra que para esta variedad los embriones inmaduros son más aptos para la regeneración de vitroplantas pues es un tejido con una mayor totipotencialidad que el tejido maduro (Saharan *et al.*, 2006). Esto concuerda con las conclusiones de Carsono & Yoshida (2006) y Hoque & Mansfield (2004) quienes indican que los embriones inmaduros y tejidos meristemáticos, al estar constituidos por células indiferenciadas, son en general más apropiados para la inducción de callo y la posterior regeneración de plantas, que los tejidos maduros. Más aún, Hoque & Mansfield (2004) observaron que en arroz, los embriones inmaduros resultaron ser los explantes con mayor respuesta para el cultivo *in vitro*. Asimismo, Saito y colaboradores (2011) desarrollaron una metodología de transformación de embriones inmaduros mediante *Agrobacterium* que, de acuerdo con lo reportado, les permite una regeneración eficiente de plantas de arroz transgénicas ya que mediante el uso de este explante logran regenerar plantas rápidamente, lo que concuerda con lo observado en este estudio.

La utilización de embriones inmaduros para la obtención de mejores porcentajes de regeneración se reporta en otras especies de cereales tales como la cebada (*Hordeum vulgare* L.) (Hussein *et al.*, 2004), el sorgo (*Sorghum bicolor*) (Pola *et al.*, 2008), el trigo (*Triticum aestivum* L.) (Keresa *et al.*, 2004) y el maíz (*Zea mays* L.) (Biott *et al.*, 2008; Zhu *et al.*, 2011), así como en otros tipos de cultivo como el tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) (Gebologlu *et al.*, 2011) y la palma aceitera (*Elaeis guineensis* Jacq.) (Abdullah *et al.*, 2005).

¹ AGUILAR C. 2011. Experimento de las variedades. Laboratorio de Biotecnología del Arroz, CIBCM (comunicación personal).

Por otra parte, el proceso de generación de callo embriogénico observado durante este experimento, concuerdan con lo reportado por Vega *et al.* (2009) en embriones maduros de la variedad CR-5272. Por ejemplo, en esta investigación a las tres semanas de inoculación del embrión inmaduro en el medio de callogénesis, se observó en los callos embriogénicos la formación de estructuras similares a las descritas por Vega *et al.* (2009) y denominadas embriones somáticos. Esto indica que en este experimento se desarrolló un proceso de embriogénesis somática similar al descrito con detalle en el estudio mencionado. Esto es un resultado esperado, ya que, tanto en embriones maduros como en inmaduros, la formación del callo embriogénico se da a partir de las células del escutelo, independientemente del grado de madurez del explante.

En cuanto al proceso de regeneración, Abdul y colaboradores (2010) también obtuvieron brotes de arroz *indica* a las tres semanas de cultivo en medio de regeneración. En arroz aromático Hossain y colaboradores (2006) observaron la aparición de regiones verdes en los callos a los siete u ocho días de estar en regeneración y la formación de vitroplantas entre las dos a cuatro semanas de cultivo, con la mayor frecuencia de regeneración a las cuatro semanas. Mientras que en arroz del tipo glutinoso (Thadavong *et al.*, 2002) se observó la aparición de puntos verdes a la semana de que el callo se colocara en regeneración y se obtuvieron brotes a las dos semanas. Estos periodos de tiempo y la secuencia del proceso son similares a lo observado en este experimento.

El suspensor que se observó en las vitroplantas y que las sostenía al callo del que provenían también ha sido descrito en estudios realizados sobre la embriogénesis somática a partir de embriones maduros de arroz de la variedad CR-5272 (Vega *et al.*, 2009) y es evidencia de que en esta investigación las vitroplantas se desarrollaron mediante un proceso de embriogénesis somática similar al del estudio citado.

En el Laboratorio de Biotecnología del Arroz se utiliza una dosis de 2 mg/L de KIN y 0,5 mg/L de ANA para la regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos inducidos de semilla madura de arroz de variedades costarricenses (Chan, 2001). En contraste, en este estudio se observó que los mejores resultados de regeneración, tanto para brotes como para vitroplantas, se obtuvieron con el tratamiento de 1 mg/L de KIN y 0,25 mg/L de ANA. Esto puede deberse a que los embriones inmaduros están constituidos por células indiferenciadas, que, al estar en proceso de desarrollo y con una alta actividad metabólica, pueden reaccionar más rápidamente a bajas concentraciones de reguladores de crecimiento, mientras que concentraciones altas les pueden resultar tóxicas.

La utilización de una menor concentración de reguladores de crecimiento para la regeneración de las vitroplantas a partir de callos inducidos de embriones inmaduros de arroz se observa en diferentes estudios. Por ejemplo, diversos autores (Abdul *et al.*, 2010; Hossain *et al.*, 2006; Khalequzzaman *et al.*, 2005; Saqlan *et al.*, 2006; Saharan *et al.*, 2004; Valdivia *et al.*, 2010) utilizan concentraciones de 2- 5 mg/L de citoquinina junto con 0,5- 1 mg/L de auxina para la regeneración de vitroplantas a partir de callos obtenidos de embriones de arroz maduros, mientras que para la de embriones inmaduros se reporta la utilización de 1- 2 mg/L de citoquinina en combinación con 0,05-1 mg/L de auxina (Christou *et al.*, 1991; Liu *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 1999). Más específicamente, algunos estudios demuestran que los mejores resultados de regeneración a partir de callos inducidos de embriones inmaduros de arroz tipo *indica* se obtiene al utilizar 2 mg/L de Benciladenina (BA) en combinación con 0,05- 1 mg/L de ANA (Liu *et al.*, 2002; Sharma *et al.*, 1999), esto es comparativo con lo observado en este estudio si se toma en cuenta que en otras investigaciones se suele utilizar una concentración de hasta 5 mg/L de BA para regenerar callos inducidos de embriones maduros (Hossain *et al.*, 2006).

En cuanto al tamaño óptimo de embrión para la regeneración más eficiente, se observaron los mejores resultados con la utilización de embriones de entre 1,9 y 2,0 mm de longitud, pues el primer tamaño permite obtener la mayor proporción de vitroplantas con respecto a brotes y el segundo la mayor cantidad de vitroplantas a las seis semanas de regeneración además del potencial de regenerar más plantas si los brotes se dejan por más tiempo en este tipo de medio. Esto difiere de lo establecido por Christou y colaboradores (1991) y Christou & Ford (1995) pues ellos recomiendan en su protocolo para la transformación genética de arroz tipo *indica* y su posterior regeneración la utilización de embriones entre 0,5 y 1,5 mm, lo cual podría deberse a una mayor recalcitrancia de la variedad costarricense que requiera la inoculación de un embrión más desarrollado para su óptima regeneración. Este resultado refleja la importancia de la optimización de protocolos de cultivo *in vitro* para el genotipo específico con que se trabaje.

En comparación con los demás tamaños de embrión evaluados en este trabajo, la mayor eficiencia para la regeneración demostrada por los embriones de mayor tamaño pudo corresponder a que estos embriones al estar más desarrollados sean más aptos para sobrevivir al estrés ocasionado por los tratamientos de regeneración y los subcultivos. Esto contradice lo observado por Gupta y colaboradores (2004) quienes pusieron a prueba la efectividad para la callogénesis y la regeneración de diferentes tamaños de embriones inmaduros de sorgo (*Sorghum sudanenses* Piper) y observaron mejores resultados con los embriones entre 0,7 y 1,5 mm que con los embriones entre 1,6 y 2.5 mm; ellos concluyeron que esto se debió a la germinación frecuente y el desarrollo de callo no embriogénico a partir de los embriones de mayor tamaño. Se piensa que en el caso de la variedad CR-5272, los embriones entre 1,6 y 1,8mm de longitud no se encuentran completamente formados, lo que puede perjudicar su capacidad para regenerar vitroplantas.

Aunque no exista diferencia significativa entre los factores evaluados en este estudio (tamaño del embrión, tratamiento y su interacción), se puede observar que la mayor regeneración a partir de callos inducidos de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272 se logró con la inoculación de embriones de entre 1,9 y 2 mm de longitud y su regeneración en medio suplementado con 1 mg/L de KIN y 0,25 mg/L de ANA, pues fueron los que presentaron mayor media (número de vitroplantas).

El lograr recolectar embriones del tamaño recomendado está sujeto a la experiencia del investigador y no siempre se puede controlar, por lo que se recomienda la realización de un estudio que correlacione los días después de la antésis del grano con la longitud de su embrión, la cual es una medida del desarrollo del embrión o del grano a la que es más fácil darle seguimiento a nivel de laboratorio. Además, se debe notar que, de acuerdo a los resultados obtenidos, en el caso de que se extraigan embriones de tamaños menores a los óptimos o de que no sea posible realizar la correlación antes mencionada, los embriones se pueden inocular de acuerdo a su tamaño en un medio de cultivo con concentraciones de reguladores de crecimiento específicas en los cuales se esperaría que logran los mejores porcentajes de regeneración; por ejemplo, un embrión de 1,6 mm se podría inocular en un medio con 2 mg/L KIN con 0,50 mg/L ANA para propiciar la mayor obtención de vitroplantas a partir del mismo (Figura 5.9).

Por otra parte, como se mencionó anteriormente, durante la fase de regeneración se observó una oxidación importante de los callos durante cada subcultivo y la posterior necrosis de muchos de ellos, lo cual llevó a la pérdida de brotes y por lo tanto se cree que pudo afectar el número de brotes y vitroplantas obtenidas. La oxidación de tejidos cultivados *in vitro* es causada por radicales libres de diferentes componentes celulares, así como por la oxidación de compuestos fenólicos catalizada por la polifenol oxidasa para producir quinonas, las cuales son compuestos muy reactivos que generan daño y muerte celular (Azofeifa, 2009).

Este fenómeno se ha reportado frecuentemente en la propagación *in vitro* de arroz utilizando medios de cultivo sólidos (Chan, 2001), y en este estudio se dio en todos los callos independientemente del tratamiento en que se encontraran y del tamaño del embrión del que provinieran; pero sí sucedió primero y en mayor medida en los callos en los que no se dio regeneración. Muchos de los radicales libres se producen a partir del metabolismo del oxígeno y son denominados especies de oxígeno reactivo (ROS), pero también pueden generarse en organelas celulares como los peroxisomas y los lisosomas a causa de los cortes realizados a un explante ((Azofeifa, 2009). Los callos no embriogénicos están constituidos por células desorganizadas y con amplios espacios intracelulares (Carsono & Yoshida, 2006) estos espacios suelen formarse por la autólisis de las células (Vega *et al.*, 2009) lo que se piensa pudo originar la oxidación en estos callos. Se ha observado que la célula vegetal sometida a un estrés reacciona produciendo mayores cantidades de ROS lo cuales generan una reacción en cascada cuando el electrón libre se transfiere de una molécula a otra (Azofeifa, 2009). El estrés oxidativo es causado principalmente por factores como el agente desinfectante utilizado previo a la introducción del explante, la composición del medio de cultivo, los cortes que sufre el explante, entre otros (Azofeifa, 2009). En esta investigación se cree que la oxidación de los callos se debió principalmente a la manipulación de los mismos durante los subcultivos, agravado por el estrés ocasionado al tejido por el hecho de estar en un medio de regeneración; en este sentido considera conveniente la realización de un estudio el que se evalúe la posibilidad de incrementar los tiempos entre cada subcultivo para disminuir el daño a los explantes.

Además, la gran magnitud de oxidación demuestra que es necesaria la optimización del medio de cultivo utilizado para la fase de regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos obtenidos de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272.

Por ejemplo, se considera que se deben llevar a cabo investigaciones en las que se estudie la utilización de otros medios de cultivo para la fase de regeneración, por ejemplo, en un ensayo anterior realizado por la autora en el Laboratorio de Biotecnología del Arroz (datos no mostrados) se observó una menor oxidación en callos de embriones inmaduros inoculados en medio MS. Esto difiere de lo reportado por Carsono y Yoshida (2006) quienes en su estudio observaron una menor oxidación de los callos inoculados en medio CC en comparación con los inoculados en medio MS; esta diferencia se puede deber a que estos callos fueron inducidos a partir de embriones maduros y secciones de raíz de diferentes variedades de arroz *indica*. Así mismo, se puede considerar la adición al medio de antioxidantes como el ácido ascórbico, ácido cítrico, L- cisteína, y polivinilpirrolidona (PVP) (Alvarenga *et al.*, 2009).

Se debe tomar en cuenta que, durante la fase de callogénesis no se observó oxidación de los callos y se dio un buen desarrollo de los mismos, por lo que el medio CC sí se considera adecuado para la callogénesis de embriones inmaduros de la variedad CR-5272. Esto es un resultado esperado ya que el medio CC posee agua de coco, la cual es fuente de azúcares, vitaminas y aminoácidos; además es suplementado con caseína enzimática hidrolizada, fuente de nitrógeno (Alvarenga *et al.*, 2009), todo lo cual propicia el desarrollo de callo embriogénico (Saharan *et al.*, 2006; Thadavong *et al.*, 2002).

En cuanto a la contaminación observada, Chan (2001) también observó la aparición de una bacteria rosada durante la fase de regeneración de callos inducidos a partir de semilla madura de la variedad CR-5272. Este autor expresó que se trata de una bacteria endógena que no se manifiesta durante la fase de callogénesis y que puede causar la muerte de los explantes en la etapa de regeneración (Chan, 2001). Además, se debe tomar en cuenta que el medio CC posee agua de coco, la cual es una fuente importante de nutrientes que pudo haber propiciado la contaminación.

De igual manera, se debe notar que se observó una bacteria similar al introducir los embriones, pudo darse que alguna de estas bacterias se haya mantenido entre el tejido desorganizado del callo sin entrar en contacto con el medio y que, durante la manipulación en la fase de regeneración hayan logrado desarrollarse. Por esta situación es conveniente la realización de estudios que permitan determinar la fuente de dicha contaminación para así poder tomar cursos de acción para su prevención.

Por otra parte, es vital considerar que durante este trabajo no se dio la selección de tejido durante la fase de regeneración, es decir, se subcultivaron todos los callos no necrosados, ya sea que éstos presentaran regeneración o no. Dado que tanto la oxidación como la contaminación se dio primero en los callos que no presentaron regeneración, éstos pudieron propiciar la inducción de estos dos fenómenos en los callos con brotes o vitroplantas. Por esto, se determinó que una medida preventiva puede ser la eliminación del tejido no embriogénico o sin capacidad de regeneración tan pronto como éste se detecte en la etapa de regeneración.

Finalmente, debe mencionarse que la regeneración de vitroplantas a partir de embriones inmaduros es una metodología que para la variedad CR-5272 permite obtener un mayor número de plantas que el que se obtiene con otros protocolos, y que si se toman algunas medidas como las mencionadas anteriormente, este número se puede aumentar aún más. Por lo tanto, el siguiente paso consiste en la adaptación de esta metodología a la transformación genética, en la cual se espera obtener un mayor número de plantas transgénicas que las obtenidas hasta el momento.

CAPÍTULO 7. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Se logró la optimización de la regeneración de vitroplantas a partir de callos embriogénicos producidos de embriones inmaduros de arroz (*Oryza sativa*. L var. CR-5272).

Se comprobó la eficiencia de los embriones inmaduros como explante para la regeneración de vitroplantas. Los embriones inmaduros son un tejido más apto para lograr una regeneración eficiente a partir de callos embriogénicos de arroz de la variedad CR-5272, que los embriones maduros.

Para la regeneración de vitroplantas a partir de callos inducidos de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272, se debe utilizar una concentración menor de reguladores de crecimiento que la que se utiliza para embriones maduros.

Para una regeneración óptima a partir de callo embriogénico inducido de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272 se recomienda el uso de embriones de entre 1,9 y 2mm de longitud y su regeneración en medio suplementado con 1 mg/L de kinetina y 0,25 mg/L de ácido naftalenacético.

Se aconseja que se lleve a cabo un estudio en el que se correlacione el tamaño del embrión con los días después de la antésis que posea la semilla.

Se recomienda la realización de un estudio en el que se evalúe la utilización de un medio de cultivo diferente para la fase de regeneración de los callos embriogénicos inducidos de embriones inmaduros de arroz de la variedad CR-5272, así como tiempos de subcultivo más extensos y la incorporación de antioxidantes al medio para reducir la oxidación.

Así mismo, se sugiere la eliminación del tejido no embriogénico o que no presente formación de brotes o vitroplantas durante la fase de regeneración, para disminuir la oxidación y la contaminación.

Se aconseja además la realización de una investigación en la que se determine la fuente de contaminación observada durante la regeneración para poder tomar medidas para su prevención.

CAPÍTULO 8. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul, Z. ; Ahmad, Z. ; Roowi, S. ; Basirun, N. ; Subramaniam, S. 2010. Production of transgenic *indica* rice (*Oryza sativa* L.) Cv. MR 81 via particle bombardment system. Emir. J. Food Agric. 22(5): 253-366.
- Abdullah, R. ; Zainal, A. ; Yew, W. ; Chui, L. ; Chee, Y. ; Mei, L. 2005. Immature embryo: a useful tool for oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.) genetic transformation studies. Electronic Journal of Biotechnology. 8(1): 24-34.
- Alvarenga, S. ; Alvarado, C. ; Jiménez, V. 2009. Manual de Laboratorio de Cultivo de Tejidos I. Escuela de Biología. Instituto Tecnológico de Costa Rica.
- Azofeifa, Á. (2009). Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. Agronomía Mesoamericana. 20 (1): 153-175.
- Binott, J.J. ; Songa, J.M. ; Njagi, E.M. ; Machuka, J. 2008. Plant regeneration from immature embryos of Kenyan maize inbred lines and their respective single cross hybrids through somatic embryogenesis. African Journal of Biotechnology. 7(8): 981- 987.
- Carsono, N. ; Yoshida, T. 2006. Identification of Callus Induction Potential of 15 Indonesian Rice Genotypes. Plant Production Science. 9(1): 65-70
- Chan, R. 2001. Regeneración de callos de arroz (*Oryza sativa* L.) por medio de la Técnica de Inmersión Temporal (RITA). Informe de Práctica de Especialidad para optar al título de bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Costa Rica. Cartago, Costa Rica. 31p.
- Christou, P. ; Ford, T.L. ; Kofron, M. 1991. Production of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) plants from agronomically important *indica* and *japonica* varieties via electric discharge particle acceleration of exogenous DNA into immature zygotic embryos. Bio/Technology. 9: 957-962.

- Christou, P. ; Ford, T. 1995. Parameter influencing stable transformation of rice immature embryos and recovery of transgenic plants using electric discharge particle acceleration. *Annals of Botany*. 75: 407-413
- Comisión Económica para América Latina y el Caribe [CEPAL]. 2011. Sector Agropecuario de Centroamérica y México. Indicadores Agropecuarios Sectoriales. CEPALSTAT. Bases de datos y publicaciones estadísticas. Disponible en <http://websie.eclac.cl/infest/ajax/cepalstat.asp?carpeta=estadisticas>. Consultado el 29 de junio del 2011.
- Corporación Arrocera Nacional-Costa Rica [CONARROZ]. 2011. Estadísticas Arroceras. Disponible en: <http://www.conarroz.com/>. Consultado el 29 de junio del 2011.
- Coudert, Y. ; Perin, C. ; Courtois, B. ; Gantet, P. 2010. Mejora del arroz. *Investigación y Ciencia*. 409: 32-40.
- Endress, R. 1994. *Plant Cell Biotechnology*. Springer- Verlag. Berlin, Alemania. 353p.
- Espinoza, A.M. ; Arrieta-Espinoza, G. 2007. A multidisciplinary approach directed towards the commercial release of transgenic herbicide-tolerant rice in Costa Rica. *Transgenic Research*. 16(5): 541-555.
- García, E. ; Lozoya, E. 2004. Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 22(3): 414-422.
- Gebologlu, N. ; Bozmaz, S. ; Aydin, M. ; Cakmak, P. 2011. The role of growth regulators, embryo age and genotypes on immature embryo germination and rapid generation advancement in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *African Journal of Biotechnology*. 10(24): 4895- 4900.

- Gupta, S. ; Khanna, V. ; Singh, R. , Garg, G. 2004. Identification of *in vitro* responsive immatures embryo size for plant regeneration in Sudan grass (*Sorghum sudanenses* Piper). Indian Journal of Biotechnology. 3: 124- 127.
- Hiei, Y. ; Komari, T. 2008. Agrobacterium-mediated transformation of rice using immature embryos or calli induced from mature seed. Nature Protocols. 3: 824 -834.
- Hoque, E. ; Mansfield, J. 2004. Effect of genotype and explant age on callus induction and subsequent plant regeneration from root-derived callus of *Indica* rice genotypes. Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 78: 217- 223.
- Hossain, M.B. ; Kumar, P. ; Abdullah-Al Mamun, M. ; Raihan, M. ; Mahbubur, S. 2006. *In Vitro* Regeneration of Aromatic Rice (*Oryza sativa* L.). International Journal of Agriculture & Biology. 1560–8530.
- Hussein, E.H. ; Madkour, M.A. ; Assem, S.K. ; Radwan, A. 2004. Embryogenic callos formation and plant regeneration from immature embryos of some barley genotypes (*Hordeum vulgare* L.). Arabic Journal of Biotechnology. 7 (1): 111-122.
- 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.
- Keresa, S. ; Baric, M. ; Sarcevic, H. ; Gunjaca, J. 2004. Influence of Zeatin on wheat regeneration from immature embryos. Agriculturae Conspectus Scientificus. 69(1): 17- 20.
- Khalequzzaman, M. ; Haq, N. ; Hoque, E. ; Lata, T. 2005. Regeneration efficiency and genotypic effect of 15 *Indica* Type Bangladeshi Rice (*Oryza sativa* L.) Landraces. Plant Tissue Culture. 15(1): 33-42.

- Levitus, G. 2006. Los Cultivo Transgénicos en la Argentina. *Química Viva*. 5(1): 24-26.
- Liu, F. ; Xu, M. ; Wang, X.F. ; Zheng, J.G. 2002. A preliminary study on establishing high regeneration frequency system of grain straw dual use rice 201, an *indica* rice. *J. Fujian Agri. For. Uni.* 31: 146-9.
- Meneses, A. ; Flores, D. ; Muñoz, M. ; Arrieta, G. ; Espinoza, A.M. 2005. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on *indica* rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Revista de Biología Tropical*. 53 (3-4): 361-368.
- Molina, J. ; Sikora, M. ; Garud, N. ; Flowers, J.M. ; Rubinstein, S. ; Reynolds, A. ; Huang, P. ; Jackson, S. ; Schaal, B.A. ; Bustamante, C.D. ; Boyko, A.R. ; Purugganan, M.D. 2011. Molecular evidence for a single evolutionary origin of domesticated rice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America [PNAS]*. 108 (20): 8351-8356. Doi: 10.1073/pnas.1104686108. Consultado el 12 de julio del 2011.
- Oficina Nacional De Semillas [ONS]. 2011. Certificación y Control de Calidad de Semillas de Arroz. Oficina Nacional de Semillas, Costa Rica. Disponible en: http://www.ofinase.go.cr/index.php?option=com_content&view=article&id=48&Itemid=80&lang=es. Consultado el 14 de julio del 2011.
- Ogawa, T. 2000. Improvement of cell culture conditions for rice. *JARQ* 34(4): 215 – 223. Disponible en: <http://ss.jircas.affrc.go.jp>.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación [FAO]. 2004. Año Internacional del arroz. El arroz es vida. Todo sobre el arroz. Disponible en <http://www.fao.org/rice2004/es/aboutrice.htm>. Consultado el 29 de junio del 2011.

- Pola, S. ; Mani, S. ; Ramana, T. 2008. Plant tissue culture studies in Sorghum bicolor: immature embryo explants as the source material. International Journal of Plant Production. 2(1): 1-14.
- Potrykus. 1979. Theory of Applied Genetics. 54: 209-214.
- Qian, H. ; Zhang, X. ; Xue, Q. 2004. Pakistan Journal of Biological Sciences. 7(4): 615-619.
- Ramírez, H. 2003. Transformación genética de plantas para resistencia a insectos. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 1(1): 57-61.
- Saharan, V. ; Yadav, R.C. ; Yadav, N.R. ; Chapagain, B.P. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica* rice (*Oryza Sativa* L.). African Journal of Biotechnology. 3 (5): 256-259.
- Saqlan, S.M. ; Sultana, T. ; Yasmin, T. ; Mahmood, T. ; Akhtar, M.S. 2006. Efficient embryogenic system from tissue culture of mature embryos for some coarse varieties of rice (*Oryza sativa* L.). Pak. J. Bot. 38(4): 969-975.
- Saito, H. ; Ishida, Y. ; Hiei, Y. ; Komari, T. 2011. Patent No. 7939328. United States of America.
- Sharma, J. P. ; Mukherjee, B.B. ; Gupta, S. 1999. Callus Induction and Plant Regeneration form Immature Embryos of *Indica* Rice. ORYZA. 36(1): 32-34.
- Thadavong, S. ; Scripichitt, P. ; Wongyai, W. ; Jompuk, P. 2002. Callus induction and plant regeneration from mature embryos of glutinous rice (*Oryza sativa* L.) cultivar TDK1. Kasetsart Journal (Nat. Sci.). 36: 334-344.
- Valdez, M. ; Cabrera-Ponce, J.L. ; Sudhakar, D. ; Herrera-Estrella, L. ; Christou, P. 1998. Transgenic central american, west african and asian elite rice varieties resulting from particle bombardment of foreign DNA into mature seed-derived explants utilizing three different bombardment devices. Annals of Botany. 82: 795-801.

- Valdivia, G. ; Cabrera, J.L. ; Carreón, Y. ; Martínez, M. 2010. Transformación de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. subespecie *Indica*) de la Variedad Morelos A-92 con el gen de la SPS de *Synechocystis*. *Biológicas*. 12(2): 116 –121.
- Vega, R. ; Vásquez, N. ; Espinoza, A.M. ; Gatica, A. ; Valdez-Melara, M. 2009. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Revista de Biología Tropical*. 57(1): 141-150.
- Zhang, S. ; Chen, L. ; Qu, R. ; Marmey, P. ; Beachy, R. ; Fauquet, C. 1996. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Reports*. 15: 465-469
- Zhu, Y. ; Zhao, F. ; Zhao, D. 2011. Regeneration and transformation of maize elite inbred line via immature embryo culture and enhanced tolerance to a fungal pathogen *Exserohilum turcicum* with a balsam pear class I chitinase. *African Journal of Agricultural Research*. 6(7): 1923-1930.

CAPÍTULO 9. ANEXOS

Anexo 9.1. Composición del medio de callogénesis. Fuente: Potrykus. 1979. Theory of Applied Genetics. 54: 209-214.

Componentes del medio CC		
Sales inorgánicas	Concentración en 1L de medio	Solución Madre 10X (100 ml / 1L medio)
	g/l	g/l
MACROS CC		10
KNO ₃	1,212	12,120
NH ₄ NO ₃	0,640	6,40
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,247	2,47
KH ₂ PO ₄	0,136	1,36
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,588	5,88
MICROS CC	Concentración en 1L de medio	Solución madre 200X (5 ml / 1L medio)
	g/l	200
H ₃ BO ₃	0,0031	0,620
MnSO ₄ 4H ₂ O	0,00858	1,716
ZnSO ₄ 7H ₂ O	0,00576	1,152
KI	0,00083	0,166
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,00024	0,048
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,000025	0,005
CoSO ₄ 7H ₂ O	0,000028	0,006
	Concentración en 1L de medio	Solución madre 100X (10 ml / 1L medio)
FeEDTA (100X 10 ml) (SIGMA E-6760)		4,150
ENZIMAS		
Caseína Enzimática Hidrolizada (N-Z-Amine A)	1000,0	
HORMONAS		
	mg/l	
2,4-D	2,00	
CARBOHIDRATOS		
	g/l	
Sacarosa	20	

Manitol	15	
Sorbitol	15	
pH	5.8	
PHYTAGEL	3 g	
	Concentración en 1L de medio	Solución madre 100X (10 ml / 1L medio)
VITAMINAS*	mg/l	g / 500ml
Tiamina-HCL	8,5	0,43
Pyridoxina-HCL	1,0	0,05
Ácido nicotínico	6,0	0,30
Glycina	2,0	0,10
Myo-inositol	90,0	4,50
AGUA DE COCO*	10%	

* Se agregan después de autoclavar

Anexo 9.2. Componentes de medio de regeneración. Fuente: Zhang S.; Chen L.; Qu R.; Marmey P.; Beachy R.; Fauquet C. 1996. Regeneration of fertile transgenic indica (group 1) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. Plant Cell Reports 15: 465-469.

Medio de regeneración (R₂)		
Sales inorgánicas	Concentración en 1L de medio	Solución Madre 10X (100 ml / 1L de medio)
MACROS CC	g/l	g/l
		10
KNO ₃	1,212	12,120
NH ₄ NO ₃	0,640	6,40
MgSO ₄ 7H ₂ O	0,247	2,47
KH ₂ PO ₄	0,136	1,36
CaCl ₂ 2H ₂ O	0,588	5,88
MICROS CC	Concentración en 1L de medio	Solución Madre 200X (5 ml / 1L de medio)
	mg/l	200
H ₃ BO ₃	0,0031	0,620
MnSO ₄ .H ₂ O	0,00858	1,716

ZnSO ₄ .7H ₂ O	0,00576	1,152
KI	0,00083	0,166
NaMoO ₄ 2H ₂ O	0,00024	0,048
CuSO ₄ 5 H ₂ O	0,000025	0,005
CoSO ₄ 7H ₂ O	0,000028	0,006
	Concentración en 1L de medio	Solución Madre 100X (10 ml / 1L de medio)
	mg/l	100
FeEDTA (100X 10 ml) (SIGMA E-6760)		4,150
VITAMINAS*	Concentration in 1L Media	Stock solution 200X (5 ml / 1L medium)
	mg/l	g/ 1 L
Ácido nicotínico	6,0	0,20
Tiamina-HCL	8,5	1,20
Piridoxina-HCL	1,0	1,70
Myo-inositol	90,0	0,20
Glicina	2,0	18,00
Caseína Enzimática Hidrolizada (N-Z-Amine A)	300,0	0,40
HORMONA	mg/l	
Kinetina	2,50	
Ácido Naftalenacético	0,10	
CARBOHIDRATOS	g/l	
Maltosa	30	
pH	5.8	
PHYTAGEL	3 g	
AGUA DE COCO*	10%	

* Se agregan después de autoclavar