

UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
SISTEMA DE ESTUDIOS DE POSGRADO
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ARROZ (*Oryza sativa* L., Cultivar
CR-5272): ANATOMÍA E HISTOLOGÍA DE LOS PROCESOS
EMBRIOGÉNICOS.**

**Tesis sometida a la consideración de la comisión del Programa de
Estudios de Posgrado en Biología para optar el grado de Magister
Scientiae.**

José Rafael Vega López

Ciudad Universitaria “ Rodrigo Facio”

San José, Costa Rica

1999

DEDICATORIA

A todos los investigadores en el área del Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales
y de la Biotecnología en general de Centroamérica.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mis sinceros agradecimientos a:

Al Programa Alemán de Intercambio Académico (DAAD), por el financiamiento de mis estudios de Maestría. A mi profesora tutora y directora de tesis Dra. Marta Valdez, por su asesoría, entrega y disciplina brindada durante el desarrollo de mis estudios; a los miembros del comité de tesis integrado por el Dr. Gabriel Macaya y M. Sc. Nelly Vásquez, por las revisiones y sugerencias que hicieron posible la culminación de este trabajo.

Al Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular, especialmente a la Dra. Ana Mercedes Espinoza por facilitarme muchos recursos y al grupo de investigadores que dirige y con quienes tuve el honor de compartir mis investigaciones.

Al Centro Agronómico de Investigación y Enseñanza (CATIE), especialmente al Dr. Jean-Vincent Escalant por facilitarme el uso del Laboratorio de Microtécnicas.

Al Profesor Juan Bautista Chavarría por su ayuda en el análisis estadístico.

A los profesores de la Escuela de Biología que hicieron posible mi formación académica y científica, especialmente al Dr. Walter Marín y Lic. Doris Fernández.

A mi madre Rafaela López y hermanos Ana Luisa, Isabel, Angela María y Enrique por sus oraciones y apoyo, a mi hijo Rafael Alfonso razón de mi superación académica.

A mis compañeros del Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Escuela de Biología Griselda Arrieta, Giovanny Garro, Reinhardt Acuña, Omar Gadjent y Harry Garita, con quienes compartí el arduo trabajo de laboratorio y de quienes adquirí conocimientos y disciplina.

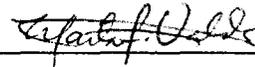
Esta tesis fue aceptada por la comisión del Programa de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar el grado de Magister Scientiae.

Decana del Sistema de Estudios de Posgrado o representante.



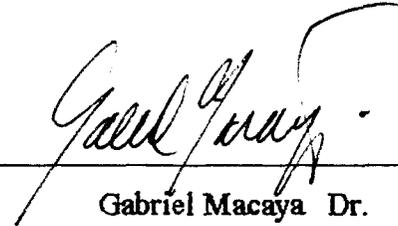
Alvaro Morales R. Dr.

Directora de tesis



Marta Valdez Melara Dra.

Miembro del Comité



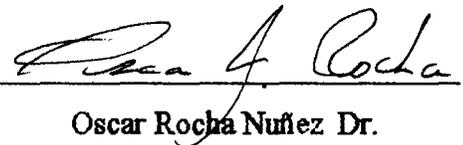
Gabriel Macaya Dr.

Miembro del Comité



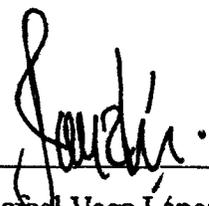
Nelly Vásquez Morera M. Sc.

Director del Programa o su representante



Oscar Rocha Nuñez Dr.

Sustentante



José Rafael Vega López Lic.

INDICE

	PAGINA
DEDICATORIA.....	ii
AGRADECIMIENTOS.....	iii
HOJA DE APROBACION.....	v
INDICE.....	vi
PREFACIO.....	ix
LISTA DE CUADROS.....	x
LISTA DE FIGURAS.....	xvi
INTRODUCCION GENERAL.....	1
CAPITULO I	
Efecto de L-prolina y L-triptofano en la embriogénesis somática y regeneración de plantas de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. cultivar CR-5272).....	7
RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	8
MATERIALES Y METODOS.....	11
RESULTADOS.....	14
Efecto de L-prolina en la callogénesis y la regeneración de plantas.....	14
Efecto del L-triptofano en la callogénesis y la regeneración de plantas.....	20
Efecto combinado de L-prolina y L-triptofano en la inducción de callos y en la regeneración de plantas.....	27
DISCUSION.....	36

CONCLUSIONES.....	44
-------------------	----

CAPITULO II

Efecto de la temperatura, del fraccionamiento y de la deshidratación

de callos en la regeneración de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cultivar

CR-5272).....	45
---------------	----

RESUMEN.....	45
--------------	----

INTRODUCCION.....	47
-------------------	----

MATERIALES Y METODOS.....	50
---------------------------	----

RESULTADOS.....	54
-----------------	----

Exposición de explante a temperatura de 27 °C por 5 días antes de la siembra.....	54
---	----

Exposición de explante a temperatura de 27 °C por 10 días antes de la siembra....	56
---	----

Fraccionamiento de callos embriogénicos, previo subcultivo a medio de regeneración.....	57
---	----

Efecto de la deshidratación de los callos previa transferencia a un medio de regeneración.....	58
--	----

Efecto del tamaño de los frascos sobre el desarrollo de embriones somáticos en la fase de regeneración.....	59
---	----

DISCUSION.....	62
----------------	----

CONCLUSIONES.....	68
-------------------	----

CAPITULO III

Descripción histológica de la embriogénesis somática en arroz

<i>(Oryza sativa</i> L. cv CR-5272).....	69
RESUMEN.....	69
INTRODUCCION.....	70
MATERIALES Y METODOS.....	73
RESULTADOS.....	76
Descripción de características de células embriogénicas.....	76
Callo de 5 días en medio de callogénesis.....	76
Callo de 10 días en medio de callogénesis.....	79
Callo de 15 días en medio de callogénesis.....	81
Callo de 20 días en medio de callogénesis.....	82
Callos embriogénicos en medio de regeneración.....	82
Descripción histológica de los callos sometidos al método de biolística.....	84
DISCUSION.....	88
CONCLUSIONES.....	94
DISCUSION GENERAL.....	95
LITERATURA CITADA.....	97

PREFACIO

Esta tesis está escrita de acuerdo con el reglamento del sistema de Estudios de Posgrado en Biología de la Universidad de Costa Rica, y sigue las normas de presentación de la revista de Biología Tropical.

LISTA DE CUADROS

CAPITULO I	PAGINA
CUADRO	
1a	Número de callos obtenidos y porcentajes de formación de callos resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 2,4-D, en el cultivar de arroz CR-5272..... 16
1b	Prueba de Tukey para la comparación de medias del número de callos obtenidos, producto de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 2,4-D. 16
2	Evaluación de la capacidad morfogénica de los callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 0.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración..... 16
3	Evaluación de la capacidad morfogénica de los callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 1 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración..... 16
4	Evaluación de la capacidad morfogénica de los callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 1.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración..... 17

5	Evaluación de la capacidad morfogénica de los callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 2 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	18
6a	Número de callos y porcentajes de callogénesis obtenidos de combinar varias concentraciones de L-triptofano con 2,4-D, en el cultivar de arroz CR-5272.....	21
6b	Prueba de Tukey para la comparación de medias de callos obtenidos, luego de combinar concentraciones de L-triptofano con 2,4-D	22
7	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	22
8	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 1 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	23
9	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 1.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	24
10	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la	

	combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 2 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	25
11	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 2.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	26
12	Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D.....	28
13	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	29
14	Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 1 mg/L de 2,4-D, en el cultivar de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. cv CR-5272)	29,30
15	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 1 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....	31

- 16 Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano, de L-prolina con 2 mg/L de 2,4-D, en el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. cv. CR-5272).....32
- 17 Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 2 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....33
- 18 Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano, de L-prolina con 2.5 mg/L de 2,4-D, en el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. cv. CR-5272)..... 34
- 19 Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 2.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.....35

CAPITULO II

- 20 Número de callos obtenidos en el tratamiento con temperatura de 27 °C por cinco días antes de la siembra en un medio de callogénesis, para el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L., cv. CR-5272)..... 55
- 21 Efecto de la temperatura a 27 °C por 5 días sobre el explante antes de

	la siembra, en relación con la regeneración de plantas de arroz, después de doce semanas de cultivo.....	55
22	Efecto del tratamiento al explante con temperatura de 27 °C por 10 días antes de la siembra, en la formación de callos en el cultivar de arroz (<i>Oryza sativa</i> L., cv. CR-5272).....	56
23	Efecto de la temperatura de 27 °C por 10 días en el explante antes de la siembra, en relación con la regeneración de plantas, después de doce semanas de cultivo.....	57
24	Efecto del fraccionamiento de callos en relación con la regeneración de plantas, después de diez semanas de cultivo.....	58
25	Efecto de la deshidratación de callos en relación con la regeneración de plantas del cultivar de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. cv. CR-5272), después de diez semanas de cultivo.....	59
26	Efecto del tamaño del frasco, en relación con el número de plantas regeneradas después de diez semanas de cultivo.....	61

CAPITULO III

27	Evaluación de la capacidad morfogénica de callos sometidos al método de biobalística para el cultivar de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. CR-5272), después de diez semanas en medio de regeneración.....	87
----	---	----

LISTA DE FIGURAS

CAPITULO II	PAGINA
FIGURA	
1 Morfología de los callos obtenidos al combinar varias concentraciones de L-prolina con 2,4-D.....	15
2 Efecto de la interacción de varias concentraciones de L-prolina con el 2,4-D, sobre la callogénesis del cultivar de arroz (<i>Oryza sativa</i> L. CR-5272).....	19
3 Morfología de los callos obtenidos al combinar varias concentraciones de L-triptofano con 2,4-D.....	21
4 Interacción entre tratamientos con varias concentraciones de L-triptofano con 2,4-D, en relación al número promedio de callos.....	27
CAPITULO II	
5 Morfología de los callos embriogénicos deshidratados por 24 horas luego de diez días en un medio de regeneración.....	60

6	Efecto del tamaño de los frascos en la regeneración de plantas de arroz.....	.60
---	--	-----

CAPITULO III

7	Tejido escutelar del embrión cigótico maduro de arroz.....	77
8	Características histológicas de los callos embriogénicos de arroz de 5 y 10 días en medio de callogénesis.....	80
9	Características histológicas de los callos embriogénicos de arroz de 15 y 20 días en medio de callogénesis.....	83
10	Callos embriogénicos en medio de regeneración.....	85
11	Expresión de la enzima β -glucuronidasa en estructuras globulares periféricas en callos embriogénicos de arroz de cinco días.....	86

INTRODUCCION GENERAL

EL CULTIVO DEL ARROZ.

Los cereales constituyen la fuente más importante de calorías y proteínas para el hombre. Más del 52% de los alimentos son derivados de cereales tales como el trigo, el arroz, el maíz, la cebada, etc. Dentro de éstos, el arroz (*Oryza sativa* L.), ocupa el segundo lugar en importancia, después del trigo, ya que es el alimento básico para la mitad de la población mundial. Sus elementos constitutivos son el agua (10 - 14%), proteínas (5 - 10%), grasa (0.6 - 3%), carbohidratos (73 - 81%), fibra (0.2 - 1 %) (Parson *et al.* 1984, Vasil y Vasil 1991).

El arroz es uno de los tres alimentos básicos esenciales en la dieta de los costarricenses, quienes consumen 45 kg *per capita* al año, lo que puede considerarse como un índice elevado (Colegio de Ingenieros Agrónomos 1993). Con el propósito de contribuir al mejoramiento de las variedades costarricenses de arroz y hacerlas más resistentes al Virus de la Hoja Blanca del Arroz (RHBV) por medio de técnicas de ingeniería genética, se evaluó la capacidad morfogénica de nueve variedades (Valdez *et al.* 1996). Entre estas, la variedad CR-5272, mostró la mayor capacidad para la inducción de callos y la regeneración de plantas. Esta variedad (liberada en 1976) es de porte bajo, de hojas erectas, macollamiento moderado, resistente al acame; florece entre los 80 y 85 días después de la siembra, dura a la cosecha entre 110 y 115 días, por lo que es hoy en día, la variedad comercial más precoz que existe en el mercado, con un grano de excelente calidad. Su potencial de producción por hectárea es de 5.5 a 6 toneladas (CONITTA 1991).

CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES.

La biotecnología vegetal es el producto de varias disciplinas que hasta hace poco tiempo se consideraban independientes: la biología molecular, el cultivo de tejidos vegetales, la ingeniería genética, la fitopatología, la fisiología vegetal, entre otras (Lindsey y Jones 1989).

El cultivo de tejidos vegetales puede ser aplicado en estudios de fisiología, genética, bioquímica, fitopatología, morfología y en otras ciencias afines, en la bioconversión y producción de compuestos útiles, en el incremento de la variabilidad genética, en la obtención y propagación de plantas libres de patógenos, en la conservación e intercambio de germoplasma, en la obtención de mutantes y plantas haploides, y en los estudios de diferenciación vascular, entre otros (Jou y Montoya 1990, Mroginski y Roca 1991).

Consecuentemente, el cultivo de tejidos vegetales, es una herramienta versátil para el estudio de problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye en efecto, el puente necesario para llevar las manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo (Roca y Mroginski 1991).

El cultivo de tejidos vegetales consiste esencialmente en aislar una porción de la planta (o explante) y obtener así protoplastos, células, tejidos u órganos, que se cultivan en condiciones asépticas en un medio de composición química definida y luego se ubican en condiciones ambientales artificiales apropiadas. Las diferentes respuestas morfogénicas que se pueden obtener en el cultivo de tejidos vegetales van desde la formación de tejidos organizados

(organogénesis) hasta la obtención de embriones somáticos, ya sea directa o indirectamente (Dallos y Alvarez 1988, Lindsey y Jones, 1989, Litz y Jarret 1991, Mroginski y Roca 1991).

EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA.

La iniciación y el desarrollo de embriones a partir de tejido somático, fué inicialmente reconocido por Steward en 1958 (citado por Gautheret 1985), en cultivos de suspensiones celulares de “zanahoria” (*Daucus carota*). La embriogénesis somática es el desarrollo de embriones que no son producto de la fusión de gametos, sino que se originan a partir de células somáticas. En este proceso, las células somáticas haploides o diploides, desarrollan plantas diferenciadas, a través de etapas embriológicas características (Haccius 1977, Ammirato 1983). Cada embrión somático es una estructura bipolar con un eje radical-apical, que no posee conexión con el tejido materno (Williams y Maheswaran 1986, Tisserat 1987, Litz y Jarret 1991).

Este fenómeno puede ocurrir a partir del cultivo *in vitro* de varios tipos de células, tejidos y órganos. Ocurre también en tejidos reproductivos como las células sinérgidas, de la nucela, antipodas y de tejido somático como células del mesófilo, del tallo, de márgenes foliares, parénquima vascular, etc. (Ammirato 1983, Williams y Maheswaran 1986, Tisserat 1987).

La producción de embriones somáticos puede ocurrir directa o indirectamente. La forma directa involucra la formación de un embrión asexual, ya sea a partir de una célula individual, de un grupo de células o de una porción del tejido explante, sin la intervención de una fase de callo. El proceso indirecto consiste en la proliferación de callos para permitir la formación de los

proembriones. Esto se logra en un medio de cultivo con alta concentración de auxinas. Estos callos se transfieren luego a un medio de regeneración que contiene un balance adecuado de auxinas y citoquininas, para inducir la formación de embriones bipolares y la subsecuente regeneración de plantas (Williams y Maheswaran 1986, Tisserat 1987).

La embriogénesis somática ha sido observada en suficientes especies y familias como para demostrar que no es un fenómeno restringido a unos pocos taxa. Un número considerable de umbelíferas, como la “zanahoria” (*Daucus carota*) han producido embriones somáticos. En solanáceas, las especies de *Nicotiana*, especialmente *N. tabacum* han sido un sistema modelo para estudios de organogénesis y de embriogénesis. En leguminosas de importancia agronómica, algunas especies han probado ser difíciles de responder a las condiciones en cultivo *in vitro*, pero *Phaseolus vulgaris* y *Glycine max* han mostrado ser capaces de regenerar (Wallin y Ericksson 1973, Dubits *et al.* 1976, Haccius 1977, Ammirato 1983, Allavena 1984, Hammatt *et al.* 1986).

Las monocotiledóneas en general y las gramíneas (forrajeras y cereales) en particular, son más recalcitrantes que las dicotiledóneas para el crecimiento en cultivo *in vitro* y para la regeneración de plantas, a partir de los embriones somáticos. Los callos derivados de inflorescencias y de anteras jóvenes han producido embriones somáticos en especies tales como *Pennisetum americanum*, (Botti y Vasil 1984), *Panicum maximum* (Yi-Lu y Vasil 1982), *Saccharum officinarum* (Jane Ho y Vasil 1983), *Sorgum almun* (George y Eapen 1988). También se han obtenido callos a partir de embriones inmaduros de *Zea mays* (Vasil *et al.* 1984, McCain y Hodges 1986) y de *Triticum aestivum* (Akins y Vasil 1983, Magnusson y Bornman 1985). Para la formación de embriones somáticos en arroz (*Oryza sativa*), se han utilizado

inflorescencias inmaduras (Ling *et al.* 1983, Chen *et al.* 1985), ápices de raíz joven (Zimny y Lörz 1986), embriones maduros (Raghavan Ram y Nabors 1985, Jones y Rost 1989), embriones inmaduros (Lee *et al.* 1989) y anteras como explantes (Zhang y Qifeng 1993).

Cuando se coloca el tejido explante en un medio de cultivo (por ejemplo, Murashige y Skoog (1962) o sus modificaciones), con una alta concentración de auxina, experimenta una desdiferenciación celular para producir una masa desorganizada de células y de agrupaciones celulares (callos), que al ser transferidos a un medio de regeneración, carente de auxina o con un adecuado balance de auxinas y citoquininas, inician pronto el desarrollo de proembriones, cada uno de los cuales pasa a través de diferentes etapas hasta la formación de una plántula completa (Ammirato 1983, Litz y Jarret 1991).

No obstante, aunque ambos procesos, organogénesis y embriogénesis somática *in vitro*, conducen a la neoformación de plantas, los embriones somáticos son entidades independientes y similares a los cigóticos. Por esto, la regeneración de plantas a través de la embriogénesis somática, es el mecanismo idóneo para experimentos de transformación genética, porque no se forman quimeras como en la organogénesis.

La presente tesis estudia el proceso de embriogénesis somática en arroz (*Oryza sativa* L.), del cultivar costarricense CR-5272. El capítulo I muestra el efecto de dos aditivos orgánicos (L-prolina y L-triptofano) en la embriogénesis somática y la regeneración de plantas. El capítulo II presenta la influencia de varios factores que promueven la optimización de la regeneración del arroz y finalmente el capítulo III estudia el proceso de embriogénesis somática en el cultivar de arroz CR-5272 por medio de técnicas histológicas. Los resultados de esta investigación

permitirán hacer más eficientes los procesos de la inducción morfogénica y de la regeneración, así como también comprender algunos eventos fisiológicos relacionados con los procesos de embriogénesis somática.

CAPITULO I

EFECTO DE L-PROLINA Y L-TRIPTOFANO EN LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA Y REGENERACION DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L. CULTIVAR CR-5272).

RESUMEN

Se aplicaron diferentes concentraciones de L-prolina y de L-triptofano, cada uno de los cuales fue combinado con varias concentraciones de 2,4-D, para inducir la formación de callos embriogénicos, a partir de embriones cigóticos maduros de arroz.

Los tratamientos con L-prolina y 2,4-D, que permitieron incrementar la regeneración de plantas de arroz (15 % más) fueron: 3 mM /1 mg/L y 9 mM / 1.5 mg/L respectivamente. El rendimiento promedio de plantas por callo fue de 5. La mejor concentración de L-triptofano fue de 90 μ M en combinación con 1 o 1.5 mg/L de 2,4-D. Estos tratamientos incrementaron la regeneración de plantas en un 50 % en relación con el control, y se obtuvieron hasta 3 plántulas en promedio por callo. Los resultados de esta investigación indican que cuando se combinan bajas concentraciones de ambos aminoácidos y de 2,4-D, se favorece la obtención de callos y la formación de plantas de arroz. Moderadas y altas concentraciones de éstos, generan alteraciones metabólicas e incrementan la necrosis celular en el cultivo.

INTRODUCCION

El desarrollo de numerosas técnicas en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, ha abierto nuevas posibilidades de investigación para el mejoramiento de los cereales. Estas metodologías permiten mantener las células en crecimiento desorganizado, para luego iniciar la morfogénesis y finalmente la regeneración de la planta completa (Yamada y Loh 1984).

En arroz, se han hecho numerosos progresos, en donde la regeneración de plantas ocurre ya sea por organogénesis o embriogénesis somática a partir de varios explantes y también a partir de células y protoplastos (Zimny y Lorz 1986, Lee *et al.* 1989). La respuesta en términos de plantas regeneradas es, sin embargo, menor en comparación con las dicotiledóneas y, en general, las líneas *indica* presentan un bajo potencial de regeneración al ser comparadas con las líneas *japonica* (Abe y Futsuhara 1984, 1986, citados por Chowdhry *et al.* 1993). De manera similar, Biswas *et al.* (1994), destacan que el problema de la regeneración de las plantas de arroz obtenidas por métodos *in vitro*, es especialmente severo con las líneas de arroz *indica*, ya que son más recalcitrantes en el cultivo *in vitro* y que toma mucho tiempo el establecer la condiciones apropiadas del cultivo.

Koetje *et al.* (1989), hacen notar que varios parámetros en el cultivo *in vitro* del arroz, tales como el genotipo, origen del material explante, medio de cultivo y el tiempo del explante en el cultivo pueden afectar la embriogénesis somática y la regeneración de plantas de arroz, pero que en particular, los componentes del medio de cultivo afectan el crecimiento del callo y la eficiencia en la regeneración de plantas. Además, dependiendo del medio basal utilizado, sus

modificaciones afectan tanto la callogénesis como la regeneración de plantas de maneras muy diversas.

Por lo tanto, es de mucha importancia el investigar nuevos factores que promuevan continuamente la regeneración de plantas y la obtención de callos morfogénicos. Esto podría incluir el empleo de varios aditivos orgánicos, reguladores de crecimiento y aminoácidos.

Generalmente se ha reconocido que los aminoácidos pueden promover el crecimiento de ciertos cultivos, mientras que otros pueden ser inhibidores de muchos procesos metabólicos en la célula vegetal (Krikorian 1991).

Con respecto a la adición de aminoácidos al medio inicial, Armstrong y Green (1985) realizaron un estudio detallado para el desarrollo de las condiciones óptimas para la obtención de callos embriogénicos de maíz (*Zea mays* L.) cultivar A-188, en particular para demostrar la función importante de L-prolina en obtener las respuestas deseadas. Igualmente, Kamo *et al.* (1985), al agregar L-prolina al medio N6 (Chu *et al.* 1975), aumentaron la formación de callos embriogénicos de maíz, así como la cantidad de plantas por embrión, en relación con un medio N6 sin L-prolina.

En arroz, la iniciación y el crecimiento de los callos embriogénicos, requiere de un solo medio de cultivo suplementado con ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) y algunas veces con kinetina, dependiendo del genotipo. El desarrollo de los embriones somáticos se completa hasta la formación de plantas en un segundo medio sin reguladores de crecimiento o con un balance adecuado de auxinas y citoquininas (Yamada y Loh 1984).

Chowdhry *et al.* (1993), reportan el efecto promotor de L-prolina en la frecuencia de la callogénesis y del número de plantas obtenidas por explante de arroz (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). Por su parte, Siriwardana y Nabors (1983), investigaron el efecto del L-triptófano en la embriogénesis somática en arroz. Las variedades utilizadas fueron dos *japonica* y cinco *indica*. Los medios utilizados fueron el LS (Linsmaier y Skoog 1965) suplementado con varias cantidades de aminoácidos, auxinas (2,4-D o 2,4,5-T) citokininas (Kinetina o BAP) e inhibidores de auxinas (TIBA), obteniendo al final un incremento en la formación de callos embriogénicos y de regeneración de plantas.

El medio MS (Murashige y Skoog 1962) y el N₆ (Chu *et al.* 1975) inducen la formación de callos. Los generados en un medio MS con 250 µM de L-triptofano parecieron ser más embriogénicos que aquellos desarrollados en un medio N₆ suplementado con la misma concentración de L-triptofano (Koetje *et al.* 1989).

Con el fin de desarrollar la metodología para optimizar la obtención de callos embriogénicos y la subsecuente regeneración de plantas del cultivar de arroz CR-5272, la presente investigación tuvo como objetivos:

- Determinar la concentración adecuada de L-prolina, en relación con la del ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4-D) para mejorar la callogénesis y la morfogénesis *in vitro*.

- Determinar la concentración óptima de L-triptofano en relación con la del 2,4-D, para mejorar la callogénesis y la regeneración de plantas.
- Identificar la interacción existente entre L-prolina, L-triptofano y 2,4-D, al combinarse en varias concentraciones.

MATERIALES Y METODOS

Material explante

Se utilizó como material explante embriones cigóticos maduros de arroz. Las semillas fueron obtenidas de la oficina Nacional de Semillas de Costa Rica.

Desinfección y siembra del explante

Los granos de arroz fueron descortezados y esterilizados con Domestos TM al 30% (Hipoclorito de Sodio al 3%) por 35 minutos y con agitación constante. Luego fueron lavados seis veces con agua bidestilada estéril y dejados en remojo por ocho horas antes de ser colocados en el medio de inducción de callos (Valdez *et al.* 1996).

Al momento de la siembra, se extrajo el embrión cigótico maduro con la ayuda de un bisturí y de pinzas estériles en un estereoscopio bajo condiciones asépticas. La región escutelar del embrión se colocó en contacto directo con la superficie del medio.

Medio de cultivo

El medio de cultivo para inducción de la callogénesis consistió de un MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 30 g/L de sacarosa, 0.1 g/L de myo-inositol y 3 g/L de Phytigel. Se agregaron varias concentraciones de L-Prolina (3, 6, 9, 12, 15 mM) y de L-Triptofano (20, 40, 90, 100, 240 y 280 μ M). Cada uno de los anteriores tratamientos, fue combinado con varias concentraciones de ácido 2,4-diclorofenoxiacético (0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/L). El pH del medio fué ajustado a 5.8 antes de ser autoclavado y luego vaciado en placas de Petri (100x15 mm). De esta forma se obtuvieron un total de 30 tratamientos para L-triptofano y 25 para L-prolina y para cada uno de éstos se realizaron 6 repeticiones. Estos tratamientos fueron comparados con un cultivo control y en que se utilizó el mismo medio de inducción callogénica descrito anteriormente, pero suplementado con 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 y 2.5 mg/L de 2,4-D, sin la adición de aminoácidos.

Finalmente se realizaron combinaciones de las mejores concentraciones de L-prolina y de L-triptofano, suplementadas con 0.5, 1, 2, 2.5 mg/L de 2,4-D, para determinar si existe un efecto sinérgico entre ambos aminoácidos y si se mejoran aún más los procesos de inducción embriogénica y de la posterior regeneración de plantas. Cada repetición contenía 10 explantes por lo que para cada tratamiento se totalizaron 60 explantes. Después de la siembra, todo el material fue colocado en el cuarto de crecimiento en la oscuridad y con una temperatura de 27 °C.

Subcultivos a medio de regeneración

Después de 25 días en el medio de callogénesis, los callos formados fueron transferidos a un medio de regeneración que consistió de un MS (Murashige & Skoog 1962) sin 2,4-D pero suplementado con 0.5 mg/L Benzilaminopurina (BAP) y 0.05 mg/L de Acido Naftalenacético (ANA). Los callos fueron subcultivados cada tres semanas para evaluar su capacidad morfogénica. Los cultivos fueron mantenidos bajo un fotoperíodo de 12 horas proveídas por lámparas fluorescentes (2000 lux) y a 27 °C ±1.

Las plántulas con una altura de 15 cm fueron transferidas al invernadero y cubiertas con bolsas plásticas para una aclimatación antes de ser expuestas directamente a las condiciones del invernadero.

Análisis Estadísticos

Para los datos obtenidos de la callogénesis se realizó un análisis de varianza de una vía, con el fin de determinar la variación existente entre los diferentes tratamientos, así como la prueba de Tukey (Mize y Chun 1988), para determinar la diferencias entre los promedios del número de callos resultantes para cada tratamiento. Los datos de regeneración fueron evaluados por medio de estadística descriptiva como la media aritmética y la desviación estándar. Los porcentajes de regeneración fueron determinados dividiendo el número total de callos con brotes entre el número total de callos no contaminados.

RESULTADOS

Efecto de L-prolina en la callogénesis y la regeneración de plantas.

Los datos de la callogénesis para L-Prolina (3, 6, 9, 12, 15 mM) en combinación con 2,4-D (0.5, 1, 1.5, 2, 2.5 mg/L) aparecen en el cuadro 1a.

A los tres días después de la siembra, el escutelo del embrión comienza a crecer, dando lugar a la formación del callo. Después de los cinco días el callo es evidente y su crecimiento aumenta entre los ocho y doce días, hasta alcanzar el máximo entre los dieciocho y veinte días. En esta etapa, los callos embriogénicos muestran características morfológicas, como lo son: coloración amarillo suave, de estructura compacta, secos y presentan en la superficie numerosas estructuras globulares. Después de ser transferidos a un medio de regeneración se desarrollan varios brotes verdes y raíces, hasta convertirse en plantas completas (Fig. 1).

Para el primer tratamiento que consistió en 0.5 mg/L de 2,4-D más 3, 6, 9, 12, 15 mM de L-prolina, los mayores porcentajes de callogénesis se obtienen en 3, 6 y 9 mM y tienden a disminuir en la medida que se incrementa la concentración de la L-prolina. Estos porcentajes son menores al ser comparados con el cultivo control.

Los resultados finales de regeneración, en términos de número de plantas obtenidas, presentan los mayores porcentajes de regeneración a 6 y 12 mM de L-prolina, en especial 9 mM, en que la regeneración aumentó tanto en la cantidad de callos morfogénicos, como en el número de plantas, mostrando un incremento del 11% al compararse con el control (Cuadro 2).

Al aumentar el 2,4-D a 1 mg/L y combinarlo con las mismas concentraciones de L-prolina, hay un aumento en la formación de callos morfogénicos en la medida en que se

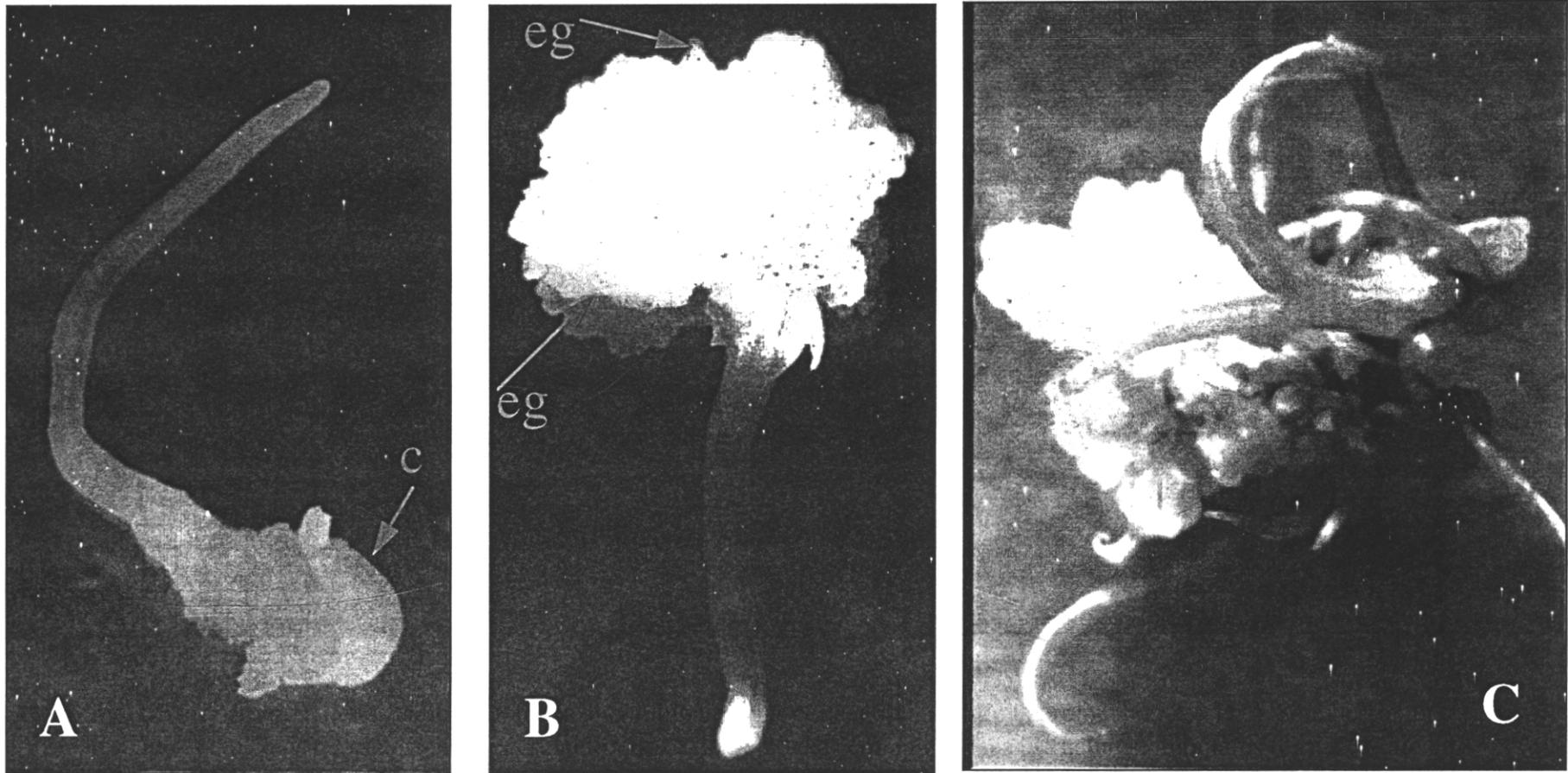


Fig. 1: Morfología de los callos obtenidos al combinar varias concentraciones de L-prolina con 2,4-D. **A** Se muestra un callo (c) de 5 días que se origina del escutelo. **B.** Callo de 20 días con numerosas estructuras globulares (eg). **C.** Callo en regeneración con varios brotes verdes.

incrementa la concentración del aminoácido, hasta alcanzar un 65 % con 15 mM (Cuadro 1a); los datos presentados por el cultivo control siguen siendo mayores con respecto a la formación de callos.

Los datos de regeneración muestran que los valores de 3 y de 6 mM presentan los más elevados porcentajes de regeneración (61 y 50 % respectivamente) y tienden a disminuir cuando la concentración de L-prolina alcanza los 15 mM. En este tratamiento se lograron obtener hasta 5 plantas en promedio por callo (Cuadro 3).

Cuadro 1a: Número de callos obtenidos y porcentajes de formación de callos resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 2,4-D, en el cultivar de arroz CR-5272.

Tratamiento (Prolina / 2,4-D)	N ° total callos	X callos/ placa ± D. E.	% callogenesis
Control	44	7 0.8	73
3 mM/0.5 mg/L (1)	39	6 1.4	65
6 mM/0.5 mg/L (2)	38	6 1.5	63
9 mM/0.5 mg/L (3)	36	6 1.4	60
12 mM/0.5 mg/L (4)	23	4 1.3	38
15 mM/0.5 mg/L (5)	25	4 2.5	42
Control	52	9 0.8	87
3 mM/1.0 mg/L (6)	18	3 2.5	30
6 mM/1.0 mg/L (7)	22	4 2.2	37
9 mM/1.0 mg/L (8)	32	5 2.8	53
12 mM/1.0 mg/L (9)	33	6 3.1	55
15 mM/1.0 mg/L (10)	39	7 2.2	65
Control	53	9 1.2	88
3 mM/1.5 mg/L (11)	22	4 1.8	37
6 mM/1.5 mg/L (12)	23	4 1.3	38
9 mM/1.5 mg/L (13)	13	2 0.9	22
12 mM/1.5 mg/L (14)	20	3 1.9	33
15 mM/1.5 mg/L (15)	12	2 0.9	20
Control	41	7 1.5	68
3 mM/2.0 mg/L (16)	29	5 1.9	48
6 mM/2.0 mg/L (17)	30	5 2.7	50
9 mM/2.0 mg/L (18)	21	4 2.2	35
12 mM/2.0 mg/L (19)	20	3 2.3	33
15 mM/2.0 mg/L (20)	4	1 1.0	7
Control	54	9 0.6	90
3 mM/2.5 mg/L (21)	26	4 2.3	52
6 mM/2.5 mg/L (22)	4	1 0.5	7
9 mM/2.5 mg/L (23)	4	1 0.8	7
12 mM/2.5 mg/L (24)	6	1 1.2	10
15 mM/2.5 mg/L (25)	13	2 2.1	22

Cuadro 1b: Prueba de Tukey para la comparación de medias de callos obtenidos, producto de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 2,4-D.

Tratamientos	Significancia
1, 2, 10 vrs 13, 15, 25	*
20, 22, 23, 24 vrs 4,5,6,7,11,12,14,18, 19 21	*
3, 8, 9 vrs 20, 22, 23, 24	*
1, 2, 10 vrs 20, 22, 23, 24	*
16, 17 vrs 13, 15, 25	*
16, 17 vrs 20, 22, 23, 24	*

*valor de significancia con una probabilidad del 0.05

Cuadro 2: Evaluación de la capacidad morfológica de los callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 0.5 mg/L 2,4-D, después de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	3 mM	6 mM	9 mM	12 mM	15 mM
Total de callos	44	39	38	36	23	25
No contamin.	40	39	32	36	23	23
Con brote	19	13	16	21	11	9
Total de brotes	15	35	19	41	44	23
Brotes / callo	1	3	1.2	2	4	2.5
Total plantas	13	26	12	40	36	15
Promedio plantas/callos ♣	1.0	2.0	1.0	2.0	3.0	2.0
% callos morfológicos ♠	47	33	50	58	48	39

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Cuadro 3: Evaluación de la capacidad morfológica de los callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina con 1.0 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	3 mM	6 mM	9 mM	12 mM	15 mM
Total de callos	52	18	22	26	33	39
No contamin.	50	18	22	26	33	39
Con brote	13	11	11	10	12	4
Total de brotes	26	10	10	12	12	5
Brotes / callo	2	1	1	1	1	1.3
Total plantas	25	16	20	26	29	21
Promedio plantas/callos ♣	2.0	1	2	3	3	5
% callos morfológicos ♠	46	61	50	39	36	10

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Cuando se combinan las diversas concentraciones de L-prolina con 1.5 mg/L 2,4-D, los mayores porcentajes de callogénesis se observaron en 3 y 12 mM, siendo inferiores a los obtenidos con el cultivo control.

Los mejores datos de regeneración para este tratamiento se obtienen con 6 y 12 mM de L-prolina y se presentan en aquellos casos donde los porcentajes de callogénesis oscilan entre los 20 y 40%. La concentración de 6 mM representa el mayor porcentaje de regeneración para este experimento, con un promedio de 5 plantas por callo, que dió origen a un total de 51 plantas, comparado con solo 28 en el cultivo control, lo cual incrementó la regeneración en un 30%. Es importante resaltar que en este tratamiento, se cuantificaron hasta 12 plántulas en un callo. En los otros tratamientos, la capacidad de regeneración disminuye en la medida en que se aumenta la concentración del aminoácido (cuadro 4).

Cuadro 4: Evaluación de la capacidad morfogénica de los callos provenientes de varias concentraciones de L-prolina con 1.5 mg/L 2,4-D, luego de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	3 mM	6 mM	9 mM	12 mM	15 mM
Total de callos	53	22	23	13	20	12
No contaminados	49	22	21	13	20	12
Con brote	23	6	13	6	10	1
Total de brotes	30	8	5	6	13	2
Brotes / callo	1	2	2	1	1	2
Total plantas	28	16	51	26	13	2
Promedio plantas/callos♣	1	3	5	4	1	2
% callos morfogénicos♠	47	27	62	46	50	8

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Los resultados de la combinación de las diversas concentraciones de L-prolina con 2 mg/L de 2,4-D, muestran que los porcentajes de formación de callos morfogénicos se obtienen

en 3 y 9 mM, pero el cultivo control presentó un mayor porcentaje (68%), con lo que puede notarse una disminución en la formación de callos para este tratamiento (Cuadro 1a).

Para este experimento, la cantidad de callos morfogénicos y los porcentajes de regeneración fueron mayores en el cultivo control, que en el resto de tratamientos (Cuadro 5).

Cuadro 5: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos, al combinar varias concentraciones de L-prolina con 2.0 mg/L 2,4-D, luego de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	3 mM	6 mM	9 mM	12 mM	15 mM
Total de callos	41	29	30	21	20	19
No contamin.	36	29	30	18	17	19
Con brote	21	7	9	8	9	6
Total de brotes	35	21	57	34	51	37
Brotes / callo	2	3	6	4	6	6
Total plantas	38	9	8	11	8	5
Promedio plantas/callos ♣	2	1	1	2	1	1
% callos morfogénicos ▲	58	24	30	44	53	32

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

▲ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

La callogénesis disminuye cuando se utiliza 2.5 mg/L de 2,4-D y con 3 mM de L-prolina resultó en un 52%, pero al aumentar la concentración del aminoácido, los porcentajes disminuyeron hasta un valor de 7 %. Al evaluar los datos de regeneración de este experimento no se obtuvieron plantas, lo que sugiere que altas concentraciones de L-prolina, combinadas con altas concentraciones de 2,4-D generan algún efecto de toxicidad pues la mayoría de callos se necrosaron, después de 15 días en el medio de regeneración.

Al aplicar un análisis de varianza a todos los datos obtenidos en los tratamientos, este presentó diferencias altamente significativas ($F= 5.4$, $P= 0.0$), lo que sugiere que los explantes responden en forma diferente a las distintas concentraciones de L-prolina con 2,4-D, con la

consecuente variación en la cantidad de callos obtenidos para cada tratamiento. Al realizar una comparación de medias (Tukey, $\alpha = 0.05$), se observan 6 grupos de tratamientos con promedios significativamente diferentes (Cuadro 1b).

Un análisis de varianza de dos vías fue aplicado a los promedios, mostrando que el efecto de L-prolina y de 2,4-D fue altamente significativo para ambos y de igual forma su interacción, pero ésta última resultó ser negativa ($F = -34.9$, $P = 0.00$), lo que sugiere que la presencia de ambos factores a bajas concentraciones promueve la calogénesis y la regeneración. Al incrementar gradualmente las concentraciones de ambos, disminuyen los promedios de calogénesis, hasta verse inhibida la formación de callos y subsecuente regeneración de plantas (Fig. 2).

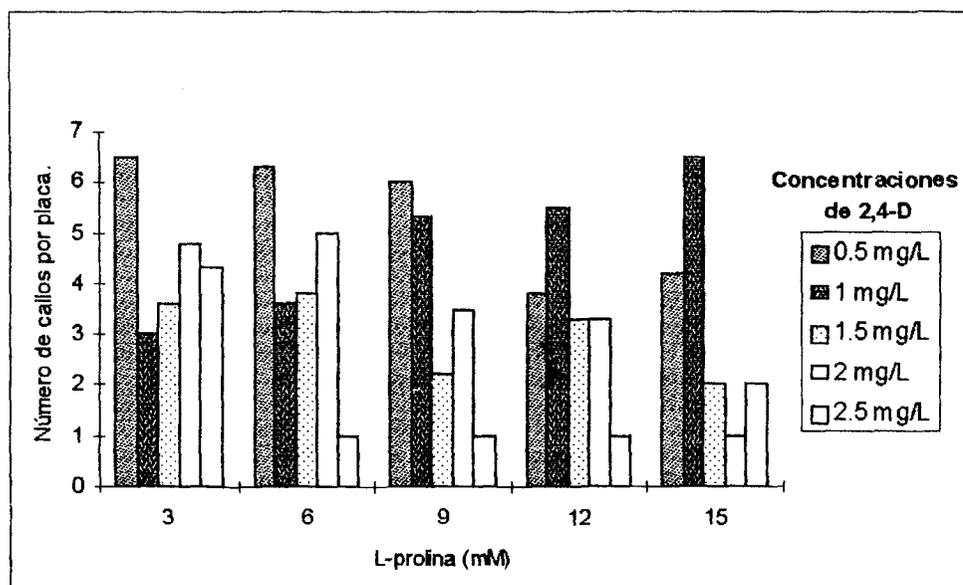


Fig.2: Efecto de la interacción de varias concentraciones de L-prolina con el 2,4-D, sobre la calogénesis del cultivar de arroz *Oryza sativa* L. CR-5272.

Estos resultados indican que las mejores concentraciones de L-prolina son 6 y 9 mM que se pueden combinar con 0.5 a 1.5 mg/L de 2,4-D para la obtención de callos embriogénicos, en particular 6 mM de L-prolina con 1.5 mg/L de 2,4-D, la cual incrementó la regeneración, en términos del número total de plantas.

Efecto del L-triptofano en la callogénesis y la regeneración de plantas.

Después de 5 días de realizada la siembra en el medio de callogénesis, se observó una proliferación de células en la región escutelar del embrión cigótico. Luego de 8-10 días se observó un rápido crecimiento del callo, el cual es muy notable a los veinte o veinticinco días. En esta etapa, los callos muestran las siguientes características morfológicas: muchas estructuras globulares en la superficie, apariencia nodular, estructura compacta, coloración amarilla. Aparecen numerosos brotes al ser subcultivados en el medio de regeneración (Fig. 3).

Para tratar de aumentar el crecimiento de los callos y la subsecuente regeneración de plantas, se estudiaron varias combinaciones de 2,4-D (0.5, 1.0 , 1.5, 2.0, 2.5 mg/L) y de L-triptofano (20, 40, 90, 100, 240, 280 μ M), en el medio MS de callogénesis (Cuadro 6a).

Para el primer tratamiento que consistió en la combinación de 0.5 mg/L 2,4-D con 20, 40, 90, 100, 240 y 280 μ M de L-triptofano, los mayores porcentajes de callogénesis se obtuvieron con 20 y 40 μ M. El cultivo control presentó una tendencia muy similar. Sin embargo, con concentraciones superiores a 90 μ M, la callogénesis disminuye y se nota un aumento en la cantidad de callos con raíz de tal forma que a concentraciones de 280 μ M no se obtuvo

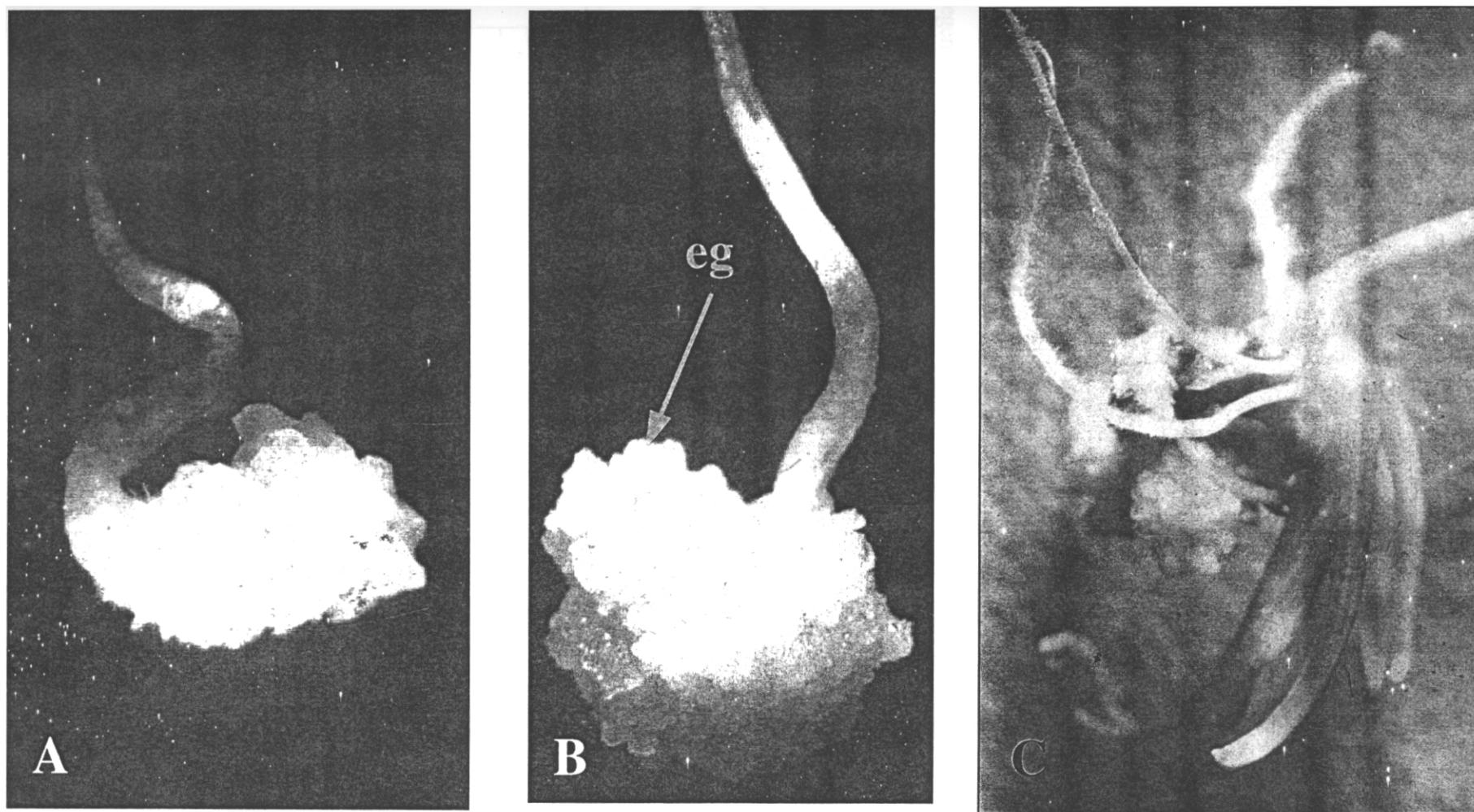


Fig. 3: Morfología de los callos obtenidos de combinar varias concentraciones de L-triptofano con 2,4-D. **A.**Callo 5 días que se origina del tejido escutelar. **B.** Callo de 20 días con numerosas estructuras globulares (eg). **C.** Callo en regeneración, con brotes verdes

formación de callos. Esto sugiere que con estas concentraciones ocurren alteraciones a nivel del embrión cigótico maduro, durante la inducción de callos.

Luego de tres días de transferidos a un medio de regeneración, los callos mostraron una coloración verde, a los cinco y seis días aparecieron los primeros puntos verdes en la periferia de los callos y varios de éstos, desarrollaron pequeños brotes verdes a los dieciocho y veinte días. Otros callos del mismo tratamiento se necrosaron y muchos formaron raíces. Los datos de regeneración para este tratamiento aparecen en el cuadro 7.

Si bien los mejores porcentajes de calogénesis se presentan en 20 y 40 μM , los más altos valores de regeneración se presentan en 90 μM . En concentraciones superiores, la regeneración baja notablemente, sin la subsecuente formación de plantas.

Cuadro 6a: Número de callos y porcentajes de calogénesis obtenidos de combinar varias concentraciones de L-triptofano con 2,4-D, en el cultivar de arroz CR-5272.

Tratamiento (triptofano / 2,4-D)	N° total callos	X callos/placa \pm D. E..		% calogénesis
Control	44	7	0.8	73
20 μM /0.5 mg/L (1)	42	7	1.3	70
40 μM /0.5 mg/L (2)	45	8	1.1	75
90 μM /0.5 mg/L (3)	19	3	2.6	32
100 μM /0.5 mg/L (4)	17	3	0.7	28
240 μM /0.5 mg/L (5)	0	0	0	0
280 μM /0.5 mg/L (6)	0	0	0	0
Control	52	9	0.8	87
20 μM /1.0 mg/L (7)	40	7	1.8	67
40 μM /1.0 mg/L (8)	54	9	1.6	90
90 μM /1.0 mg/L (9)	28	5	2.4	47
100 μM /1.0 mg/L (10)	24	4	1.7	40
240 μM /1.0 mg/L (11)	1	1	0.4	2
280 μM /1.0 mg/L (12)	0	0	0	0
Control	53	9	1.1	88
20 μM /1.5 mg/L (13)	53	8	0.7	88
40 μM /1.5 mg/L (14)	52	9	1.4	87
90 μM /1.5 mg/L (15)	20	3	3.5	33
100 μM /1.5 mg/L (16)	25	4	0.4	42
240 μM /1.5 mg/L (17)	1	1	0.4	2

Continuación de Cuadro 6a				
280 μ M/1.5 mg/L (18)	0	0	0	0
Control	41	7	1.5	68
20 μ M/2.0 mg/L (19)	48	8	1.7	80
40 μ M/2.0 mg/L (20)	50	8	1.0	83
90 μ M/2.0 mg/L (21)	33	6	2.8	55
100 μ M/2.0 mg/L (22)	30	5	1.7	50
240 μ M/2.0 mg/L (23)	2	1	0.5	3
280 μ M/2.0 mg/L (24)	0	0	0	0
Control	54	9	0.6	90
20 μ M/2.5 mg/L (25)	43	8	1.5	83
40 μ M/2.5 mg/L (26)	41	8	1.0	83
90 μ M/2.5 mg/L (27)	23	5	2.7	45
100 μ M/2.5 mg/L (28)	15	3	1.9	25
240 μ M/2.5 mg/L (29)	0	0	0	0
280 μ M/2.5 mg/L (30)	0	0	0	0

Cuadro 6b: Prueba de Tukey ($\alpha=0.05$) para la comparación de medias de callos obtenidos, luego de combinar varias concentraciones de L-triptofano y 2,4-D.

Tratamientos	Significancia
8,13 vrs 9, 10, 15, 16, 21, 22, 27	*
8, 13 vrs 3, 4, 28	*
8, 13 vrs 11, 17, 23, 30	*
8, 13 vrs 5, 6, 12, 18, 24, 29	**
14,20,25,26 vrs 9,10,15,16,22,27	*
14,20,25,26 vrs 3,4,11,17,23,28,30	*
14,20,25,26 vrs 5,6,12,18,24,29	**
1,2,7,19,21,22 vrs 11,17,23,30	*
1,2,7,19,21,22 vrs 5,6,12,18,24,29	**
5,6,12,18,24,29 vrs 9,10,15,16,22,27	*

Cuadro 7: Evaluación de la capacidad morfológica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	20 μ M	40 μ M	90 μ M	100 μ M	240 μ M	280 μ M
Total de callos	44	42	45	19	17	0	0
No contamin.	40	40	44	19	16	0	0
Con brote	8	16	16	17	4	0	0
Total de brotes	12	26	28	29	10	0	0
Brotes / callo	2	2	2	2	3	0	0
Total plantas	13	15	22	22	5	0	0
Promedio plantas/callo ♣	2	1	1	1	1	0	0
% callos morfológicos ♠	20	40	36	89	25	0	0

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

En el segundo tratamiento, donde se incrementó la concentración de 2,4-D a 1 mg/L, con las mismas concentraciones de L-triptofano, los mejores resultados de formación de callos se obtienen con 20 y 40 μM , con tendencia a disminuir en la medida en que se aumenta la concentración de L-triptofano. El control presentó porcentajes de calogénesis similares al tratamiento con 40 μM , pero mostró una mayor cantidad de callos con raíz.

La concentración 90 μM genera pocos callos, pero con una mejor capacidad de regeneración puesto que se logró obtener la mayor cantidad de plántulas, con un 100 % de callos morfogénicos (cuadro 8).

Cuadro 8: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 1 mg/L de 2,4-D, luego de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	20 μM	40 μM	90 μM	100 μM	240 μM	280 μM
Total de callos	52	40	54	28	24	1	0
No contamin.	36	40	54	28	34	0	0
Con brotes	16	8	33	28	12	0	0
Total de brotes	26	18	50	51	10	0	0
Brotos/callos	2	2	2	2	1	0	0
Total plantas	25	12	37	41	9	0	0
Promedio Plantas/callos ♣	2	2	1	2	1	0	0
% callos morfogénicos ♠	44	20	61	100	50	0	0

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados $\times 100$.

Con una concentración de 1.5 mg/L de 2,4-D e iguales concentraciones de L-triptofano, los mejores porcentajes de calogénesis se observan con 20 y 40 μM . Similares resultados se observaron con el tratamiento control. Para las concentraciones de 90 y 100 μM los porcentajes de calogénesis disminuyen hasta la no formación de callos a concentraciones de 240 y 280 μM de L-triptofano.

Se obtuvo un 100% de callos morfogénicos en los experimentos de regeneración con una concentración de 90 μM de triptofano y 1.5 mg/L de 2,4-D. El número de plántulas fue mayor que el cultivo control y que el resto de tratamientos (Cuadro 9). La regeneración disminuyó notablemente después de los 100 μM de triptofano.

Cuadro 9: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 1.5 mg/L de 2,4-D, luego de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	20 μM	40 μM	90 μM	100 μM	240 μM	280 μM
Total de callos	53	53	52	20	25	1	0
No contamin.	49	53	52	20	20	0	0
Callos con brotes	23	8	27	20	7	0	0
Total de brotes	30	17	62	44	13	0	0
Brotes/callos	1	2	2	2	1	0	0
Total plantas	28	17	33	33	6	0	0
Promedio plantas/callos ♣	1	1	1	2	1	0	0
% callos morfogénicos ♠	47	15	52	100	35	0	0

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Los valores de 20 y 40 μM de L-triptofano en combinación con 2 mg/L de 2,4-D, favorecen la formación de callos, lo cual incrementó en un 20 % en relación con el cultivo control. Concentraciones superiores a los 100 μM de L-triptofano, disminuyen la formación de callos y causan una degeneración del material inicial, probablemente debido a que dichas concentraciones resultan ser tóxicas para el explante.

El cuadro 10 muestra los porcentajes de regeneración. Se puede notar que los datos de regeneración son más altos en el cultivo control que en el resto de tratamientos, pero el mejor

resultado con L-triptofano se observa con 90 μM ; sin embargo, con valores superiores a 100 μM la regeneración disminuye.

Cuadro 10: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 2 mg/L de 2,4-D, luego de diez semanas en medio de regeneración

Tratamiento	Control	20 μM	40 μM	90 μM	100 μM	240 μM	280 μM
Total de callos	41	48	50	33	30	0	0
No contamin.	36	48	50	28	30	0	0
Con brotes	21	10	14	14	10	0	0
Total de brotes	35	26	30	31	15	0	0
Brotes por callo	2	1	2	2	2	0	0
Total plantas	38	11	15	20	13	0	0
Promedio plantas/callos ♣	1	1	1	1	1	0	0
% callos morfogénicos ♠	58	21	28	50	33	0	0

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. callos no contaminados x 100.

Al incrementar la concentración de 2,4-D hasta 2.5 mg/L, los porcentajes de callogénesis resultaron ser menores que el cultivo control (Cuadro 5a). Es notable que altas concentraciones de esta auxina y de L-triptofano ocasionan algún efecto tóxico en la formación de callos, pues el control presenta mejores resultados que todos los tratamientos correspondientes a este experimento.

El cuadro 11 muestra que la cantidad de plantas regeneradas en estos tratamientos es más baja que el control. Concentraciones superiores a los 100 μM de L-triptofano inhiben la formación de plantas.

Cuadro 11: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano con 2.5 mg/L de 2,4-D, luego de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	20 μ M	40 μ M	90 μ M	100 μ M	240 μ M	280 μ M
Total callos	54	50	50	27	15	1	0
No contamin.	50	50	50	27	15	0	0
Con brotes	22	25	18	12	5	0	0
Total de brotes	21	35	20	15	7	0	0
Brotes/callos	1	1	1	1	1	0	0
Total plantas	29	8	12	8	5	0	0
Promedio plantas /callos ♣	1	1	1	1	1	0	0
% callos morfogénicos ♠	44	50	36	44	33	0	0

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. callos no contaminados x 100.

La prueba de análisis de varianza para el total de callos obtenidos en todos los tratamientos, muestra diferencias altamente significativas ($F= 29.3$, $P= 0.00$). Esto sugiere que para el cultivar CR-5272, el explante responde en forma diferente, en cuanto a la formación de callos, al ser expuesto a las distintas concentraciones de L-triptofano con el 2,4-D. La callogénesis fue inducida con ciertas concentraciones y con otras el explante dió lugar a la formación de estructuras foliares parecidas a brotes y con abundantes raíces. Al realizar una prueba de comparación de medias (Tukey $\alpha=0.05$), se observaron 7 grupos de tratamientos con promedios significativamente diferentes.

Al efectuar un análisis de varianza de dos vías para los promedios de callos, se observa que el efecto del L-triptofano fue altamente significativo ($F= 38.2$, $P= 0.0$) e igualmente con 2,4-D se obtuvieron diferencias altamente significativas ($F= 55.1$, $P=0.0$) para la formación de los callos. La interacción entre el aminoácido y el 2,4-D fue altamente significativo ($F= -42.9$,

P=0.0), mostrando una inhibición en la formación de callos y en la regeneración de plantas, al incrementarse la concentración de ambos (Figura 4).

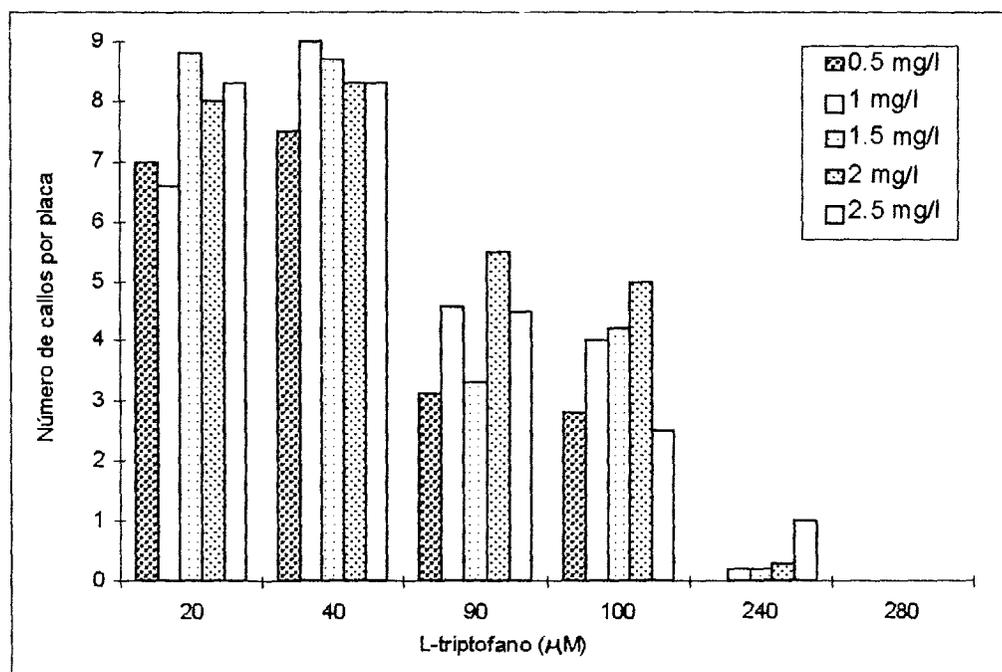


Fig 4: Interacción entre tratamientos con varias concentraciones de L-triptofano con 2,4-D, en relación al número promedio de callos.

Estos resultados ponen en evidencia que la mejor concentración de L-triptofano fue 90 μM en combinación con 1 o 1.5 mg/L de 2,4-D. Estas concentraciones inducen efectivamente la formación de callos embriogénicos e incrementan la regeneración en términos del número total de plantas obtenidas.

Efecto combinado de L-prolina y L-triptofano en la inducción de callos y en la regeneración de plantas.

Para determinar los mejores resultados de callogénesis y de regeneración de plantas, obtenidos en los experimentos anteriores con cada uno de los aminoácidos estudiados, se realizó

una prueba de comparación de medias. Esto con el fin de utilizar las mejores concentraciones en el estudio del efecto combinado de ambos aminoácidos. Luego de esta prueba, las mejores concentraciones fueron para L-triptofano: 20, 40, 90 y 100 μM y para L-prolina: 3, 6 y 9 mM.

En el primer experimento se combinaron las anteriores concentraciones de L-prolina y de L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D. Los resultados de la callogénesis para estos tratamientos mostraron promedios muy similares entre sí (Cuadro 12). Al realizar un análisis de varianza de una vía sobre la cantidad de callos obtenidos en cada tratamiento, no se encontraron diferencias significativas ($F= 1.29, P=0.25$), lo cual fue comprobado al realizar la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$). No obstante, un análisis de varianza de doble vía, muestra que los efectos principales tanto de prolina ($F=1.45, P>0.05$) como de triptofano ($F=1.52, P>0.05$) y de su interacción ($F=1.11, P>0.05$) no son significativos, lo que sugiere que tanto el L-triptofano como el L-prolina, en forma independiente, influyen sobre la formación de callos y que su interacción a diferentes niveles junto con 0.5 mg/L 2,4-D, no afectan la callogénesis.

Cuadro 12: Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D.

Tratamiento (Prolina + triptofano + 2,4-D)	Nº total de callos	X callos/placa \pm D.E.		% callogénesis
3 mM + 20 μM + 0.5 mg/L	54	9.0	1.2	90
6 mM + 20 μM + 0.5 mg/L	48	8.0	1.2	80
9 mM + 20 μM + 0.5 mg/L	50	8.3	1.2	83
3 mM + 40 μM + 0.5 mg/L	35	5.8	3.4	58
6 mM + 40 μM + 0.5 mg/L	52	8.6	1.1	87
9 mM + 40 μM + 0.5 mg/L	50	8.3	1.2	83
3 mM + 90 μM + 0.5 mg/L	43	7.2	3.6	72
6 mM + 90 μM + 0.5 mg/L	47	7.8	1.3	78
9 mM + 90 μM + 0.5 mg/L	51	8.5	1.2	85
3 mM + 100 μM + 0.5 mg/L	40	6.7	3.5	66
6 mM + 100 μM + 0.5 mg/L	37	6.2	3.1	62
9 mM + 100 μM + 0.5 mg/L	38	6.3	1.7	63

Los datos de regeneración obtenidos muestran que los mejores resultados se obtuvieron al combinar 3 mM de L-prolina más 90 μ M de L-triptofano en presencia de 0.5 mg/L de 2,4-D. El porcentaje de regeneración alcanzado fue de 52% con un total de 38 plantas (Cuadro 13).

Cuadro 13: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, L-triptofano con 0.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en medio de regeneración.

*	3/20	6/20	9/20	3/40	6/40	9/40	3/90	6/90	9/90	3/100	6/100	9/100
Total callos	39	48	51	33	52	50	42	44	50	44	40	40
No contam.	33	48	51	33	52	50	39	44	50	44	36	40
Con brotes	5	2	13	8	14	16	20	16	6	17	13	4
Total brotes	9	3	17	21	24	27	35	18	9	36	21	6
Brotes/callo	2	2	1.3	3	2	2	2	1	2	2	2	2
Total plantas	8	2	13	15	19	20	38	25	8	21	9	3
Plantas/callo	1	1	1	2	1	1	2	2	1	1	1	1
%callos morf.	27	4	25	24	27	32	52	36	12	39	36	10

* En la fracción que aparece en la primera fila del cuadro, el numerador indica la concentración de L-prolina (mM) y el denominador la del L-triptofano (μ M).

El segundo tratamiento consistió en combinar las mismas concentraciones de ambos aminoácidos, pero incrementando el 2,4-D hasta 1 mg/L. Los porcentajes de callogénesis resultantes presentan mucha variación en todos los tratamientos. Los mejores promedios se encuentran con 3 mM/40 μ M y con 6 mM/100 μ M de prolina y de triptofano respectivamente (Cuadro 14).

Cuadro 14: Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 1 mg/L de 2,4-D, en el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. CR-5272).

Tratamiento (Prolina+ triptofano + 2,4-D)	No total de callos	X callos/placa \pm D.E.		% callogénesis
3 mM + 20 μ M + 1 mg/L (1)	12	2	2.7	20
6 mM + 20 μ M + 1 mg/L (2)	35	6	1.4	58
9 mM + 20 μ M + 1 mg/L (3)	24	4	2.0	40
3 mM + 40 μ M + 1 mg/L (4)	40	7	1.4	66
6 mM + 40 μ M + 1 mg/L (5)	16	3	2.2	26

9 mM + 40 μ M + 1 mg/L (6)	29	5	1.7	48
3 mM + 90 μ M + 1 mg/L (7)	17	3	0.7	28
6 mM + 90 μ M + 1 mg/L (8)	22	4	1.9	37
9 mM + 90 μ M + 1 mg/L (9)	20	3	1.6	33
3 mM + 100 μ M + 1 mg/L (10)	25	4	2.1	42
6 mM + 100 μ M + 1 mg/L (11)	39	7	1.8	65
9 mM + 100 μ M + 1 mg/L (12)	27	5	2.6	45

Los números entre paréntesis identifican el orden de cada uno de los tratamientos, para realizar la prueba de comparación de medias.

La prueba de análisis de varianza para los datos de callogénesis, muestra diferencias significativas ($F= 3.05$, $P= 0.0027$) y al realizar la prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$), se observaron tres grupos con promedios diferentes (Tratamientos 4 y 7, 4 y 5, 11 y 5).

El análisis de varianza de dos vías no detectó diferencias significativas ($P>0.05$) en el efecto de cada uno de los aminoácidos. Esto sugiere que en este experimento, la formación de callos no es directamente influenciada por la presencia de ambos factores y más bien el crecimiento del callo depende inicial y directamente del 2,4-D.

Los datos de regeneración se presentan en el cuadro 15. Se observa que estos son variables, por lo que debe existir algún factor externo que esté influyendo sobre estos resultados. No obstante, se obtuvo un 100 % de regeneración con 3 mM de L-prolina y 20 μ M de L-triptofano, para este experimento.

Cuadro 15: Evaluación de la capacidad morfológica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, L-triptofano con 1 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en un medio de regeneración.

*	3/20	6/20	9/20	3/40	6/40	9/40	3/90	6/90	9/90	3/100	6/100	9/100
Total callos	18	25	17	29	14	22	4	18	8	17	38	20
No contam.	18	25	17	29	14	22	4	18	8	17	38	20
Con brotes	18	17	3	10	10	16	2	7	5	6	16	9
Total brotes	21	24	7	13	17	20	10	28	13	20	27	35
Brotes/callo	1	2	2	1	2	1	5	4	3	3	2	5
Total plantas	16	22	7	7	13	13	10	20	10	13	21	16
Plantas/callo	1	1	2	1	1	1	5	3	2	2	1	4
% callos morf.	100	68	18	34	71	73	50	39	62	35	42	44

* En la fracción que aparece en la primera fila del cuadro, el numerador indica la concentración de L-prolina (mM) y el denominador la del L-triptofano (μ M).

El cuadro 16 muestra el número de callos obtenidos en el tercer tratamiento (diferentes concentraciones L-prolina y de L-triptofano con 2 mg/L de 2,4-D). Los mejores porcentajes de callogénesis para este experimento, se obtuvieron al combinar 6 mM de L-prolina con 20 μ M de L-triptofano, así como con 3 mM de L-prolina y 40 μ M de L-triptofano.

Al realizar un análisis de varianza de una vía, se encontraron diferencias significativas entre los promedios de callogénesis en los tratamientos ($F=2.28$, $P=0.0212$). Esto sugiere que en este experimento la presencia de ambos aminoácidos en las concentraciones ya señaladas, en combinación con 2 mg/L de 2,4-D, probablemente influye en los eventos de desdiferenciación celular en el tejido escutelar del explante, afectando la formación inicial del callo. La prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) muestra dos grupos de tratamientos con promedios significativamente diferentes (Tratamientos 2 y 12, 4 y 12). El análisis de varianza de dos vías, detectó diferencias altamente significativas para el efecto de L-prolina ($F=74.2$, $P>0.05$) y para el efecto de L-triptofano ($F=51.11$, $P>0.05$). Existe una alta significancia en la interacción de

ambos aminoácidos, siendo de tipo negativa, lo cual sugiere que ambos afectan la formación de callos en presencia de la concentración de 2,4-D antes mencionada. Esto puede comprobarse al observar los resultados, en donde los porcentajes de formación de callos se reducen al incrementar la concentración de ambos aminoácidos.

Cuadro 16: Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-triptofano, de L-prolina con 2 mg/L de 2,4-D, en el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. CR-5272).

Tratamiento (Prolina + triptofano + 2,4-D)	No total de callos	X callos/placa ± D.E.		% callogénesis
3 mM + 20 µM + 2 mg/L (1)	18	3	2.8	30
6 mM + 20 µM + 2 mg/L (2)	21	3	1.4	35
9 mM + 20 µM + 2 mg/L (3)	16	3	2.0	27
3 mM + 40 µM + 2 mg/L (4)	21	3	1.4	35
6 mM + 40 µM + 2 mg/L (5)	19	3	2.2	32
9 mM + 40 µM + 2 mg/L (6)	12	2	1.7	20
3 mM + 90 µM + 2 mg/L (7)	13	2	0.7	22
6 mM + 90 µM + 2 mg/L (8)	8	1	1.9	13
9 mM + 90 µM + 2 mg/L (9)	11	2	1.6	18
3 mM + 100 µM + 2 mg/L (10)	16	3	4.2	27
6 mM + 100 µM + 2 mg/L (11)	11	2	1.8	18
9 mM + 100 µM + 2 mg/L (12)	0	0	2.6	0

Los números entre paréntesis, identifican el orden de cada uno de los tratamientos, para la prueba de comparación de medias.

Los porcentajes de regeneración muestran respuestas muy variables que sugieren la acción de algún factor externo que esté influyendo sobre los resultados obtenidos. Sin embargo, para este experimento puede observarse (cuadro 17) como disminuye la cantidad de plantas resultantes para cada tratamiento y como las altas concentraciones de L-prolina y de L-triptofano inhiben la callogénesis y la subsecuente regeneración de plantas.

En este tratamiento se observó una alta necrosis y exceso de humedad, por lo que probablemente éste sea un factor importante, que influyó sobre los resultados finales.

Cuadro 17: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, L-triptofano con 2 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en medio de regeneración.

*	3/20	6/20	9/20	3/40	6/40	9/40	3/90	6/90	9/90	3/100	6/100	9/100
Total callos	16	21	14	20	15	9	13	16	20	24	15	♥
No contam.	16	21	14	16	15	9	13	16	20	24	15	
Con brotes	6	7	6	5	7	3	4	4	8	11	4	
Total brotes	10	10	6	7	12	5	7	8	30	25	8	
Brotes/callos	2	1.4	1	1.4	2	2	2	2	4	2.3	2	
Total plantas	7	10	0	6	8	4	6	7	26	16	8	
Plantas/callos	1	1	0	1	1	1	2	2	3	2	2	
% callos morf.	37	33	0	31	47	33	31	25	40	46	27	

* En las fracciones que aparecen en la primera fila del cuadro, el numerador indica la concentración de L-prolina (mM) y el denominador de L-triptofano (μ M).

♥ Para este tratamiento no hubo regeneración de plantas.

Al utilizar 2.5 mg/L de 2,4-D, en los medios de cultivo con las concentraciones de L-prolina y L-triptofano antes mencionadas, los mayores porcentajes de callogénesis se obtuvieron con 3mM de L-Prolina más 100 μ M de L-triptofano. En los otros tratamientos se produjeron porcentajes de formación de callos entre 25 y 37% (Cuadro 18). Concentraciones más altas de ambos aminoácidos reducen la formación de callos y aumentan la cantidad de callos necrosados.

La existencia de diferencias significativas en los promedios de callos resultantes en estos tratamientos ($F=7.81$, $P<0.05$), sugiere que la presencia de ambos aminoácidos en el medio de cultivo afecta la callogénesis. La prueba de comparación de medias (Tukey, $\alpha=0.05$) muestra 4 grupos de tratamientos con promedios significativamente diferentes (Tratamientos 9 y 10; 6 y

10; 10 y 11; 10 y 12). El análisis de varianza de dos vías, muestra como el efecto de L-prolina resultó ser significativo ($F=6.12$, $P<0.05$) no así el L-triptofano ($F=1.07$, $P>0.05$), que probablemente sea el factor que esté generando una disminución en la formación de callos. La interacción resultante de ambos aminoácidos fue significativa ($F=6.07$, $P<0.05$), lo que sugiere que la relación existente entre ambos aminoácidos con 2.5 mg/L de 2,4-D no es favorable.

Cuadro 18: Número de callos obtenidos y porcentajes de callogénesis resultantes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, de L-triptofano con 2.5 mg/L de 2,4-D, en el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L.CR-5272).

Tratamiento (Prolina + triptofano + 2,4-D)	No Total de callos	X callos/placa \pm D.E.		% callogénesis
3 mM + 20 μ M + 2.5 mg/L (1)	37	6	1.6	62
6 mM + 20 μ M + 2.5 mg/L (2)	34	6	1.2	57
9 mM + 20 μ M + 2.5 mg/L (3)	30	5	2.8	50
3 mM + 40 μ M + 2.5 mg/L (4)	29	5	2.3	48
6 mM + 40 μ M + 2.5 mg/L (5)	35	6	1.0	58
9 mM + 40 μ M + 2.5 mg/L (6)	24	4	2.5	40
3 mM + 90 μ M + 2.5 mg/L (7)	35	6	0.7	58
6 mM + 90 μ M + 2.5 mg/L (8)	31	5	0.7	52
9 mM + 90 μ M + 2.5 mg/L (9)	27	5	2.2	45
3 mM + 100 μ M + 2.5 mg/L (10)	48	8	1.2	80
6 mM + 100 μ M + 2.5 mg/L (11)	16	3	1.9	27
9 mM + 100 μ M + 2.5 mg/L (12)	0	0	0.0	0

Los números entre paréntesis, identifican el orden de cada uno de los tratamientos, para realizar la prueba de comparación de medias.

Las concentraciones de 3 mM de L-prolina con 20 y 40 μ M de L-triptofano, produjeron los mayores porcentajes de regeneración (Cuadro 19). Aún cuando la regeneración alcanzó un valor cercano a los 60 %, se obtuvieron algunas plantas albinas en 2 tratamientos. Al incrementar las concentraciones de ambos aminoácidos se inhibió casi en su totalidad la

regeneración, observándose solo formación de raíces y muchos callos se necrosaron a los diez días de realizado el subcultivo al medio de regeneración.

Cuadro 19: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos provenientes de la combinación de varias concentraciones de L-prolina, L-triptofano con 2.5 mg/L de 2,4-D, después de diez semanas en medio de regeneración.

*	3/20	6/20	9/20	3/40	6/40	9/40	3/90	6/90	9/90	3/100	6/100	9/100
Total callos	37	29	30	29	35	24	35	31	27	♣	♣	♣
No contam.	36	29	30	29	35	24	35	31	27			
Con brotes	21	13	7	14	15	0	3	4	5			
Total brotes	40	18	16	52	31	0	2	7	12			
Brotes/callo	2	1	2	4	2	0	1	2	2			
Albinos	0	0	0	0	2	3	0	0	0			
Total plantas	40	16	16	52	31	0	2	7	12			
Plantas/callo	2	1	2	4	2	0	1	2	2			
% callos morf.	58	45	23	48	43	0	6	13	44			

* En la primera fila que aparece con fracciones, el numerador indica la concentración de L-prolina (mM) y el denominador L-triptofano (μ M).

♣ En estos tratamientos no hubo formación de callos ni regeneración.

DISCUSION

Efecto de L-prolina en la callogénesis y la regeneración.

El éxito en el establecimiento de un cultivo embriogénico depende de la selección del explante inicial, de su etapa de desarrollo y de su condición fisiológica. Para esta investigación, la utilización de embriones cigóticos maduros proporcionó buenos resultados como explante inicial, pues tanto los cultivos sometidos a tratamientos así como los controles, presentaron valores adecuados en la formación de callos. Esto es coincidente con lo reportado por Siriwardana y Nabors (1983), Hartke y Lörz (1989), Jones y Rost (1989), Adkins *et al.*(1990), Chowdhry *et al.* (1993), Mitsuoka *et al.*(1994), Valdez *et al.* (1996). Además, pudo observarse como los callos embriogénicos se originan en el escutelo del embrión. Esto probablemente se debe a la acción de los reguladores de crecimiento endógenos que se liberan al exponer el explante al medio de cultivo, actuando sinérgicamente con el 2,4-D, como lo señalan Jones y Rost (1989).

Chowdhry *et al.* (1993) informan que un incremento en L-prolina de 3 a 12 mM junto con 10 mM de 2,4-D aumenta los porcentajes de regeneración de los cultivos somáticos de arroz y que la respuesta declinó alrededor de los 15 mM. En la presente investigación se obtuvieron resultados similares con uno de los tratamientos, en que al combinar las diferentes concentraciones de L-prolina con 0.5, 1, 1.5 y 2 mg/L, se tuvo regeneración en todos, pero los mejores resultados se obtuvieron combinando concentraciones de 6 y 9 mM L-prolina con 1 y 1.5 mg/L de 2,4-D.

El L-prolina promueve la embriogénesis en cultivo de tejidos somáticos de maíz (*Zea mays* L.) en concentraciones de 9 mM al utilizar como explantes embriones inmaduros y al agregar entre 0.5 y 1.0 mg/L de 2,4-D. Concentraciones de 20 mM de L-prolina resultan ser efectivas en maíz en combinación con 1 mg/L de 2,4-D para la inducción de embriones somáticos a partir del escutelo de embriones inmaduros (Kamo *et al.* 1985, McCain y Hodges 1986). Yin Yanhai *et al.*(1993) y Comejo *et al.*(1995) también han observado el efecto promotor de la prolina en la inducción embriogénica de suspensiones celulares de arroz; sin embargo, dichos investigadores hacen notar que el papel del L-prolina en la embriogénesis somática no es del todo claro. Los resultados obtenidos en nuestra investigación difieren con los obtenidos por otros autores. Esto puede deberse a que se utilizaron distintos medios de cultivo y también a las diferencias en los genotipos estudiados.

Los resultados obtenidos en los diferentes tratamientos con L-prolina junto con el 2,4-D, sugieren que los mayores porcentajes de calogénesis y de regeneración, se deben al efecto del L-prolina como fuente de nitrógeno en combinación con el nitrato de amonio presente en el medio MS. Es probable que estos dos compuestos sean la fuente de energía y del poder reductor necesario para el metabolismo de la sacarosa, que es convertida en glucosa, aportando las estructuras de carbono para producir compuestos orgánicos nitrogenados. De otro modo, se acumularían grandes cantidades tóxicas en forma de amoníaco (Salisbury y Ross 1994). Así, la acumulación de nitrato podría sobrecargar las reservas de carbohidratos presentes en el medio de cultivo, dando como resultado necrosis celular.

El amoníaco es tóxico para la célula vegetal, así como la presencia de moderadas a altas concentraciones de L-prolina. Al ser absorbidos en grandes cantidades, impondrían un esfuerzo

severo en el metabolismo de los carbohidratos que proveen las unidades de carbono necesarios para destoxificarse (Bidwell 1979, Salisbury y Ross 1994).

Al ser cultivados en la oscuridad, los callos no están expuestos a estímulos lumínicos. Por esto, las enzimas encargadas de realizar los procesos de formación de aminoácidos estructurales, importantes para el crecimiento celular y la proliferación de callos, probablemente se encuentren en el citoplasma, y no así en los cloroplastos, como sucede en los tejidos expuestos a la luz. Por esto, sería importante realizar investigaciones adicionales al respecto, para detectar la actividad de las enzimas relacionadas con el metabolismo del nitrógeno en los callos que crecen en condiciones de oscuridad.

La proliferación de células en los tratamientos con moderadas y altas concentraciones de L-prolina combinadas con 2.5 mg/L de 2,4-D, posiblemente sea una respuesta de las células para diluir el exceso de sales presentes en el medio de cultivo. Según Salisbury y Ross (1994), esto constituye uno de los mecanismos que posee la célula vegetal para el control de sales internas, ya sea aumentando el volumen celular o estimulando la división celular. Esto probablemente favorezca el crecimiento de las células del callo con grandes vacuolas, formando tejido hídrico y favoreciendo la necrosis celular.

Efecto de L-triptofano en la formación de callos y la regeneración de plantas.

Las concentraciones de 20 y 40 μM de L-triptofano, produjeron los mejores porcentajes de formación de callos, las de 90 μM y de 100 μM en forma moderada y con 240 y 280 μM no

hubo formación de callos. Esta tendencia se mantuvo en todos los tratamientos con 2,4-D (0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5 mg/L). La combinación de 90 μ M de L-triptofano y de 0.5 y 1.5 mg/L de 2,4-D, mostró los más altos porcentajes de regeneración (Cuadro 8). El cultivo control generó buenos datos de callogénesis, pero no alcanzó los niveles de regeneración logrados en los tratamientos anteriores.

Las diferencias obtenidas con respecto a la callogénesis, en los distintos tratamientos, se pueden atribuir a que el L-triptofano es un precursor de la auxina natural, ácido indolacético (AIA) en las células vegetales, cuya aplicación exógena aumenta la síntesis endógena del AIA en el tejido vegetal, promoviendo así los procesos de dediferenciación celular y de embriogénesis.

Esto concuerda con lo reportado por Siriwardana y Nabors (1983), Koetje *et al.* (1989), Lee *et al.* (1989), Chowdhry *et al.* (1993). Estos autores hacen notar la importancia del L-triptofano, como precursor de AIA, en el tejido vegetal. Nuestros resultados difieren con los resultados de Koetje *et al.* (1989), quienes reportan una disminución de la regeneración en presencia de L-triptofano en un medio N6.

Las auxinas juegan un papel importante en la inducción de callos, lo cual ha sido comprobado en esta investigación, al realizar una combinación de auxina sintética y de un precursor de auxina natural como lo es el L-triptofano. Se han presentado evidencias que indican que en zonas jóvenes y meristemáticas de la planta de arroz, se sintetiza triptofano y que cuando se da el inicio de la floración, este aminoácido es transportado hasta el endospermo en formación, donde se transforma, acumula y conjuga ya sea con mioinositol, con mioinositol-arabinosa, o con

mioinositol galactosa (Bandurski y Nonhebel 1983). La presencia de AIA conjugado naturalmente en la semilla de arroz, podría facilitar los procesos relacionados con la inducción del callo a partir del embrión cigótico maduro, al ser debidamente hidrolizado, lo que permitiría aprovechar la auxina natural presente en el explante, para hacer más efectivo el proceso de inducción morfogénica.

Michalczuk *et al.* (1992), sostienen que el 2,4-D promueve la acumulación de AIA, derivado del triptofano, en callos de *Daucus carota*; algo similar podría estar sucediendo en nuestros experimentos, lo que explicaría los resultados obtenidos con ciertas concentraciones de L-triptofano. Además, los mismos autores sugieren que el 2,4-D estimula la acumulación de grandes cantidades de AIA endógeno, el cual parece mantener la proliferación del callo y previene el desarrollo de embriones somáticos. Su remoción del medio y la subsecuente disminución en los niveles auxínicos naturales, permitiría la maduración de los embriones somáticos.

Esto también explica la interacción resultante entre L-triptofano y el 2,4-D por medio del análisis de varianza aplicado para los datos obtenidos de la callogénesis y su relación con los resultados de la regeneración. Es probable que los mayores porcentajes de callogénesis observados en 20 y 40 μM de L-triptofano con varias concentraciones de 2,4-D, que no muestran los mejores porcentajes de regeneración, se deban a que al inicio del cultivo muchas de las células del explante ya están determinadas para expresar su potencial morfogénico. Esto es debido al hecho de que dichas células tendrían una ventaja al estar cerca del eje embrionario, donde se facilita el acceso a las auxinas conjugadas del embrión.

Por otro lado, se observó que altas concentraciones de L-triptofano combinadas con bajas o altas concentraciones de 2,4-D, inhiben la formación de callos. Esto posiblemente se deba a que las concentraciones de L-triptofano superiores a 240 μM sean tóxicas, al inhibir los procesos de desdiferenciación celular. Al respecto, Bandursky y Nonhebel (1983) y Salisbury y Ross (1994), destacan que las auxinas naturales y sintéticas al acumularse en el tejido vegetal, pueden llegar a ser tóxicas para la célula vegetal y generar cambios a nivel transcripcional.

Efecto combinado de L-prolina, L-triptofano y 2,4-D en la formación de callos y la regeneración de plantas.

Al combinar ambos aminoácidos en el medio de callogénesis disminuye la formación de callos y la regeneración de plantas, cuando se comparan con los resultados obtenidos al agregar ambos aminoácidos de manera individual al medio de cultivo.

Los mejores resultados correspondieron a bajas concentraciones de 2,4-D, combinados con los dos aminoácidos también a bajas concentraciones. Es probable que dicha auxina promueva la acumulación de AIA, el cual sería proporcionado por bajas concentraciones de L-triptofano. Con esto, se activaría el proceso de mitosis en el tejido escutelar. Dicho mecanismo requiere la presencia de nitrógeno, ya sea como compuestos amoniacales o como nitratos y que son donados por L-prolina. La presencia de ambos aminoácidos podría permitir la formación de otros aminoácidos importantes de enzimas, de proteínas de transporte, todos necesarios para el crecimiento del callo.

Al respecto, Michalczuk *et al.* (1992), destacan que la presencia del 2,4-D para la inducción embriogénica es crítica y que esta condición está estrechamente asociada con el incremento en los niveles de AIA. Podría especularse que el 2,4-D no induce directamente la embriogénesis, sino más bien, altera el metabolismo endógeno del AIA, regulando las rutas de biosíntesis que intervienen en la transición de grupos celulares proembriogénicos a embriones.

La glutamina es un aminoácido esencial para el metabolismo de la célula vegetal. Sirve como precursor de varios compuestos importantes en las rutas de biosíntesis. El estímulo más común para la síntesis de glutamina es el suministro de nitrógeno, como amoníaco o como nitrato, que puede ser proporcionado por L-prolina. La glutamina podría actuar a su vez como un donador de nitrógeno para diversas síntesis importantes, y proveería el nitrógeno cíclico para el aminoácido triptofano. La glutamina también es el compuesto de transporte de nitrógeno para la síntesis proteica y de proteínas estructurales de mayor importancia, sobre todo en tejido en estado de crecimiento (Bidwell 1979). Esto explicaría en forma general alguna relación existente entre ambos aminoácidos, a pesar de que sus rutas metabólicas son muy diferentes. El L-prolina se deriva del ácido glutámico, proveniente del ciclo de Krebs. Por su parte, el AIA que se forma a partir del L-triptofano, aparece en las etapas iniciales del proceso respiratorio, por lo que la presencia de ambos aminoácidos favorecería el metabolismo respiratorio del callo, aún en ausencia del estímulo lumínico.

Cuando se observó una disminución tanto en la formación de callos como en la regeneración, es probable que un aumento en la concentración del 2,4-D estimule el ingreso de L-prolina y de L-triptofano hacia el interior de las células escutelares. Acá se iniciaría la formación

del callo. Si las concentraciones en el interior celular llegan a ser muy altas, las células del callo se verían en la necesidad de acumular dichos compuestos o sus derivados. Esto se traduciría en un efecto de toxicidad. Aún cuando las rutas metabólicas de tales aminoácidos sean independientes, una alta concentración de ambos, causaría grandes desordenes metabólicos.

Por otro lado, la presencia del 2,4-D podría provocar algún efecto sobre el L-prolina, pues Teologist (1986), informa que en células de tabaco, la presencia de esta auxina induce la formación de polipéptidos ricos en prolina. Estos estarían relacionados con la formación de la pared celular y de otras proteínas estructurales. Los autores señalan también que la presencia de una alta concentración de AIA o del 2,4-D, reduciría o anularía la síntesis de estos polipéptidos, con la consecuente inhibición de las rutas de biosíntesis.

Aún cuando el papel de la auxina sintética 2,4-D no sea bien comprendido, la participación de otros reguladores de crecimiento endógenos puede ser determinante en la inducción y desdiferenciación de las células del tejido explante. Por esto, sería muy conveniente realizar investigaciones sobre estos procesos y verificar el papel de otros reguladores de crecimiento en la callogénesis y en la regeneración de plantas de arroz.

CONCLUSIONES

- 1- El embrión cigótico maduro de arroz es un explante adecuado para la inducción de callos y la regeneración de plantas de arroz.
- 2- Las principales características de los callos embriogénicos son: apariencia nodular, estructura compacta y color amarillo.
- 3- La presencia del 2,4-D es fundamental para la desdiferenciación celular en el cultivo *in vitro* del arroz, su ausencia inhibe la formación de callos.
- 4- Las mejores concentraciones para la regeneración de plantas de arroz en un medio de inducción con L-prolina y 2,4-D fueron 6 mM/1 mg/L y 9 mM/ 1.5 mg/L respectivamente.
- 5- La concentración más efectiva de L-triptofano, para promover la callogénesis y la regeneración de plantas fue 90 μ M en combinación con 1 o 1.5 mg/L de 2,4-D.
- 6- Bajas concentraciones de ambos aminoácidos deben ser combinadas con niveles bajos de 2,4-D. Moderadas y altas concentraciones de éstos generan alteraciones metabólicas, como altos porcentajes de necrosis y de formación de callos rizogénicos.

CAPITULO II

EFECTO DE LA TEMPERATURA, DEL FRACCIONAMIENTO Y DE LA DESHIDRATACION DE CALLOS EN LA REGENERACION DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L. cv CR-5272).

RESÚMEN

Cuando se somete el explante a una temperatura de 27 °C por diez días antes de la siembra en el medio de callogénesis, la regeneración de plantas se incrementa en un 28 %.

La fragmentación de los callos antes del subcultivo en un medio de diferenciación, promueve un aumento en la formación de plantas. Con fracciones de callos de 5 mm de diámetro, se incrementó la regeneración en un 20 %. Diámetros superiores o inferiores a éste, aumentaron la necrosis e inhibieron la regeneración de plantas.

La fragmentación de los callos en 4 partes y los tratamientos de deshidratación de estos, por 24 horas antes de ser transferidos al medio de regeneración, favorecieron la formación de plantas. Los porcentajes de regeneración se incrementaron en un 92 %. El porcentaje es solo de 32 % en los cultivos control.

Se estudio el efecto del tamaño del frasco en la regeneración de plantas. Al colocar los callos en frascos de 10 cm de altura, con un diámetro de 5 cm , aumentó la formación de plantas en un 15 % , en relación con la obtenida en los frascos utilizados normalmente (6 cm de altura y 4.5 cm de diámetro). Se discute el efecto de los gases emitidos por los callos durante su crecimiento y desarrollo en condiciones *in vitro* y la forma en como su acumulación puede afectar estos procesos.

La aplicación de estos métodos mejora la formación de plantas de arroz, por lo que podría ser implementada en otros cultivares costarricenses de arroz.

INTRODUCCION

Para la inducción embriogénica en vegetales, y en particular en Monocotiledóneas, se requiere de la interacción adecuada de factores como el tipo y el estado fisiológico del explante, así como de las condiciones experimentales del cultivo.

Ciertos tratamientos aplicados al material explante o a callos pueden ser muy importantes en la inducción embriogénica. En ese sentido, los tratamientos con temperaturas previamente a la siembra del explante, resultan ser ventajosos. El tratamiento de las semillas con baja temperatura es esencial para la activación de muchas de sus rutas metabólicas y los valores entre los 0 y 10 °C son los más efectivos. En ciertos casos este requerimiento es necesario para la germinación del embrión y a la liberación de muchos nutrientes y reguladores de crecimiento endógenos presentes en la semilla (Bidwell 1979).

En algunos casos, una breve exposición a temperaturas cercanas al punto de congelación es necesaria para romper la latencia; en otros, se necesita un extenso período de exposición a esas bajas temperaturas (Leopold y Kriedemann 1975). Durante un tratamiento frío puede haber cambios en la distribución de materiales en la semilla. Los niveles de aminoácidos durante la latencia de la semilla son muy bajos, pero al tratarlos con bajas temperaturas, acumulan gran cantidad en el endospermo (Leopold y Kriedemann 1975). Sin embargo, en otros casos, temperaturas moderadamente altas mejoran la germinación y la mejor utilización y distribución

de todos los nutrientes y de los reguladores de crecimiento vegetal (Bidwell 1979, Salisbury y Ross 1994).

El tamaño inicial del explante (tejido organizado o callo), está relacionado con el crecimiento de los callos y la regeneración de plantas en especies de dicotiledóneas. Este aspecto no ha sido estudiado en cereales (Raghavan Ram y Nabors, 1985).

Por otro lado, Tsukuhara e Hirosawa (1992) y Rancé *et al.* (1994), muestran que la deshidratación de los callos de arroz (en placas de Petri con hojas de papel filtro), antes de ser transferidos a un medio de regeneración, incrementa la regeneración de plántulas. Además, Tsukuhara e Hirosawa (1992), destacan que la osmolaridad en los medios de crecimiento y de regeneración es importante para la obtención, retención y recuperación de una alta frecuencia de regeneración a partir de callos de arroz.

Muchas especies vegetales liberan una variedad de sustancias como compuestos fenólicos, acetaldehídos y etileno durante su crecimiento en el cultivo *in vitro*. Estos se acumulan y tienen un papel significativo en la regulación del crecimiento de callos, órganos o bien de la planta completa. Dichos compuestos aparecen en el medio cuando el explante es lesionado y pueden inhibir el crecimiento y la regeneración (Adkins *et al.* 1990, Adkins 1992).

Con el propósito de desarrollar la metodología que permita optimizar la obtención de callos embriogénicos y hacer más eficiente la regeneración de plantas de arroz (*Oryza sativa* L. cv CR-5272), la presente investigación tuvo como objetivos:

- Evaluar el efecto de la temperatura sobre el embrión cigótico maduro de arroz (explante), previo a la siembra en un medio de callogénesis.

- Estudiar el efecto de la deshidratación y del fraccionamiento de los callos antes del subcultivo en un medio de diferenciación.

- Examinar el efecto del tamaño de los frascos en el intercambio de gases experimentado por los callos y los embriones somáticos, durante el proceso de regeneración.

MATERIALES Y METODOS

Se utilizó como material explante embriones cigóticos maduros de arroz. Estas semillas fueron obtenidas en la oficina Nacional de Semillas de Costa Rica.

Tratamiento con temperatura ambiente

Los granos de arroz utilizados en el presente experimento son normalmente mantenidos a una temperatura de 5 °C, para prevenir la contaminación por bacterias y hongos, durante períodos prolongados de almacenamiento.

Se descortezaron 400 semillas que se habían mantenido a 5 °C; 200 se colocaron en un frasco de vidrio a temperatura ambiente ($27\pm 1^\circ\text{C}$) por cinco días antes de la siembra y las 200 restantes a temperatura ambiente por diez días previos a la siembra en un medio para la inducción de la calogénesis. Fueron sembrados 200 embriones cigóticos que se habían mantenidos a 5 °C, los cuales sirvieron como cultivo control. Se sembraron 10 embriones por placa de Petri hasta totalizar 20 repeticiones para cada uno de los experimentos.

La desinfección, siembra y subcultivos fueron realizados de acuerdo con la metodología presentada en el capítulo anterior. El medio de inducción consistió en un medio MS (Murashige y Skoog 1962), suplementado con 2.5 mg/L de 2,4-D, 30 gr/L de sacarosa, 0.1 gr/L de mio-inositol, 0.4 mg/L de tiamina y 3 gr/L de Phytigel (Valdez *et al.* 1996). El pH fue ajustado a 5.8 antes de agregar el gelificante y fue autoclavado por treinta minutos, a 121 °C y 15 libras de

presión. Una vez finalizada la siembra, las placas fueron debidamente selladas y rotuladas, para luego ser colocadas en la oscuridad a una temperatura de 25 °C.

Después de 3 semanas, los callos formados fueron separados y transferidos a un medio de regeneración que consistió de un MS (Murashige & Skoog 1962) sin 2,4-D pero suplementado con 0.5 mg/L benzilaminopurina (BAP) y 0.05 mg/L de ácido naftalenacético (ANA). Los callos fueron subcultivados cada tres semanas para evaluar su capacidad morfogénica. Los cultivos se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 12 horas, con lámparas fluorescentes (2000 lux), a 27 °C ±1.

Las plántulas con una altura de 15 cm fueron transferidas al invernadero y cubiertas con bolsas plásticas para una aclimatación antes de ser directamente expuestas en el invernadero.

Fraccionamiento de callos previo subcultivo a medio de regeneración.

Se descortezaron 300 cariósides de arroz. La desinfección, extracción y siembra de embriones fueron realizadas según la metodología descrita anteriormente. Estas semillas fueron separadas en tres grupos, cada uno de 100 semillas, sembradas en 10 placas de Petri. El medio de callogénesis fue el mismo que se utilizó en la sección anterior. Después de 25 días en que el material estuvo expuesto en condiciones de oscuridad y a 25 °C, los callos del primer grupo, fueron fraccionados en 4 piezas. Los callos provenientes del segundo grupo fueron fragmentados en 8 partes y los del tercer grupo no fueron fraccionados y sirvieron como control.

En el momento de realizar cada tipo de fraccionamiento, se extrajo el alargamiento radical a cada uno de ellos. Se invirtió la posición del callo, de tal forma que la parte basal quedara hacia

arriba. En esta posición se introducen las puntas de las pinzas dentro del espacio interno del callo y se suelta suavemente hacia los extremos para no dañar y cortar el callo, pues se trata de fraccionarlo suavemente.

Con el objeto de poder determinar el tamaño adecuado de fraccionamiento, se tomaron medidas del diámetro de 30 fragmentos de callo, para cada uno de los tipos de fraccionamiento. Después de realizado esto, los callos fueron colocados en un medio de regeneración (Valdez *et al.* 1996). Estos fueron evaluados cada tres semanas hasta la obtención de plantas. Los cultivos se mantuvieron bajo un fotoperíodo de 12 horas con 2000 lux, a 27 °C.

Deshidratación de callos antes de transferirlos a un medio de regeneración.

Se utilizaron 120 semillas de arroz. La desinfección, siembra e inducción de callos se realizaron de la misma forma que en el capítulo anterior. Después de la siembra, se tomaron 6 placas de Petri con 10 embriones cada una y los callos formados de estos explantes fueron deshidratados parcialmente. Los callos provenientes de las 6 placas restantes no fueron deshidratados.

En el momento del subcultivo a un medio de regeneración, los callos provenientes de las primeras 6 placas de Petri, fueron fraccionados en 4 partes y fueron transferidos a placas de Petri (100x15mm), que contenían papel filtro previamente esterilizado (Marca Whatman No. 3). Las placas fueron selladas y colocadas a 27 °C por 24 horas en condiciones de oscuridad. Luego los callos fueron transferidos al medio de regeneración (Valdez *et al.* 1996), con un régimen de 12 horas luz a 27 °C. Los callos formados en las 6 placas restantes fueron fraccionados en cuatro

partes, pero no fueron deshidratados, por lo que estos callos fueron subcultivados directamente en el medio de regeneración y sirvieron como control.

Se realizaron subcultivos cada 3 semanas y las plántulas obtenidas fueron aclimatadas antes de ser transferidas al invernadero, colocándo bolsas plásticas, cuando éstas alcanzaron una altura de 15 cm .

Efecto del tamaño de los frascos en el desarrollo de embriones somáticos durante la regeneración.

Se inició el cultivo de los callos con 120 semillas de arroz. La desinfección y siembra de los embriones cigóticos fue realizada siguiendo la misma metodología descrita en el capítulo anterior. Después se tomaron 6 placas con 10 explantes cada una y los callos que se originaron en éstos, fueron fraccionados en 4 partes y colocados en placas de Petri con medio de regeneración (Valdez *et al.* 1996), durante las primeras 3 semanas. Luego fueron subcultivados en frascos de vidrio con altura de 10 cm y 5 cm de diámetro, colocando 4 callos por frasco. Estos fueron mantenidos en el medio de cultivo por 3 semanas más. Los brotes formados fueron transferidos a frascos del mismo tamaño, pero con un medio MS (Murashige y Skoog 1962) sin reguladores de crecimiento.

Los callos formados en las 6 placas de Petri restantes fueron fraccionados en 4 partes y subcultivados directamente en frascos de vidrio de 6 cm de altura y de 4.5 cm de diámetro, con el mismo medio de regeneración. El material formado se siguió subcultivando en este mismo tipo

de frasco. Todo el material de regeneración de este experimento fue mantenido a 27 °C, con un fotoperíodo de 12 horas.

RESULTADOS

Exposición de explante a temperatura de 27 °C por 5 días antes de la siembra.

En términos generales, la morfología de los callos obtenidos en todos los experimentos realizados con el genotipo CR-5272 fue muy parecida, las diferencias existentes se deben al efecto de los tratamientos aplicados.

Después de 25 días en el medio de callogénesis, se formaron callos secos, compactos, con formación de estructuras globulares en la periferia del callo. Otros dieron origen a muchas raíces y se necrosaron rápidamente.

El número total de callos obtenidos en el tratamiento con temperatura de 27 °C durante 5 días antes de la siembra, fue similar al control y al realizar la prueba de análisis de varianza de una vía de los promedios, no se encontró diferencia significativa ($F= 0.65$, $P= 0.4263$). El experimento fue repetido una vez más y mostró resultados similares. Igualmente, no se encontraron diferencias en la cantidad de callos formados al compararse con el control ($F= 0.01$, $P= 0.9327$) (Cuadros 20).

Cuadro 20 : Número de callos obtenidos en el tratamiento con temperatura de 27 °C por cinco días antes de la siembra en medio de callogénesis, para el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. CR-5272).

Experimento	Total explantes	Total de callos	X callos/placa ± D.E.		% callogénesis
Control	200	96	4.8	1.7	48
T 5 días	200	107	5.4	2.1	54
♦ T 5 días	200	97	4.9	2.3	49

♦ Datos resultantes de la repetición del experimento.

Después de 25 días en medio de callogénesis, los callos fueron transferidos a un medio de regeneración. Los resultados se presentan en el cuadro 21. Los porcentajes de callos morfogénicos, así como el número total de plántulas obtenidas, fue mayor en el material proveniente del tratamiento que en el cultivo control, lo cual incrementó la eficiencia de regeneración en un 25 %. Estos resultados sugieren la existencia de algún efecto fisiológico en el explante, ocasionado por la temperatura, junto con la acción de los reguladores de crecimiento endógenos del explante, que favorecen la inducción morfogénica de los callos proveniente del tratamiento.

Cuadro 21: Efecto de la temperatura a 27 °C por 5 días sobre el explante antes de la siembra, en la regeneración de plantas de arroz, después de doce semanas de cultivo.

Tratamiento	Control	T °5 días	T °5 días
Total de callos	76	93	77
No contaminados	76	93	77
Callos con brote	15	41	25
Total de brotes	20	82	30
Brotes / callo	1	2	1
Total plantas	16	33	20
Promedio plantas/callos ♣	1	1	1
% callos morfogénicos ♠	20	44	33

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Exposición del explante a temperatura de 27 °C por 10 días antes de la siembra en el medio de callogénesis.

El número de callos y los promedios obtenidos en este tratamiento, fueron mayores que en el cultivo control y presentaron diferencias significativas ($F= 7.55$, $P= 0.009$). Similares resultados se observaron en la repetición del experimento ($F= 12.86$, $P= 0.0009$) (Cuadro 22).

Cuadro 22: Efecto del tratamiento al explante con temperatura de 27 °C por 10 días antes de la siembra, en la formación de callos en el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. CR-5272).

Experimento	Total explantes	Total de callos	X callos/placa \pm D.E.		% callogénesis
Control	200	95	5.3	3.6	53
T 10 días	200	150	7.9	1.4	79
♦ T 10 días	200	162	8.1	1.6	81

♦ Datos obtenidos de la repetición del experimento.

Estos resultados sugieren que los procesos de desdiferenciación e inducción de la capacidad morfogénica son más efectivos debido al tratamiento. Este favorecería una mejor distribución de los nutrientes del endospermo hacia el escutelo y el embrión, lo cual facilitaría el crecimiento inicial del callo. Después de diez semanas en medio de regeneración, estos callos presentaron mayores porcentajes de regeneración y número de plántulas que el cultivo control y la regeneración se incrementó en 24 y 28 %, tanto para el experimento como para su repetición (Cuadro 23).

Cuadro 23: Efecto de la temperatura de 27 °C por 10 días en el explante antes de la siembra, en relación con la regeneración de plantas, después de doce semanas de cultivo.

Tratamiento	Control	T ° 10 días	T° 10 días
Total de callos	82	150	131
No contaminados	72	100	95
Callos con brote	14	39	46
Total de brotes	15	44	76
Brotes / callo	10	1	2
Total plantas	16	26	60
Promedio plantas/callos ♣	1	1	1
% callos morfogénicos ▲	19	39	49

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

▲ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Estos resultados indican que el explante responde en forma diferente al ser expuesto a esta temperatura. Es posible que los nutrientes y los reguladores de crecimiento se distribuyan mejor en el interior del explante, lo que haría más efectiva su utilización.

Fraccionamiento de callos embriogénicos, previo subcultivo a medio de regeneración.

Los callos fraccionados en cuatro partes con un diámetro promedio de 5 mm, muestran un incremento en la regeneración de un 13% en relación con el control. El diámetro promedio de los callos usados como control fue de 9 mm. En el caso del fraccionamiento en 8 partes, los callos tienen un diámetro promedio de 2 mm. Aquí el porcentaje de regeneración fue menor en un 23% que en los fraccionados en 4 partes. Este tratamiento presentó los menores porcentajes de regeneración. Además, cuando los callos se fragmentaron en 4, se obtuvo la mayor cantidad de brotes por callo, con un número total de plantas de 46, en comparación con 27 en el control y con 21, luego de fraccionarlos en 8 partes (Cuadro 24).

Cuadro 24: Efecto del fraccionamiento de callos en relación con la regeneración de plantas, después de diez semanas de cultivo.

Tratamiento	Control	Fraccion. 4	Fracción 8
Total de callos	90	75	82
No contaminados	90	70	82
Con brote	27	30	16
Total de brotes	41	53	24
Brotes / callo	2	2	1
Total plantas	27	46	21
Promedio plantas/callos ♣	1	2	1
% callos morfogénicos ▲	30	43	20

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

▲ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x 100.

Estos datos sugieren que tamaños superiores o inferiores a 5 mm , pueden reducir la regeneración. Con estos tamaños extremos, se incrementa la necrosis, como fue evidente después de quince días de subcultivos. Esto probablemente se deba a que el callo necesita de una superficie mínima para hacer eficiente la regeneración de plantas y que al romper la integridad del tejido disminuye el efecto cooperativo entre los grupos de células involucradas en las respuestas morfogénicas.

Efecto de la deshidratación de los callos previa transferencia a un medio de regeneración.

Los callos deshidratados durante 24 horas antes de ser transferidos a un medio de regeneración, incrementaron la regeneración de un 34% (control) hasta 70 y 92%. La cantidad de callos con brotes (Fig. 5), número de brotes por callo y el total de plántulas regeneradas, también se ven aumentados con el tratamiento (Cuadro 25).

Cuadro 25: Efecto de la deshidratación de callos en relación con la regeneración de plantas del cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. CR-5272), después de diez semanas de cultivo.

Tratamiento	Control	Deshidratación	Deshidratación
Total de callos	50	40	54
No contamin.	50	40	54
Con brote	17	28	50
Total de brotes	31	61	120
Brotes / callo	2	2	3 ♦
Total plantas	29	56	114
Promedio plantas/callos ♣	2	5	3
% callos morfogénicos ♠	34	70	92

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

♠ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x100

♦ Se obtuvieron hasta 7 plantas por callo.

Estos resultados podrían atribuirse a que la reducción en el contenido de agua en el callo puede causar plasmólisis en las células y esto provocaría un cambio en el balance endógeno de los reguladores de crecimiento, lo cual estimula las rutas metabólicas de diferenciación.

Efecto del tamaño de los frascos sobre el desarrollo de embriones somáticos en la regeneración.

Los mejores porcentajes de regeneración se presentan en aquellos callos que fueron colocados inicialmente en placas de Petri y luego en frascos de vidrio de 10 cm de altura y 6 cm de diámetro (Fig. 6) (Cuadro 26). Estos resultados sugieren que con frascos de vidrio más grandes para el crecimiento de los proembriones y embriones somáticos, se les provee un espacio

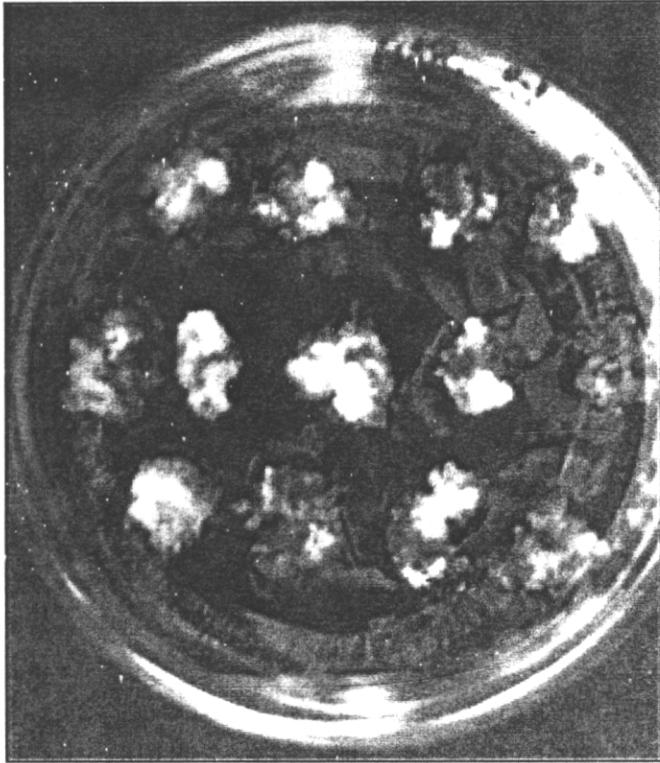


Fig. 5 : Morfología de callos embriogénicos deshidratados por 24 horas, luego de diez días en medio de regeneración.

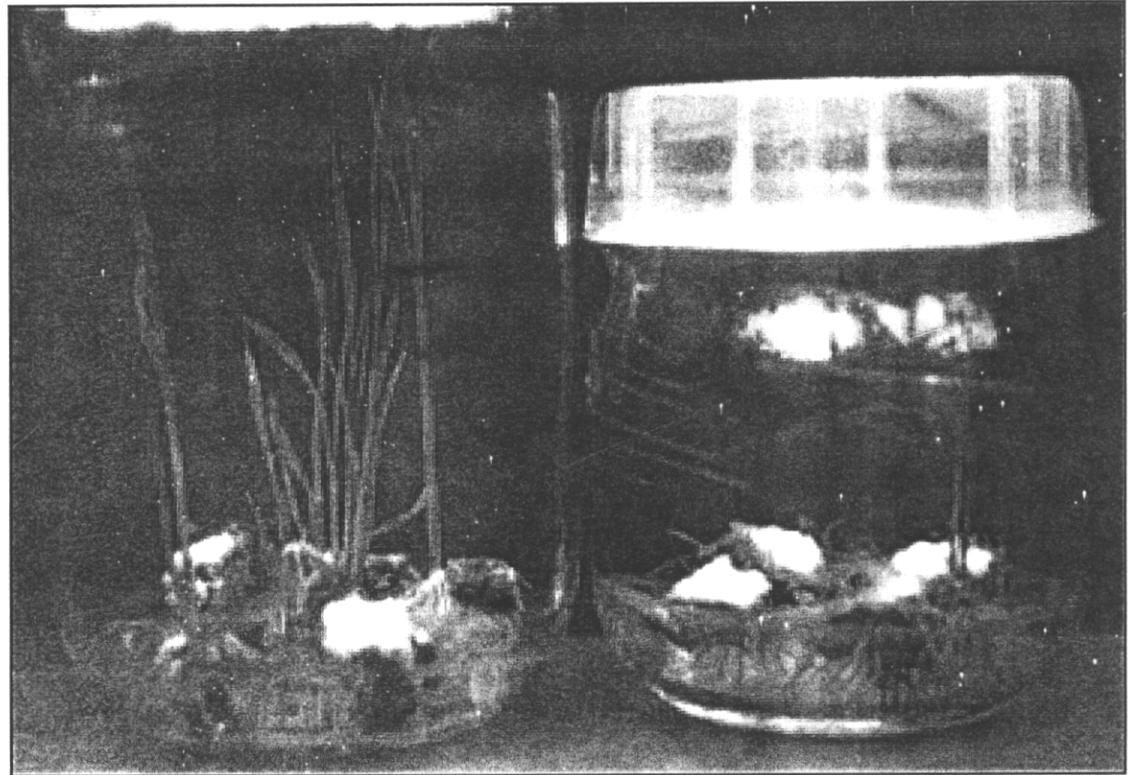


Fig. 6 :Efecto del tamaño de los frascos en la regeneración de plantas de arroz.

suficiente para el intercambio de gases y para evitar en alguna medida la acumulación de compuestos fenólicos, CO₂, etileno y otros compuestos que inhiben los procesos de regeneración.

Cuadro 26 : Efecto del tamaño del frasco, en relación con el número de plantas regeneradas, después de diez semanas de cultivo.

Tratamiento	Control	Experimento
Total de callos	51	49
No contamin.	45	49
Con brote	16	23
Total de brotes	41	47
Brotes / callo	2	2
Total plantas	23	38
Promedio plantas/callos ♣	1	1
% callos morfogénicos ▲	35	46

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes.

▲ No. callos con brotes / No. total de callos no contaminados x100.

DISCUSION

Exposición del explante a temperatura de 27 °C antes de la siembra en medio de callogénesis.

Los resultados obtenidos en esta investigación demuestran que la exposición de las semillas a $27\text{ °C} \pm 1$, antes de la siembra, producen una mayor cantidad de plantas; la exposición durante 10 días mostró ser más efectiva. Esto posiblemente se deba a que el rompimiento adecuado de la latencia de la semilla permita una mejor distribución de los nutrientes del endospermo hacia el embrión, pasando por el escutelo. La activación del cuerpo del embrión dentro de la cariósida, expuesto a $27\text{ °C} \pm 1$, probablemente active numerosas rutas metabólicas, lo cual incrementa las tasas de respiración celular y de niveles de energía, relacionados con la actividad mitocondrial. Grass y Burris (1995), que trabajaron con trigo, afirman que esta energía generada en la mitocondria, en forma de ATP, juega un papel importante en el metabolismo del explante desde las primeras horas de exposición a una temperatura de 27 °C como se observa en nuestros resultados.

Además, en estas condiciones, el 2,4-D podría favorecer una mejor actividad de desdiferenciación e inducción en el explante, a causa de una mejor utilización de los recursos disponibles, como los acumulados en el escutelo. Una vez agotados éstos, el siguiente paso sería la utilización de los nutrientes del medio de cultivo.

Es probable que en los cultivos control, donde las semillas son mantenidas a 5 °C antes de ser sembradas, estas sufran alteraciones a causa del frío. En efecto, su capacidad de formación de plantas es baja y los callos se necrosan rápidamente. Hale y Orcutt (1987) mencionan que en general, los tejidos dormantes en semillas son más tolerantes a los cambios de temperatura que los tejidos de rápido crecimiento, pero que cambios bruscos de esta, pueden ocasionar fallas en la germinación por una disminución en la absorción de agua y nutrientes.

Algunos autores como Ilker *et al.* (1979) (citado por Hale y Orcutt, 1987), sugieren que la exposición a 5 °C por 3 días, puede causar daños en las semillas a nivel de organización celular, que pueden ir desde la pérdida en la definición de los proplastidios y las membranas mitocondriales, hasta alteraciones en los ribosomas, que llegan a producir precipitaciones de proteínas en la vacuola.

Takahashi (1995), indica que el óptimo de temperatura para la germinación de la semilla de arroz es de un rango relativamente alto: el mínimo de temperatura está entre 8-10 °C, el máximo entre 42-44 °C y el óptimo entre 30-32°C. La viabilidad de las semillas de arroz se ve afectada por cambios de temperatura, lo que puede causar en éstas, un deterioro en la actividad respiratoria que altera su metabolismo (Grass y Burris, 1995). Con base en estas afirmaciones y los resultados obtenidos en nuestra investigación, sería conveniente controlar las temperaturas de almacenamiento del material explante. Esto permitiría un mejor entendimiento y manipulación del material explante, con la subsecuente mejora en la inducción de callos y regeneración de plantas de arroz.

Fraccionamiento de callos embriogénicos, previo subcultivo a un medio de regeneración.

Cuando el tamaño del callo es superior a 5 mm, probablemente la regeneración se reduce porque éste agota rápidamente la Benzilaminopurina presente en el medio de cultivo. Es probable que un incremento en la concentración de la citoquinina no estimule la regeneración, debido a que también se reduce la presencia de algún nutriente o regulador de crecimiento, cuyos requerimientos sean mayores. Cuando alguno de estos factores se vuelve limitante, por el alto consumo de éstos por el callo, es probable que se induzca una necrosis, tal como pudo observarse en nuestros resultados. Al respecto, Hale y Orcutt (1987), señalan que las deficiencias de nutrientes en el tejido vegetal, causan necrosis, aún cuando estén disponibles los reguladores de crecimiento.

Los callos fraccionados en 8 partes presentaron mucha necrosis y baja regeneración, cuando se comparan con el cultivo control. Estos aspectos son similares a los de Raghava Ram y Nabors (1985) y Rueb *et al.* (1994), aunque ellos trabajaron con base en el peso y el volumen (mm^2) del callo en el momento del fraccionamiento antes de su transferencia al medio de regeneración.

La alta necrosis observada al final de la etapa de regeneración de este experimento, puede ser atribuida al daño físico causado en el momento del fraccionamiento. En efecto, las rupturas y daños celulares, liberan muchos compuestos fenólicos que pueden interferir o modificar el ácido indolacético de las células en crecimiento (Milborrow, 1984).

Un inadecuado fraccionamiento que dañe a los callos puede producir muchas modificaciones, tal y como lo indican Tran Thanh Van (1981) y Hale y Orcutt (1987), quienes observaron incrementos en la permeabilidad de la membrana, destrucción o síntesis de reguladores de crecimiento, síntesis activa de compuestos fenólicos y un incremento en la respiración y producción de etileno. Este tipo de cambios provoca una coloración café oscura característica del material necrosado. Lo anterior coincide con lo observado en esta investigación.

Efecto de la deshidratación de los callos, previa transferencia a medio de regeneración.

La deshidratación parcial de los callos de arroz por 24 horas, incrementó los porcentajes de regeneración en un 36 y 72 % en relación con los controles. Estos porcentajes son comparables a los reportados por Tsukuhara e Hirose (1992), quienes incrementaron sus frecuencias de regeneración de 5% a 47%, en cultivos de células en suspensión de la variedad *japonica* "Sasanishiki".

Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por Rancé *et al.* (1994), quienes obtuvieron altos porcentajes de regeneración de plantas (61.1 % a 73.7%), en tres variedades de arroz *indica*, luego de la deshidratación de callos derivados de embriones cigóticos maduros.

Es posible que el callo al ser deshidratado, provoque un desbalance en los niveles de los reguladores de crecimiento endógenos, activando a algunos y desactivando a otros. Leonardi *et al.* (1995), trabajando con suspensiones celulares de arroz, encontraron que el ácido absísico (ABA) puede aparecer en las células vegetales, como respuesta ante el "estrés" hídrico. La conexión entre el efecto del ABA y la embriogénesis somática no es clara, esta podría ser una

función defensiva ante la deshidratación y que esté mediada por el ABA, por lo que más investigaciones en torno a esto podrían ser llevadas a cabo. La utilización de otros agentes osmóticos en el medio de callogénesis para el cultivar de arroz CR-5272, podría aportar buena evidencia acerca del papel fisiológico del ABA, ante el “estrés” osmótico y su relación con la embriogénesis somática.

Efecto del tamaño de los frascos sobre el desarrollo de los embriones somáticos en los experimentos de regeneración.

El aumento de la regeneración en los callos colocados en placas de Petri, probablemente se deba a que los callos reciben la luz directamente. Esto favorece el desarrollo inicial de los cloroplastos y del proceso fotosintético, que inducen a su vez la formación de brotes. Estos callos con brotes, al ser subcultivados en frascos de mayor tamaño, tienen una mayor disponibilidad de oxígeno, lo cual no permite la acumulación de CO₂. Lo anterior coincide con lo reportado por Adkins (1992), Salisbury y Ross (1994), quienes indican que el tejido al crecer en presencia de luz, inhibe la formación de etileno, pero dado el aumento en el metabolismo por la fotosíntesis y la respiración celular, provoca una mayor producción de CO₂, que favorece la acumulación de precursores de etileno, lo cual puede ser controlado al colocar los callos en condiciones adecuadas.

El bajo porcentaje de regeneración obtenido en el cultivo control, se debe probablemente a que el frasco de vidrio utilizado es pequeño y no proporciona el espacio suficiente para el intercambio de gases, situación que permite la acumulación de CO₂, acetaldehídos, etanol y etileno, lo cual coincide con lo mencionado Adkins *et al.* (1990), Adkins (1994). Además, dichos

compuestos pueden causar una diferenciación temprana en el callo, lo cual inhibe la formación de la clorofila, aún cuando esté presente el estímulo lumínico, e impide de esta forma la regeneración de plantas.

CONCLUSIONES

- Los tratamientos del explante con una temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, durante diez días previo a la siembra en medio de callogénesis, incrementa la regeneración de plántulas de arroz.
- Los callos fraccionados en 4 partes y con un diámetro promedio de 5 mm, incrementan en sus valores de regeneración. Diámetros superiores o inferiores a este, aumentan la necrosis y disminuyen la regeneración.
- Los tratamientos de deshidratación de los callos por 24 horas, antes de ser transferidos a medio de diferenciación, incrementaron los porcentajes de regeneración en un 36 y 58 %, en relación con los controles.
- Los frascos de vidrio más grandes, proveen más oxígeno al callo, con lo que se incrementa la calidad de los callos en condiciones de regeneración y se aumenta la formación de plantas en un 15 % en relación con el cultivo control.

CAPITULO III

DESCRIPCIÓN HISTOLÓGICA DE LA EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ARROZ

(*Oryza sativa* L. CULTIVAR CR-5272).

RESÚMEN

Estudios anatómicos e histológicos de los callos de arroz muestran que éstos se originan del epitelio escutelar de los embriones cigóticos maduros (explantes). Al crecer en un medio Murashige y Skoog (1962) suplementado con 2.5 mg/L 2,4-D, presentan grupos de células embriogénicas en las zonas periféricas, las cuales a su vez darán lugar a la formación de proembriones y de embriones somáticos. Las células de los callos embriogénicos se caracterizan por tener núcleo y nucleolo conspicuos, forma isodiamétrica, citoplasma denso y están acompañadas de células adyacentes con abundantes gránulos de almidón. Los embriones somáticos completan su desarrollo para dar formación a plántulas completas, al estar en un medio de regeneración.

Callos embriogénicos de 5 días fueron sometidos al método de transformación genética por biobalística, para evaluar su impacto en la regeneración de plantas. Al evaluar los resultados se encontró que dicho método no causa daño sobre el callo, pues al ser comparado con el control, que no fue sometido al método, no se encontraron diferencias en los porcentajes de regeneración final.

Los estudios histológicos permitieron observar la expresión transitoria del gen GUS en grupos de células de las capas más externas de los callos embriogénicos, sometidos al método de biobalística.

INTRODUCCION

A pesar del gran número de investigaciones acerca de la embriogénesis somática en varias especies, muy pocas aportan la evidencia suficiente para comprender el proceso. Por lo anterior, la realización de estudios anatómicos e histológicos en los callos potencialmente embriogénicos, permite comprobar la existencia del proceso embriogénico y posibilita así su optimización.

Las células pre-embriogénicas o embrioides, presentan muy a menudo características comunes a las de células meristemáticas con una rápida división celular. Estas son: tamaño pequeño, contenido citoplásmico denso, núcleo grande con nucleolo prominente, pequeñas vacuolas. Sin embargo, para la investigación de estas características citológicas y de los procesos de desarrollo, se requiere de estudios histológicos y anatómicos comparativos para ilustrar cada etapa sucesiva del fenómeno embriogénico (Chen *et al.* 1985, Williams y Maheswaran 1986).

Haccius (1978), sostiene que los embriones cigóticos y somáticos tienen un origen unicelular, sin embargo, comunmente se afirma que los embriones se originan de masas proembriogénicas, las cuales fueron derivadas de células individuales y según Stamp (1987),

esto puede ser dilucidado por medio de los estudios anatómicos e histológicos de material embriogénico.

Por su parte, Higuchi y Maeda (1991), destacan que el cultivo de tejidos vegetales se presenta como una alternativa fácil para el estudio de los procesos de regeneración de plantas, ya sea por organogénesis o embriogénesis somática, que podrían ser fácilmente reconocidos y entendidos al emplear estrategias histológicas para su estudio. Existen muchas publicaciones que demuestran y confirman las estructuras características de los callos embriogénicos, los cuales tienen el potencial de regenerar plántulas a través de la embriogénesis somática (Jones y Rost 1989, Kott y Kasha 1984).

La utilización de métodos de tinción en estudios anatómicos e histológicos de la embriogénesis somática, ha permitido en muchos casos la localización de los eventos iniciales del proceso. Entre las técnicas de tinción utilizadas están la de safranina y "fast-green", la triple que incluye tinciones con hematoxilina, azul de metileno y rojo rutenio, que han sido aplicadas exitosamente a callos provenientes de inflorescencias jóvenes de arroz, de ápices de raíz y de células epidérmicas del escutelo de embriones inmaduros de arroz. Chen y Chen (1985) utilizaron la tinción triple para dilucidar la formación de embriones somáticos a partir de inflorescencias jóvenes de arroz.

Estos tipos de tinción también han sido aplicados a otras especies de gramíneas como lo son *Triticum aestivum*, *Zea mays*, *Panicum maximum*, *Elaeis guineensis*, etc. (Yatazawa *et al.* 1967, Mott y Cure 1977, Magnusson y Bommman 1985, Yi-Lu y Vasil 1982, McCain y Hodges 1986, Schwendiman *et al.* 1988, Jones y Rost 1989).

Jones y Rost (1989), utilizaron embriones cigóticos maduros de arroz como material explante para la obtención de callos embriogénicos y hacen notar que éstos se originan del escutelo del embrión, lo cual han corroborado por medio de estudios anatómicos e histológicos.

Por la importancia que tiene la histología en el cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, para entender los procesos de embriogénesis somática, la presente investigación tuvo como objetivos:

- Describir los eventos anatómicos e histológicos que ocurren en las células proembriogénicas.

- Diferenciar cada fase de la embriogénesis somática.

- Comparar histológicamente los tejidos sometidos al método de biobalística con un cultivo control.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material explante

Se utilizó como material explante embriones cigóticos maduros de arroz. Las semillas fueron obtenidas de la Oficina Nacional de Semillas de Costa Rica.

La desinfección y siembra de embriones cigóticos maduros fue realizada según la metodología descrita en el primer capítulo y el medio de inducción callogénica consistió de un MS (Murashige y Skoog 1962) con 30 gr/L de sacarosa, 0.1 g/L de myo-inositol y 3 gr/L de phytigel. El medio fue suplementado con 2.5 mg/L de 2,4-D y el pH del medio fue ajustado a 5.8 antes de ser autoclavado y luego depositado en placas de Petri (100x15 mm). Se completaron 20 placas y en cada una fueron sembrados 10 embriones, para un total de 200. Después de finalizada la siembra, todo el material fue colocado en un cuarto de crecimiento en oscuridad y a temperatura de 25 °C.

Fueron sembrados 200 embriones más sobre un mismo medio de inducción callogénica, y después de 5 días, los callos originados de 60 embriones fueron sometidos a tratamiento de biobalística con micropartículas de tungsteno (1 μm de diámetro) solamente. Los callos formados a partir de otros 60 explantes, fueron sometidos al método con micropartículas de tungsteno recubiertas con ADN, y los callos derivados de otros 60 más sirvieron de control. El acelerador de partículas (PIG "Particle Inflow Gun") utilizado es similar al de Finer *et al.* (1992). Se empleó una presión de gas helio de 80 PSI. Se realizaron seis disparos sobre grupos

de 20 callitos colocados en el centro de la placa de Petri y después fueron puestos en el medio de cultivo, en condiciones similares a las mencionadas anteriormente.

Fueron tomadas muestras de callos a los cinco, diez, quince y veinte días para fijarlos en formalina ácido acético (FAA) y luego fueron procesados para el estudio histológico. Los callos provenientes del tratamiento con el método de biobalística fueron fijados en Glutaraldehído al 10% y luego fijados en resina para su estudio histológico.

Tanto la preparación de partículas de tungsteno con ADN como la aplicación del método de biobalística, fueron realizados por Marco Páez y Tania Quesada del Centro de Investigaciones en Biología Celular y Molecular.

TÉCNICAS HISTOLÓGICAS.

Las observaciones histológicas, se realizaron tanto en los tejidos sometidos al proceso de biobalística como en el control y las muestras de tejido se tomaron con base en características morfológicas favorables presentes en cada etapa, desde la siembra hasta la regeneración de plantas. La preparación de cortes se realizó de la siguiente forma:

1) **Fijación.** Se hizo en una solución de glutaraldehído(10%)/formalin-ácido acético/(5:5, en 90 ml de alcohol 70%)(v/v) durante una noche al vacío y luego dos días a 4°C.

2) **Deshidratación.** Se realizó sumergiendo el tejido en etanol a 70° por una hora, luego en etanol 95° por una hora y por último en etanol puro por una hora más, tres veces consecutivas.

3) **Impregnación.** Se inició en tolueno-alcohol (1:1)(v/v) por 30 minutos, luego en tolueno puro tres veces en una hora, en seguida en tolueno:parafina (1:1)(v/v), parafina una hora dos veces y parafina una noche.

4) **Inclusión de los callos y embriones cigóticos maduros:** Fue en parafina y los cortes se hicieron con un grosor de 9-12 mm. Luego se colocaron sobre un porta objetos con una solución adhesiva y se calentaron para extender la parafina junto con el tejido y evitar la formación de pliegues.

5) **La Tinción** se realizó con la coloración cuádruple (Boissot 1990).

Los callos sometidos al método de biobalística, fueron fijados en Glutaraldehido (10%) y luego infiltrados en resina para su procesamiento histológico.

RESULTADOS

Descripción de características de células proembriogénicas.

Al momento de realizar la siembra, el embrión cigótico maduro de arroz es colocado con la región escutelar expuesta a la superficie del medio de cultivo. Dicho explante consta de un eje embrionario encerrado en el escutelo, un tejido importante en el desarrollo del embrión.

El escutelo consta de una capa externa de células, situada entre el endospermo y el cuerpo del embrión. Dichas células externas, son de forma columnar, con denso citoplasma, núcleos conspicuos y que presentan diferencias morfológicas con el resto de células del parénquima escutelar (Fig. 7a), pues éstas son más o menos esféricas y de mayor tamaño, muy parecidas a un parénquima fundamental.

Se observó como después de 24 horas, las células del epitelio escutelar sufren divisiones periclinales (Fig. 7b), que después de 3 días dan como resultado zonas de alta división celular (Fig. 7c). Las células de estas zonas se caracterizan por ser pequeñas, con citoplasma denso, núcleo prominente y con varios planos de división celular, las que posteriormente darán origen a estructuras delimitadas y con formas características, como lo son los embriones globulares.

Callo de 5 días en medio de callogénesis.

Al realizar un corte longitudinal del callo, se observa que se diferencian claramente 2 capas de células: la primera consta de entre 9 y 12 hileras de células, cuyo tamaño aumenta a

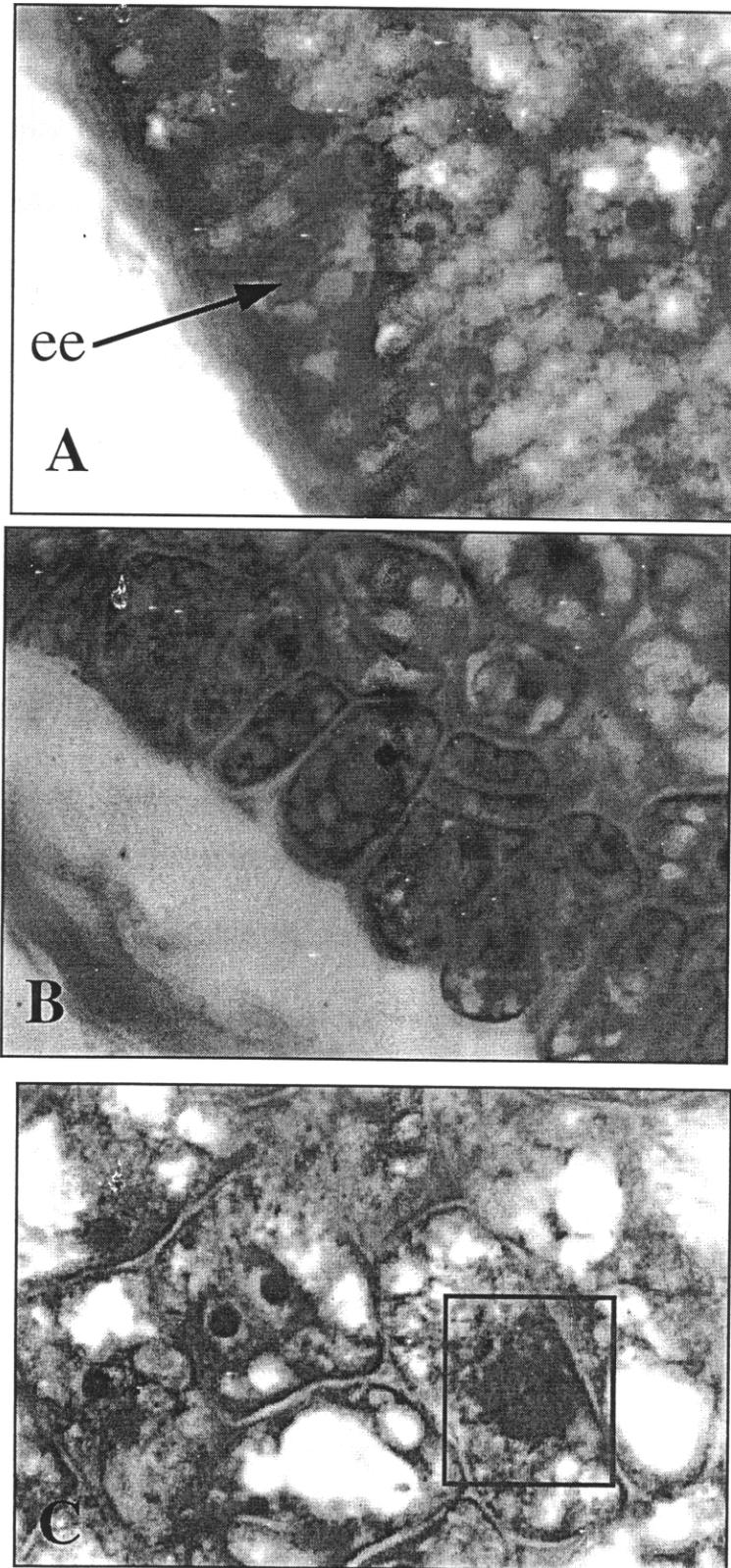


Fig. 7 Tejido escutelar del embrión cigótico maduro de arroz. En A epitelio escutelar (ee) con células columnares. En B diferentes planos de división celular. En C etapas mitóticas durante el crecimiento inicial del callo.

medida que se dirige hacia el interior del callo. Así, las células de las 3-4 hileras más externas son de tamaño más pequeño, con núcleo y nucleolo prominentes los cuales tiñen de rojo, su citoplasma es muy denso y su forma es isodiamétrica. Son notorios los planos de división tanto periclinales como anticlinales y es evidente la presencia de grupos de células, muy parecidas a un centro quiescente, como predeterminadas a ser embriogénicas a juzgar por sus características: tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo y nucleolo conspicuos, compactamente arregladas y con una alta actividad meristemática (fig. 8a).

Las células de las siguientes 4 hileras son más grandes, su núcleo es todavía muy evidente, pero por su tamaño pareciera que la vacuola tiende a ocupar la mayor parte del volumen celular. Inmediatamente se evidencia una capa de células intermedia, con un notable parecido a un parénquima fundamental, con núcleos más pequeños y con abundantes espacios intercelulares.

En algunas zonas se observan filas de células de forma alargada que se disponen desde el interior hacia el exterior del callo; la estructura se parece a la formación inicial de un haz vascular o puede tratarse de zonas de futura delimitación de los embriones los cuales posteriormente se desarrollarán en las capas más externas de los callos y se observan planos de división periclinales muy abundantes.

Existen hileras de células que establecen un límite entre las capas externa e interna del callo. Estas 3 hileras de células están comprimidas lateralmente y es muy evidente por la coloración verde de las paredes primarias. El centro del callo, que es la zona de mayor tamaño, consta de células muy grandes con núcleos de pequeño tamaño. Es notoria la ruptura de la

mayoría de las paredes celulares y existen abundantes espacios intercelulares. En ocasiones pueden observarse pequeños gránulos de almidón.

Al observar los cortes a la altura media del callo, es más evidente la ruptura de las paredes de las células que constituyen la zona central interna del callo, lo cual dará lugar a la posterior formación de un espacio interno en el callo.

Callo de 10 días en medio de callogénesis.

En la zona externa del callo es más notoria la presencia de regiones lobuladas, que antes eran zonas de división mitótica, ahora se observan estructuras globulares, con una protodermis bien definida y es lo que constituyen los proembriones (fig. 8b); también se observa que la zona semejante a un tejido parenquimático es más amplia y las células están dispuestas en forma más homogénea. En la zona inmediata que establece el límite con respecto al centro del callo, las células están en su totalidad comprimidas lateralmente y en muchas áreas las células han entrado a un proceso de lisis que da lugar al rompimiento de las células del centro del callo, lo que marca el inicio de la formación del espacio interno del callo mismo. Las células que limitan con este espacio, muy pronto adquieren características embriogénicas y dan paso a la formación de un callo con más potencial embriogénico. Se puede distinguir algunos tipos de células, en diferentes sectores del callo: (i) pequeñas células con denso citoplasma, un prominente núcleo y con almidón (células meristemáticas); (ii) grandes células vacuoladas, sin gránulos de almidón; (iii) grandes células vacuoladas con gránulos de almidón; (iv) células de regular tamaño, con citoplasma denso y nucleolo prominente. Este tipo de células fue observado también en callos de 15 y 20 días.

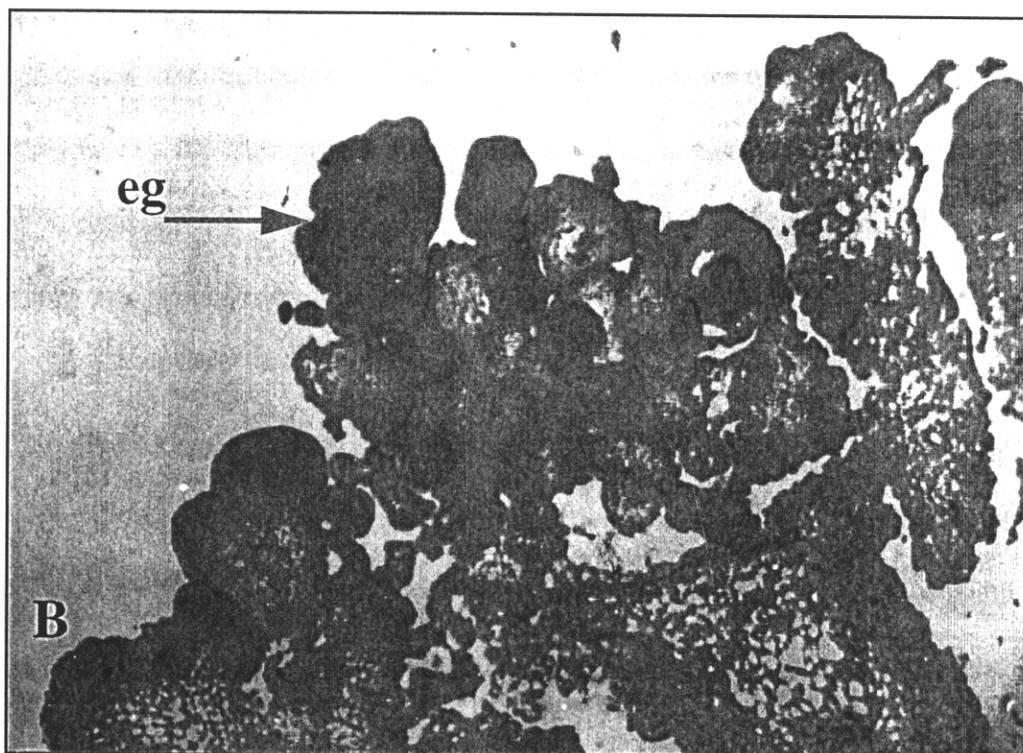
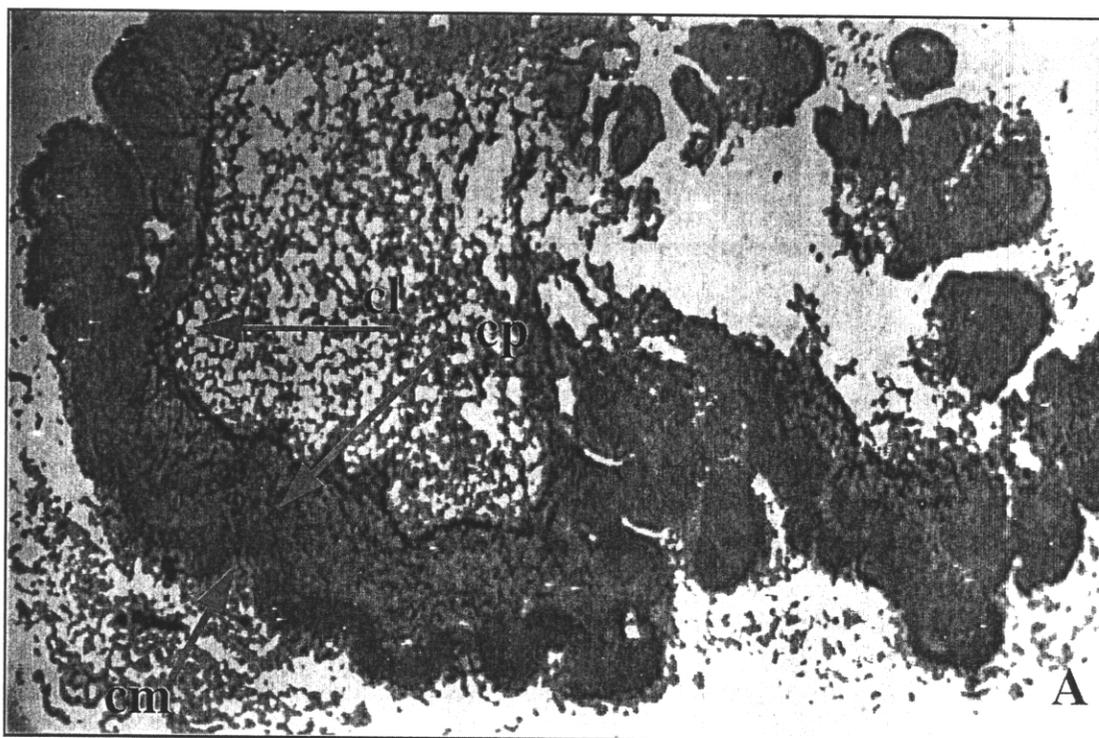


Fig. 8 : Características histológicas de los callos embriogénicos de arroz. En A Callo de 5 días con capa externa con células meristemáticas (cm), capa de células parenquimáticas (cp) y capa de células que limitan (cl) con el espacio interno. En B callo de 10 días con numerosas estructuras globulares (eg) en su capa externa.

Callo de 15 días en medio de callogénesis.

En la zona periférica del callo se observan muchas estructuras globulares proembriogénicas completamente definidas y perfectamente delimitadas por líneas de células que se disponen y se comprimen lateralmente, para el crecimiento del embrión y en algunos embriones el suspensor es ya evidente. También es notorio el estrecho agrupamiento de estructuras embriogénicas, cuyas células del cuerpo globular del embrión se caracterizan por ser de forma isodiamétrica, pequeñas, ricas en citoplasma que se evidencia por la coloración naranja y su núcleo es grande con nucléolo muy conspicuo.

Los embriones globulares presentan una capa de células que rodea el cuerpo del embrión y por su disposición corresponde a células epidérmicas, con núcleos muy grandes. La zona central de cada uno de los embriones se asemeja mucho más a los centros quiescentes presentes en los ápices de brote o de raíz.

Inmediatamente después de la capa germinativa constituida de proembriones y embriones globulares, puede notarse una gradiente en el tamaño de las células, pues éstas se observan un poco más grandes que las células antes mencionadas, pero su tamaño aumenta a medida que se recorre hacia el interior del callo y este tipo variado de células indican distintas etapas de diferenciación. Es importante destacar la presencia de células de tamaño regular con acumulaciones de almidón, lo cual se evidencia por la presencia de gránulos de color morado en su interior y que se encuentran asociados cerca de la base de los proembriones o de grupos de células embriogénicas (fig.9a).

Callo de 20 días en un medio de callogénesis.

Las estructuras embriogénicas son abundantes en la zona periférica del callo y se observa muchos embriones globulares, algunos ya con suspensor (Fig. 9b). También estas estructuras están presentes en el interior del callo, es decir revistiendo las zonas internas del callo que dan con el espacio interno de éste. Se observa la presencia de una zona compuesta de varias capas de células que separa ambas regiones embriogénicas, que por su forma probablemente sean utilizadas como zonas de reserva y de acumulación de productos de la actividad metabólica del callo.

En otras áreas también se observa la presencia de elementos xilemáticos primarios dispuestos longitudinalmente y en dirección del centro hacia el exterior del callo, muy cerca de la base de cada una de las estructuras embriogénicas. La presencia de estas estructuras de transporte sugiere la realización de un sistema más eficiente de transporte ya que las rutas vía pared celular no son suficientes para satisfacer las demandas de transporte de agua y solutos del medio de cultivo.

Callos embriogénicos en medio de regeneración.

Para completar el desarrollo de los embriones somáticos de forma globular, los callos fueron transferidos a un medio de regeneración (Valdez *et al.* 1996). Después de 10 días se puede observar como los embriones globulares cambian a una forma semejante a la de un



Fig. 9: Características histológicas de callos embriogénicos de arroz. **A.** Callo de 15 días con gránulos de almidón almacenados (s). **B.** Callo de 20 días con numerosos embriones somáticos (es).

corazón (Fig.10a), en donde se nota la aparición de dos protuberancias de forma más o menos lobulada, cuyas células poseen denso citoplasma y núcleo muy evidente.

Después de 15 días, se evidencian algunos embriones somáticos con estructuras semejantes a primordios foliares (fig.10b). Histológicamente estos poseen células que se tiñen intensamente y presentan divisiones radiales, que darán origen al procambium, posteriormente estas estructuras forman brotes y luego la raíz, para dar origen a un plántula completa.

Descripción histológica de callos sometidos al proceso de biobalística.

Después de realizado el proceso de biobalística sobre los callos de arroz, seis callos de los bombardeados con partículas de tungsteno recubiertas con ADN, fueron separados para realizar el revelado en X-Gluc (5-bromo-4-cloro-3-indolyl glucoronide, Jeferson 1987) y el resto fue mantenido en el medio de inducción callogénica, hasta completar los 25 días. Después de 24 horas se observó la presencia de puntos de color azul en la superficie de los callos, los cuales fueron numerosos y conspicuos. Esto indica que el plásmido en las micropartículas que contenía el promotor que codifica para la enzima β -glucuronidasa ha penetrado en la célula vegetal. Sin embargo, como el objetivo fue evaluar el impacto de los disparos sobre el tejido callogénico, se hicieron los cortes histológicos de estos callos. Al observarlos con el microscopio de luz se puede observar que la expresión de la enzima ocurre en aquellas zonas periféricas de constante crecimiento y de alta actividad meristemática (Fig.11), lo que indica que los partículas no causan daño aparente al ser disparadas sobre los callos. Similarmente los callos que fueron bombardeados solo con las partículas de tungsteno crecieron igualmente bien que el control, lo que sugiere que la aplicación del método no causa daño sobre el callo.



Fig. 10: Callos embriogénicos en medio de regeneración. **A.** embrión somático en la etapa de corazón. **B.** embrión somático con estructuras semejantes a primordios foliares (pf) y posible procambium (pc).

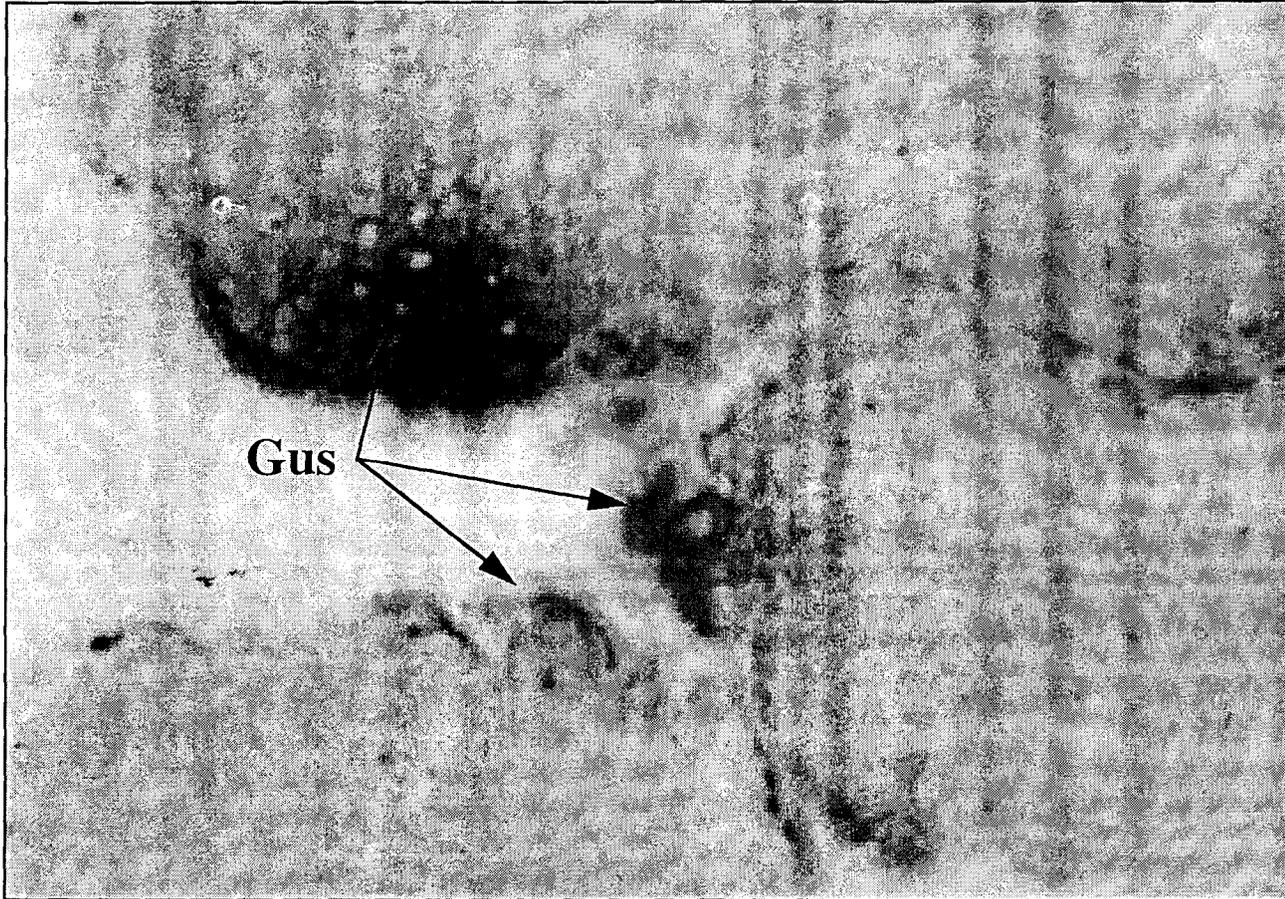


Fig. 11: Expresión de la enzima beta-glucoronidasa en estructuras globulares periféricas en callos embriogénicos de arroz de cinco días.

El resto de callos que fueron mantenidos en el medio de callogénesis siguieron creciendo igual que el cultivo control y no presentaron diferencias significativas en la formación de callos ($F=1.07$, $P=0.36$) al realizar un análisis de varianza de una vía.

El total de plantas resultantes de los experimentos de regeneración muestra que la cantidad total y los porcentajes de regeneración de plantas de los cultivos sometidos al método fueron muy similares al del control (Cuadro 27).

Cuadro 27: Evaluación de la capacidad morfogénica de callos sometidos al método de biobalística para el cultivar de arroz (*Oryza sativa* L. CR-5272, después de diez semanas en medio de regeneración.

Tratamiento	Control	Tugsteno	Tugsteno + ADN
Total de callos	41	39	45
No contamin.	36	39	45
Con brotes	21	22	27
Total de brotes	35	33	37
Brotes por callo	2	1	1
Total plantas	28	25	30
Promedio plantas/callos ♣	1	1	1
% callos morfogénicos ♠	58	56	60

♣ No. plántulas verdes / No. callos con brotes*

♠ No. callos con brotes / No. callos no contaminados x 100.

DISCUSIÓN

El estudio histológico sugiere que los callos embriogénicos se originan del tejido escutelar del embrión cigótico maduro, cuando el explante es colocado en un medio de inducción callogénica. Esto coincide con lo reportado por Kott y Kasha (1983), Ozias-Akins y Vasil (1983) en embriones inmaduros de trigo; Armstrong y Green (1985), Kamo *et al.* (1985) con embriones inmaduros de maíz; Lu y Vasil (1985) con embriones maduros e inmaduros de *Panicum maximum* Jacq.; Hartke y Lorz (1989), Koetje *et al.* (1989); Yin *et al.* (1993), Biswas *et al.* (1994) con embriones inmaduros de arroz; Raghavam Ram y Nabors (1985); Jones & Rost (1989), Chowdhry *et al.* (1993), Rueb *et al.* (1994), Valdez *et al.* (1996) con embriones maduros de arroz.

El uso del término "células predeterminadas a ser embriogénicas" (Haccius 1978, Williams y Maheswaran 1986), implica que hay ciertas células dentro del explante que poseen un particular estado metabólico, que los capacita para desdiferenciarse y responder a una serie de señales fisiológicas, estimuladas por las condiciones del cultivo. Esto explicaría como algunas de las células del escutelo se desdiferencian en presencia del 2,4-D, para permitir la formación del callo (Fig.8b).

Cinco días después de la siembra, es notable la iniciación del callo. Histológicamente puede observarse una zona de actividad meristemática, la cual dará origen a los futuros proembriones y embriones somáticos. Estas características coinciden con lo reportado por Tisserat y DeMason (1980), Paterson *et al.* (1981), Williams y Maheswaran (1986), quienes

además destacan que estas células del callo son de tamaño pequeño, que poseen un citoplasma denso, núcleo conspicuo, las cuales son indicadoras de un estado relativamente bajo de especialización.

A partir de estas observaciones, se podría sugerir que el 2,4-D ejerce una función importante en los procesos de desdiferenciación celular del parénquima escutelar del embrión, que estimula los procesos de división y elongación celular. Estas especulaciones concuerdan con las de Theologist (1986), Alizadeh y Mantell (1991), quienes proponen que la actividad de las auxinas en los órganos y tejidos vegetales en las cuales es sintetizada o aplicada exógenamente, estimula los procesos antes mencionados. Además, Michalczuc *et al.* (1992), destacan que el 2,4-D, también estimula la acumulación de grandes cantidades de ácido indolacético endógeno, el cual parece mantener la proliferación callosa. En forma similar, Mitsuoka *et al.* (1994), resaltan que el 2,4-D es necesario para la formación de callos embriogénicos de arroz.

Maeda y Radi (1991), destacan que las células del epitelio escutelar del arroz, actúan como un tejido de absorción, principalmente de azúcares y de los reguladores de crecimiento vegetales, al aumentar su actividad metabólica. Esto explicaría cómo estas células del explante se desdiferencian con mayor facilidad que el resto de células del escutelo lo que les confiere ventaja sobre el resto de células del parénquima escutelar.

Las células que poseen gránulos de almidón en forma abundante, fueron evidentes en callos de 15 y 18 días, y presentan características similares a las de las células de tejidos vegetales en condiciones naturales; según Constabel *et al.* (1971), su acumulación puede ser importante en el éxito de la embriogénesis y puede ser una característica de las células con

capacidad para desdiferenciarse y formar embriones. En esta investigación, pudo observarse que muchos de los grupos de células asociados a embriones globulares y en la etapa de corazón, son ricos en gránulos de almidón. La acumulación del almidón por estas células, garantiza su posterior utilización a medida que este carbohidrato se agota en el medio de cultivo. Todas las moléculas de glucosa, liberadas del almidón, como producto de la hidrólisis, servirán para proporcionar unidades de carbono que se combinarán con compuestos nitrogenados y de esta manera formarán los aminoácidos, que tendrán diferentes funciones durante el crecimiento del callo. Además, pueden formarse polisacáridos, a partir de las moléculas de glucosa hidrolizadas, que serán importantes en otras funciones del embrión en crecimiento (Esau, 1977), o su metabolismo proveerá la energía necesaria para los procesos de regeneración (Stamp 1987, Williams y Maheswaran 1986).

El estudio histológico demuestra claramente que los embriones somáticos se originan de grupos de células de las capas más externas del callo en crecimiento, lo cual parece ser común en otras especies (Jane-Ho y Vasil 1983, Gleddie *et al.* 1983, Lu y Vasil 1985, Schwendiman *et al.* 1988).

En callos de veinte días se observa una gran cantidad de proembriones y embriones somáticos globulares; sin embargo, cuando los callos son transferidos a medio de regeneración, se observa una tendencia a disminuir la formación de brotes iniciales y por las observaciones histológicas realizadas, el crecimiento de los brotes debería ser mayor. Esta limitante en la proliferación de brotes se debe a que muchos de los embriones somáticos compiten por recursos y probablemente haya un predominio de los embriones más desarrollados, lo cual favorece su crecimiento y limita el desarrollo de los otros. Durante esta fase sería importante implementar

una buena técnica de fragmentación de callos embriogénicos para hacer más efectivo el crecimiento de los embriones somáticos.

Las observaciones histológicas del crecimiento de los callos de arroz en diferentes edades, muestran la existencia de una organización interna del callo. Esta organización consiste en que a medida que los callos crecen, las capas de células meristemáticas externas dan formación a grupos de células embriogénicas y embriones somáticos hacia el exterior. Hacia el interior del callo, se forman células parenquimáticas, las cuales van aumentando de tamaño, su núcleo se tiñe menos visiblemente y muchas de éstas son muy vacuoladas. En otras es probable la acumulación de otros productos del metabolismo del callo como fenoles y materiales ergásticos (Esau 1977, Schwendiman *et al.* 1988). Muchas de éstas células se rompen posteriormente para dar lugar al crecimiento del espacio interno del callo. De esta forma el callo crece en superficie y mantiene un aumento gradual de dicho espacio para el intercambio de gases de estas zonas, lo que favorece el proceso de la respiración celular.

Una vez que el callo es transferido al medio de regeneración, los embriones somáticos adquieren forma de corazón, continúan su desarrollo, hasta adquirir una organización bipolar, la cual se caracteriza por la aparición de una zona longitudinal en el embrión somático, con células de citoplasma denso, poco alargadas. Schiavone y Cooke (1985), se refieren a éstas como zonas procambiales iniciales, cuyas células se tiñen intensamente por un aumento en la actividad meristemática y tienen funciones importantes para el establecimiento de la polaridad del embrión en crecimiento.

Callos embriogénicos sometidos al método de biobalística

Los callos de cinco días sometidos al método de biobalística, crecieron igualmente bien que el cultivo control, por lo que es probable que dicho sistema no cause daño sobre la superficie del callo al momento de su aplicación. Christou (1992), Finer *et al.* (1992), señalan que la optimización del sistema de transformación por microproyectiles, no causa daño en las paredes y membranas de las células que se desea transformar, pero es importante considerar el tipo de tejido tratado, pues de lo contrario se puede causar daño ya sea por el gas helio, por la solución que lleva las partículas o por los microproyectiles mismos. Klein *et al.* (1990) agregan que la utilización del método de transformación con microproyectiles, permite la deposición directa de ADN dentro de las células, sin afectarlas y que los genes pueden ser introducidos dentro de un amplio rango de tejidos inclusive suspensiones celulares, callos o de tejidos aislados directamente de la planta. Li *et al.* (1993), utilizaron el mismo método y tuvieron éxito al tratar embriones inmaduros y callos embriogénicos de subespecies de arroz *japonica* e *indica*.

De manera general, este estudio histológico muestra que los callos embriogénicos tienen un origen unicelular, a partir de las células del epitelio escutelar. Los embriones somáticos se originan de grupos de células con núcleo prominente, de tamaño pequeño, citoplasma denso y con células adyacentes con abundantes gránulos de almidón en su interior. Estos embriones son entidades independientes, cuya polaridad es evidente a partir de su etapa globular. La presencia de este tipo de células en estos callos, asegura la proliferación de brotes y el éxito en la regeneración final de plantas de arroz.

Por otra parte, la aplicación de las técnicas histológicas sobre callos sometidos al método de Biobalística, sugiere que dicho método no causa daño sobre las células de los callos embriogénicos de arroz y hace más validera su aplicación en los procesos de transformación genética del arroz.

CONCLUSIONES

- 1- Las principales características que presentan las células embriogénicas son: núcleo grande con prominente nucleolo, contenido citoplasmico denso, de tamaño pequeño y con gránulos de almidón. Estas características sugieren una alta tasa metabólica.
- 2- Los callos embriogénicos de arroz muestran una alta organización en su estructura. Esto es comprobado al encontrar diversos tipos de células, lo que sugiere que éstas realizan funciones diferentes.
- 3- Las principales fases de crecimiento de un embrión somático de arroz son: fase de proembrión, fase globular, etapa de corazón hasta la formación de la planta completa.
- 4- Los embriones somáticos de arroz son estructuras independientes, que al final no presentan conexión con el resto de tejido del callo que le dió origen.
- 5- El método de transformación genética por Biobalística no causa daño en los callos de arroz, ya que el crecimiento de éstos fue similar al cultivo control. Además, se observó histológicamente que los callos sometidos a dicho método de transformación, expresan el gen marcador (Gus), en las zonas embriogénicas más externas de los callos de arroz.

DISCUSIÓN GENERAL

Esta investigación muestra que es posible la inducción de callos embriogénicos, a partir de embriones cigóticos maduros. Estos explantes responden efectivamente en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 2.5 mg/L de 2,4-D. A pesar de que las líneas *indica* han sido consideradas como recalcitrantes en condiciones *in vitro*, se incrementó la regeneración en términos de número de plantas formadas. Esto fue posible por la aplicación de aditivos al medio de inducción callogénica, como lo son 9 mM de L-prolina con 1.5 mg/L de 2,4-D y 90 μ M de L-triptofano en combinación con 1.5 mg/L de 2,4-D. Armstrong y Green (1985), Chowdhry *et al.* (1993) reportan resultados similares y hacen notar que ambos aminoácidos promueven tanto la frecuencia de callogénesis como de la regeneración de plantas. También se estudió el efecto de ambos aminoácidos en el medio de callogénesis y se demostró que al combinar bajas concentraciones de ambos, aumentan la regeneración de plantas de arroz.

Tran Than Van (1981), Raghava Ram y Nabors (1985), Adkins *et al.* (1990), Adkins (1992), Tsukuhara e Hirose (1992) y Rancé *et al.* (1994), destacan que para que las células competentes puedan expresar su potencial embriogénico, deben de establecerse las condiciones adecuadas. En este sentido, se pueden sugerir las siguientes condiciones, para el cultivo *in vitro* del arroz: i) tratamiento con temperatura de 10 °C al explante por 10 días, antes de la siembra. ii) Tratamiento de deshidratación de los callos por 24 horas, antes de ser transferidos a un medio de regeneración, acompañado de un adecuado fraccionamiento. Este incrementa notablemente la regeneración en términos del número total de plantas. iii) La colocación del callo en frascos

adecuados, ya que disminuye la acumulación de compuestos que afectan el crecimiento y desarrollo de los embriones somáticos.

El análisis histológico de los callos embriogénicos obtenidos, después de utilizar todas las condiciones mencionadas anteriormente, revela las características que identifican a las células embriogénicas y que las distinguen del resto de células del callo. Entre las más importantes están: su tamaño pequeño, citoplasma denso, núcleo grande con nucleolo evidente, forma isodiamétrica y presentan células adyacentes con abundantes gránulos de almidón. Estas características indican que dichas células poseen una alta actividad metabólica, lo que explica de forma general, la formación de muchos embriones somáticos en los callos de arroz obtenidos en esta investigación.

La aplicación del método de biobalística, no causa daño aparente en los callos embriogénicos tratados con éste. Los callos crecieron similarmente a los no sometidos al método de transformación. Las observaciones histológicas revelaron que los micropartículas utilizadas, penetraron en las zonas globulares embriogénicas de los callos. Con esto se confirma la validez del método de transformación por biobalística en callos derivados de embriones cigóticos mauros.

Los resultados obtenidos en esta investigación, indican que algunos de los tratamientos utilizados, promueven los procesos de callogénesis e incrementan la regeneración de plantas de arroz, de manera que proveen una alternativa metodológica en los experimentos de transformación genética del arroz (*Oryza sativa* L. cv CR-5272).

REFERENCIAS CITADAS

- Ammirato, P.V. 1983. Handbook of the plant cell culture. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y. (eds) MacMillan Publishing Co., New York, P.82.
- Akins, P.O. y Vasil, I.K. 1983. Proliferation and plant regeneration from the epiblast of *Triticum aestivum* (Wheat; Gramineae) Embryos. Amer. J. Bot. 70(7): 1092-1097.
- Adkins, S.W. 1992. Cereal callus Cultures: Control of Headspace Gases can Optimise the Conditions for Callus Proliferation. Aust. J. Bot.40:737-749.
- Adkins, S.W., Shiraishi, T. y McComb, J.A. 1990. Rice Callus Physiology Identification of Volatile Emissions and Their Effects on Culture Growth. Physiologia Plantarum. 78: 526-531.
- Alizadeh, S. y Mantell, S.H. 1991. Early Cellular Events During Direct Somatic Embryogenesis in Cotyledon Explants of *Solanum aviculare* Forst. Annals of Botany. 67, 257-263.
- Allavena, A. 1984. Beans. p. 137-168. In: Handbook of the Plant Cell Culture. Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y. (eds) MacMillan Publishing Co., New York.

- Armstrong, C.L. y Green, C.E. 1985. Establishment and Maintenance of Friable, Embryogenic maize Callus and the Involvement of the L-proline. *Plant* 164: 207-214.
- Bandursky, R.S. y Nonhebel, H.M. 1984. Auxins. P.1-16. *In: Advanced Plant Physiology*. Malcom B. Wilkins eds. London.
- Bidwell, R.G.S. 1979. *Fisiología Vegetal*. A.G.T. editors, S.A. 762 p.
- Biswas, G.C., Burkhardt, P.K., Wunn, J., Kloti, A. y Potrykus, Y. 1994. Fertile *indica* rice Plant Regenerated from Protoplast Isolated from Scutellar Tissue of Immature Embryos. *Plant Cell Reports*. 13: 528-532.
- Boissot, N. 1990. Etablissement de cultures de tissus morphogènes et études histologiques de la callogenèse et de la néoformation chez *Oryza sativa* L. et *Oryza longistaminata* Chev. and Roehr. Tesis Doctorado. Universidad de París Sur. Francia. 123 p.
- Botti, C. y Vasil, I.K. 1984. Ontogeny of Somatic Embryos of *Pennisetum americanum* II. In Cultured Immature Inflorescences. *Can. J. Bot.* 62: 1629-1635.
- Calderón, A., Roca, W.M. y Wayne, J. 1991. Ingeniería genética y Cultivo de tejidos. *In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia. cap. 33. pp 733-753.

- Chen, L., Lam, L. y Chen, S. 1985.** Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Cultured Young Inflorescences of *Oryza sativa* L. (rice). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4: 51-54.
- Christou, P. 1992.** Genetic Transformation of crop plants using microprojectile bombardment. *Plant Journal*. 2(3): 275-281.
- Chowdhry, C.N., Tyagi, A.K., Maheswari, N. y Maheswari, S.C. 1993.** Effects of L-proline and L-tryptophan on Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 357-361.
- Chu, C.C., Sun, Wang, C.C., Sun, C.S., Hus, C., Yin, K.C. Y Chu, C.Y. 1975.** Establishment of an Efficient Medium for Anther Culture of rice through Comparative Experiments on the nitrogen Sources. *Sci. Sinica*. 18: 659-668.
- Colegio de Ingenieros Agrónomos 1993.** Sesiones de Actualización y Perspectivas. "La Agricultura de hoy, para la Costa Rica del mañana". Del 18 al 22 Octubre 1993. San José, Costa Rica. 28 p.
- CONITTA, 1991.** Comisión Nacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria. San José, Costa Rica.
- Constabel, F., Miller, R.A. y Gamborg, O.L. 1976.** Histological Studies on Embryos Produced from Cell Cultures of *Bromus inermis*. *Can. J. Bot.* 49:1415-1417.

- Cornejo, M.J., Wong, V.L. y Blechl, A.E. 1995. Cryopreserved Callus: a Source of Protoplast for rice Transformation. *Plant Cell Report* 14:210-214.
- Dallos, M.P., y Alvarez, W. 1988. Técnicas *in vitro*. Universidad Nacional, Costa Rica, CONICIT. 105 p.
- Dubits, K.N., Constabel, F. y Gamborg, O.L. 1976. Embryogenesis and Formation of Tetraploid and Hexaploid Plants from Carrot Protoplast. *Can. J. Bot.* Vol. 54: 1063-1067.
- Esau, K. 1977. Anatomy of seed plants. John Wiley and Sons (eds). New York. 533 p.
- Finer, J.J., Vain, P., Jones, M.W. y McMullen, M.D. 1992. Development of the Particle Inflow Gun for DNA Delivery to Plant Cell. *Plant Cell Report*. 11: 323-328.
- Gautheret, R.J. 1985. History of Plant Tissue and Cell Culture: A personal Account. *In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Edited by Indra K. Vasil. Academic Press, Inc. Vol. 2. Cap.1. pp 27-37.
- George, L. y Eapen, S. 1988. Plant regeneration by Somatic Embryogenesis from Immature Inflorescence Cultures of *Sorghum almum*. *Annals of Botany*. 61: 589-591.

- Gleddie, S., Keller, W. y Setterfield, G. 1983. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Explant and Cell Suspension of *Solanum melogena* (eggplant). Can. J. Botany. 61: 656-666.
- Grass, L. y Burris, J.S. 1995. Effects of Heat During Seed Development and Maturation on wheat (*Triticum durum*) seed Quality Seed Germination and Seeling Vigor. Canadian Journal of Plant Science. 75:821-829.
- Haccius, B. 1977. Question of Unicellular Origin of non-zygotic Embryos in Callus Cultures. Phytomorphology. 28: 74-81.
- Hale, M.G. y Orcutt, D.M. 1987. The Physiology of Plant Under Stress. A Wiley-Interscience Publication. John Wilwy & Sons. New York. 206 p.
- Hammatt, N., Ghose, T.K., Davey, M.R. 1986. Regeneration in Legumes. P 67-95. In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol.3. Edited dy Indra k. Vasil. Academic Press. Florida.
- Hartke, S. y Lorz, H. 1989. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Various *indica* rice (*Oryza sativa* L.) Genotypes. J.Genet. & Breed. 43: 205-214.
- Henke, R.R., Mansur, M.A. y Constantin, M.J. 1978. Organogenesis and Plant Formation from Organ-and seedling-derived Calli of rice (*Oryza sativa*). Physiol. Plant. 44: 11-14.

- Higuchi, N. y Maeda, E. 1991. Effect of Pre-treatment with Excess Sucrose or Manitol on Plant Regeneration from rice Callus Cultures. *Japan Jour. Crop. Sci.* 60 (1): 122-129.
- Jane-Ho, W. y Vasil, I.K. 1983. Somatic Embryogenesis in Sugarcane (*Saccharum officinarum* L.): Growth and Plant Regeneration from Embryogenic Cell Suspension Cultures. *Ann. Bot.* 51: 719-726.
- Jeferson, R.A. 1987. Assaying Chimeric Genes in Plants: The GUS GenesFusion System. *Plant Molecular Biology Reporter*. Vol. 5 (4): 387-405.
- Jones, T.J. y Rost, T.L. 1989. The Developmental Anatomy and Ultrastructural of Somatic Embryos from rice (*Oryza sativa* L.) Scutellum Ephetelial Cells. *Bot. Gaz.* 150(1): 41-49.
- Jou, C.K. y Montoya, I.C. 1990. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos. Instituto Nacional de Aprendizaje. Sección de Fitotecnia. San José, Costa Rica. 86 p.
- Kamo, K.K., Becwar, M.R. y Hodges, T.K. 1985. Regeneration of *Zea mays* L. from Embryogenic Callus. *Bot. Gaz.* 146 (3): 327-334.
- Klein, T.M., Knowlton, S. y Arentzen, R. 1991. Gene Transfer by Particle Bombardment. *Plant Tissue Culture Manual D1*: 1- 12.

Koetje, D.S., Grimes, H.D., Wang, Y. and Hodges, T.K. 1989. Regeneration of Indica Rice (*Oryza sativa* L.) from Primary Callus }Derived from Immatures Embryos. J.Plant Physiol. 35: 184-190.

Kott, L.S. y Kasha, K.J. 1984. Initiation and Morphological Development of Somatic Embryoids from barley Cell Cultures. Can. J. Bot. 62: 1245-1249.

Krikorian, A.D. 1991 Medios de Cultivo: generalidades, composición y preparación.*In:* Cultivo de Tejidos en la Agricultura. CIAT. Cali, Colombia, capitulo 3. pp 44-45.

Lee, L., Schroll, R.E., Grimes, H.D. y Hodges, T.K. 1989. Plant Regeneration from indica rice (*Oryza sativa* L.) Protoplast. Planta. 178: 325-333.

Leonardi, A., Disktra, S. y Wang, M. 1995. Differential Involvement of Absciscic in Dehydration and Osmotic stress in rice Cell Suspension. Physiologia Plantarum 93: 31-37.

Leopold, A.C. and Kriedemann. 1975. Plant Growth and Development. McGraw-Hill, New York.

Li, L.Q., Kochko, A., Fauquet, C. y Benchy, R. 1993. And Improvement rice Transformation System Using the Biolistic Method. Plant Cell Reports. 12: 250-255.

- Lindsey, K. y Jones, M.G.K. 1989. *Biotecnología Vegetal Agrícola*. Editorial Acribia, Zaragoza, España. 265 p.
- Ling, D.H., Chen, W.Y. y Ma, Z.R. 1983. Direct Development of Plantlets from Immature Panicles of Rice *in vitro*. *Plant Cell Reports*. 2:172-174.
- Linsmaier, E.M. y Skoog, F. 1965. Organic Growth Factor Requirements of Tabaco Tissue Culture. *Physiol. Plant*. 18: 100-127.
- Litz, R.E. y Jarret, R.L. 1991. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis y organogénesis. *In: Cultivo de Tejidos en La Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia. Cap.7, pp 143- 172.
- Lu, C. y Vasil, I.K. 1985. *Histology of Somatic Embryogenesis in Panicum maximum* (guinea Grass). 72 (12): 1908-1913.
- Maeda, E. 1995. Physiological Functions of Growth Regulating Substances. *In: Science of the Rice Plant*. Vol. 2. (Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., Ishihara, K & Hirata, H. eds.). p 179- 182.
- Maeda, E. y Radi, S.H. 1991. Ultrastructural Aspects of Rice Scutellum as Related to Seminal Root Cultures. *Biotechnology in Agriculture and Forestry (Rice)*. 14: 78-91.

- Magnusson, I., y Bornman, C.H. 1985.** Anatomical Observation on Somatic Embryogenesis from Scutellar Tissues of Immature Zygotic Embryos of *Triticum aestivum*. *Physiol. Plant.* 63:137-145.
- McCain, J.W. y Hodges, T.K. 1986.** Anatomy of Somatic Embryos from maize Embryos Cultures. *Bot. Gaz.* 147(4): 453-460.
- Milborrow, B.V. 1984.** Inhibitor. p. 76-105. *In: Advanced Plant Physiology.* Malcom B. Wilkins (eds). London.
- Michalczuk, L., Ribnicky, D.M., Cooke, T.J. and Cohen, J. 1992.** Regulation of Indole-3-acetic Acid Biosynthetic Pathways in Carrot Cell Cultures. *Plant Physiology* 100: 1346-1353.
- Mitsuoka, K, Honda, H, Xing, X.H. y 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.
- Mize, C.W. y Chun, Y.W. 1988.** Analysing Treatment Means in Plant Tissue Culture Research. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 13:201-217.
- Mott, R.L. y Cure, W.W. 1978.** Anatomy of Maize Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 42:139-145.

- Mroginski, L.A. y Roca, W.M. 1991.** Establecimiento de Cultivos de Tejidos Vegetales *in vitro*. *In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia. Cap. 2 pp 19-40.
- Murashige, T. Y Skoog, F. 1962.** A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nowacki, J. y Bandurski, R.S. 1980.** Myoinositol Ester of indole-3-Acetic Acid as Seed Auxins Precursors of *Zea mays* L. *Plant Physiology* 65: 422-427.
- Ozias-akins, P. y Vasil, I.K. 1985.** Nutrition of Plant Tissue Cultures. *In: Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*. Edited by Indra K. Vasil. Academic Press, Inc. Vol. 2. Cap.4. pp 129-142.
- Parson, D., Berlijn, J, Kichner, F. y Figueroa, F. 1984.** Arroz. Manuales de educación Agropecuaria. De. Trillas, No. 11.
- Paterson, K.E. y Rost, T.L. 1981.** Callus Formation and Organogenesis From Cultured Leaf Segments of *Crassula argentea*. Cytokinin- induced Developmental Pattern Changes. *Am. J. Bot.* 68 (7): 965-972.
- Poonsapaya, P., Nabors, M.W., Wright, K. y Vajrabhaya, M. 1989.** A Comparison of Methods for Callus Culture and Plant Regeneration of RD25 rice (*Oryza sativa* L.) in Two Laboratories. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 16: 175-186.

- Raghavan Ram, N. V. y Nabors, M. W. 1985. Plant Regeneration from Tissue of Pokkali rice Promoted by Optimizing Callus to Medium Volume Ratio and by a Medium Conditioning Factor Produced by Embryogenic Callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 4: 241-248.
- Roca, W. M. y Mroginski, L. A. 1991. Establecimiento de un Laboratorio para el Cultivo de Tejidos Vegetales. *In: Cultivo de Tejidos en la Agricultura*. CIAT. Cali, Colombia. cap. 1 pp 1-18.
- Rueb, S., Leneman, M., Schilperoot, R. A. y Hengsgens, A. M. 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. B. and Ross, C. W. 1992. *Plant Physiology*. Cuarta edición. Wadsworth Publishing Company. Belmont, California. 620 p.
- Schiavone, F. M. Y Cooke, T. J. 1985. A Geometric Analysis of Somatic Embryos Formation in Carrot Cell Cultures. *Can. J. Bot.* 63:1573-1578.
- Schwendiman, J., Pannetier, C. y Michaux-Ferriere, N. 1988. Histology of Somatic Embryogenesis from Leaf explants of the Oil Palm *Elaeis guineensis*. *Annals of Botany* 62, 43-52.

- Siriwardana, S. and Nabors, M.W. 1983.** Tryptophan Enhancement of Somatic Embryogenesis in Rice. *Plant Physiol.* 73: 142-146.
- Stamp, J.A. 1987.** Somatic Embryogenesis in Cassava: The Anatomy and Morphology of the Regeneration Process. *Annals of Botany.* 59: 451-459.
- Takahashi, N. 1995.** Physiology of Dormancy. *In: Science of the Rice Plant.* Vol 2. (Matsuo, T., Kumazawa, K., Ishii, R., Ishihara, K. & Hirata, H. eds.) p 45-46.
- Theologist, A. 1986.** Rapid Gene Regulation by Auxin. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 37: 407-438.
- Tisserat, B. 1987.** Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. *In: Plant Cell Culture.* Dixon, R. A. (ed.). A Practical Approach series. Cap.5. pp 79-95.
- Tisserat, B. y DeMason, D.A. 1980.** A Histological Study of Development of Adventive embryos in Organ Culture of *Phoenix dactylifera* L. *Annals of Botany.* 46: 465-472.
- Tran Thanh Van, K.M. 1981.** Control of Morphogenesis *in vitro* Cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 291-311.
- Tsukuhara, M. & Hirose, T. 1992.** Simple Dehydration Treatment Promotes Regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) Callus. *Plant Cell Report* 11: 550-553.

- Valdez M., Muñóz, M., Vega, J.R. and Espinoza, A.M. 1995.** Plant Regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.) Cultivars from Mature Embryos-derived Calli. *Rev. Biología Tropical* (In press).
- Vasil, I. K. y Vasil, V. 1991.** Embryogenic Callus, Cell Suspension and Protoplast Culture of Cereal. *Plant Tissue Culture Manual*. B1:1-16.
- Vasil, V. y Vasil, I.K. 1994.** *In vitro* Culture Cereals and Grasses. *In: Plant cell and Tissue Culture*. Klumer Academic Publisher London. P. 293-312.
- Vasil, V., Vasil, I.K. y Yi lu, C. 1984.** Somatic Embryogenesis in long-term callus cultures of *Zea mays* L. (Gramineae). *Amer. J. Bot.* 71(1): 158-161.
- Voesenek, L.A.C.J. y Van Der Veen, R. 1994.** The Role of Phytohormones in Plant Strees: Too Much or Little Water. *Acta Bot. Neerl.*43(2): 91-127.
- Wallin, A. y Erickson, T. 1973.** Protoplast Cultures from Cell Suspension of *Daucus carota*. *Physiol. Plant.* 28: 33-39.
- Williams, E.G., y Maheswaran, G. 1986.** Somatic Embriogenesis: Factors Influencing Coordinated Behavior of Cells as an Embryogenic Groups. *Annal of Botany.* 57: 446-462.

- Yamada, Y y W.H. Loh. 1984. Rice. In: Handbook of plant cell culture. Vol.3. (P.V.Ammirato, D.A. Evans, W.R.Sharp, Y.Yamada, eds). pp 151-170. MacMillam Publishing Company, New York.
- Yatazawa, M., Furuhashi, K. y Shimizu, M. 1967. Growth of Callus Tissue from rice- Root *in vitro*. Plant and Cell Physiol. 8, 363-373.
- Yi lu, C. y Vasil, I.K. 1982. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration in Tissue Cultures of *Panicum maximum Jacq.* Amer. J. Bot. 69(1): 77-81.
- Yin Yanhai, Li, S., Chen, Y., Guo, H, Tian, W., Chen, Y. and Li, L. 1993. Fertile Plants Regenerated from Suspension Culture-derived Protoplast of an indica type rice (*Oryza sativa* L.). Plant Cell, Tissue and Organ Culture. 32: 61-68.
- Zhang, C. y Qifeng, C. 1993. Genetic Studies of rice (*Oryza sativa* L.) Anther Culture Response. Plant cell, Tissue and Organ Culture. 34: 177-182.
- Zimmerman, J.L. 1993. Somatic Embryogenesis: A model for Early Development in Higher Plants. The Plant Cell, Vol. 5: 1411-1423.
- Zymny, J. y Lörz, H. 1986. Plant Regeneration and Initiation of Cell Suspensions from root-tip Derived Callus of *Oryza sativa* L.(rice). Plant Cell Reports. 5: 89-92.