

870106

624

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE GUADALAJARA

INCORPORADA A LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA DE BIOLOGIA



<p>TESIS CON FALLA DE ORIGEN</p>

REGENERACION DE PLANTAS DE ARROZ
 (Oryza sativa L.) A PARTIR DE EXPLANTES
 DEL BROTE APICAL

TESIS PROFESIONAL
 QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G O
 P R E S E N T A
ARACELI OROPEZA ABURTO
 GUADALAJARA, JAL., 1989



UNAM – Dirección General de Bibliotecas Tesis Digitales Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis está protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	Pág.
Resumen - - - - -	1
Introducción: - - - - -	3
a) Cultivo de tejidos vegetales <u>in vitro</u> - - - - -	4
b) Organogénesis - - - - -	6
c) Embriogénesis somática - - - - -	7
d) Transferencia de genes a plantas - - - - -	8
Objetivos - - - - -	11
Antecedentes:	
a) Taxonomía - - - - -	12
b) Generalidades de una planta de arroz - - - - -	12
c) Medio de cultivo para células vegetales	
1. Sales inorgánicas - - - - -	16
2. Compuestos orgánicos - - - - -	16
3. Agentes gelificantes - - - - -	18
4. pH - - - - -	18
5. Hormonas y reguladores de crecimiento - - - - -	18
vegetal	
d) Cultivo de tejidos de gramíneas - - - - -	21
Materiales y Métodos	
a) Material biológico - - - - -	30
b) Fuente de explante - - - - -	30
c) Desinfección y germinación de las semillas - - - - -	31
d) Disociación del explante - - - - -	33
e) Medios de cultivo para la inducción de callos - - - - -	33

f) Inducción de callos - - - - -	34
g) Obtención de peso fresco y seco de callos - - -	35
h) Regeneración de plantas - - - - -	36
i) Establecimiento de plantas en suelo - - - - -	37
j) Histología de callos embriogénicos y no embriogénicos - - - - -	37
Resultados	
a) Inducción de callos embriogénicos y no embriogénicos - - - - -	40
b) Histología de callos embriogénicos y no embriogénicos - - - - -	47
c) Regeneración de plantas - - - - -	48
Discusión - - - - -	64
Conclusiones - - - - -	68
Literatura revisada - - - - -	69

INDICE DE GRAFICAS

Pág.

GRAFICA 1. EFECTO DE AUXINAS SINTETICAS Y DE BAP EN LA INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS A PARTIR DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	42
GRAFICA 2. PESO FRESCO DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	45
GRAFICA 3. PESO SECO DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	46
GRAFICA 4. REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	52

INDICE DE TABLAS

Pag.

TABLA 1. MEDIO BASICO DE MURASHIGE Y SKOOG - - - - -	32
TABLA 2. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE CALLO EMBRIOGENICO PROVENIENTE DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	43
TABLA 3. SEPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DE TUKEY PARA LA VARIABLE CALLO EMBRIOGENICO PROVENIENTE DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	44
TABLA 4. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE REGENERACION A PARTIR DE CALLOS PROVENIENTES DE EXPLANTES ETIOLADOS DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	53
TABLA 5. SEPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DE DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA AL 5 % PARA LA VARIABLE REGENERACION A PARTIR DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES ETIOLADOS DEL BROTE APICAL DE ARROZ (<u>Oryza sativa</u> L.) var. MORELOS A-83 - - - - -	54

TABLA 6. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE
REGENERACION A PARTIR DE CALLOS PROVENIENTES DE
EXPLANTES VERDES DEL BROTE APICAL DE ARROZ
(Oryza sativa L.) var. MORELOS A-83 - - - - - 55

TABLA 7. SEPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DE
DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA AL 5 % PARA LA
VARIABLE REGENERACION A PARTIR DE CALLOS
PROVENIENTES DE EXPLANTES VERDES DEL BROTE APICAL
DE ARROZ (Oryza sativa L.) var. MORELOS A-83 - - - - - 56

TABLA 8. PLANTAS REGENERADAS DE ARROZ (Oryza sativa
L.) var. MORELOS A-83, VIA ORGANOGENESIS Y VIA
EMBRIOGENESIS SOMATICA - - - - - 57

INDICE DE FIGURAS

	Pag.
FIGURA A - - - - -	59
FIGURA B - - - - -	61
FIGURA C - - - - -	63

RESUMEN

En el presente trabajo se obtuvo la regeneración de plantas de arroz *Oryza sativa* L. var. Morelos A-83, a partir de callos embriogénicos inducidos de explantes longitudinales del brote apical de plantulas de dos días crecidas en condiciones de luz y de oscuridad.

Para la inducción de callos se usaron el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T), ácido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba), ácido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) solos y en combinación con benzilaminopurina (BAP) en el medio básico de Murashige-Skoog.

Los explantes se incubaron en la oscuridad durante 4 semanas y se hicieron observaciones en un estereomicroscopio para distinguir las diferentes respuestas morfológicas. Se obtuvieron dos tipos de callos, los denominados callos embriogénicos, de apariencia nodular, compacta y de color amarillo o amarillo pálido, y los callos no embriogénicos de consistencia friable y color blanquecino.

El análisis estadístico identificó como mejor medio para la variable inducción de callo de apariencia embriogénica al 2,4-D con el tipo de explante oticlado. En este medio se obtuvo un promedio de porcentaje de callo embriogénico de 87.3875 %.

Posteriormente se seleccionaron estructuras de apariencia embrionica y se subcultivaron en un medio con baja concentracion de 2,4-D, mas cinetina, mas hidrolizado de caseina para promover la regeneracion de plantas.

Mediante un analisis estadistico se determino que el mejor medio para inducir callos que presentan el mayor porcentaje de regeneracion de plantas fue el de Dicamba/BAP, tanto para los callos provenientes de explantes verdes como etiolados, a pesar de no ser el medio mas efectivo para inducir la formacion de callos con apariencia embrionica. El porcentaje de regeneracion de plantas para callos inducidos de explantes etiolados fue de 45.85 % y para callos inducidos de explante verde de 56.33 %.

Se observo la regeneracion de plantas via embriogenesis somatica y via organogenesis brotes raices, las cuales fueron establecidas en suelo satisfactoriamente.

INTRODUCCION

Dentro de las monocotiledóneas, la familia Poaceae (Cereales y pastos) es la de mayor importancia debido a su uso en la alimentación humana y animal. Formando parte de esta familia el arroz, el maíz y el trigo son los cereales más importantes. El arroz es el componente principal de la dieta básica de 1600 millones de personas y es un complemento alimenticio del resto de la población mundial (34). Debido a su gran valor económico y social se han venido desarrollando técnicas y metodologías que permitan el mejoramiento de estas especies, destacando entre ellas, los programas de fitomejoramiento tradicional en diferentes países en los que se han obtenido resultados positivos. Mas recientemente, la posibilidad de la modificación genética de células vegetales por medio de la ingeniería genética y el cultivo de tejidos ha abierto un gran potencial aplicable a los programas de mejoramiento de las gramíneas.

El cultivo in vitro de células o tejidos vegetales se basa en el concepto de totipotencialidad celular, es decir que las células de ciertos organismos (por ejemplo plantas) tienen la capacidad de dividirse y diferenciarse en un organismo multicelular completo igual al que les dió origen, si se les proporciona un medio de cultivo y las condiciones adecuadas.

AD CULTIVO DE TEJIDOS VEGETALES in vitro

El término cultivo de tejidos se aplica al cultivo de células, tejidos y órganos en condiciones asepticas y controladas (35).

Los medios nutritivos que se utilizan para cultivar células vegetales están constituidos por sales minerales, vitaminas, fuentes de carbono y reguladores de crecimiento tales como auxinas y citocininas.

La mayoría de las técnicas de cultivo de tejidos han sido establecidas para plantas de la Clase Dicotiledonae, a partir de los estudios de morfogénesis realizados por Murashige y Skoog en 1962 con Tabaco (*Nicotiana tabacum* L. var Wisconsin 389). En dicho estudio quedaron señaladas las diferentes respuestas morfogenéticas obtenidas por la interacción de auxinas y citocininas con explantes de tabaco. Ellos encontraron que al tener una concentración equimolar de auxinas y citocininas se promueve una rápida división celular que conlleva a la formación de tejido indiferenciado (callo), mientras que una mayor concentración de citocininas que de auxinas induce la formación de brotes y la situación inversa, la formación de raíces en explantes de médula de tabaco (24).

Tomando como base estos experimentos y mediante el uso de diferentes concentraciones y combinaciones de reguladores de crecimiento para promover eventos morfogenéticos, ha sido

posible regenerar in vitro plantas pertenecientes a distintas familias de dicotiledóneas y con mayores limitaciones de monocotiledóneas.

Dentro de Dicotiledonae, la familia Solanaceae (papa, tabaco, tomate) se ha considerado como un sistema modelo de regeneración, debido a la facilidad con que especies de dicha familia regeneran plantas completas a partir de diversos tipos de explantes. Entre otras familias que también han sido regeneradas in vitro se encuentran la Cruciferae (brócoli, coliflor), la Leguminosae (soya, alfalfa, chícharo), la Convolvulaceae (camote), la Rosaceae (manzano, almendro), la Begoniaceae (begonia), la Euphorbiaceae (nochebuena), y la Compositae (crisantemo).

Para Monocotiledonae la regeneración se ha llevado a cabo en especies de Liliaceae (ajo, cebolla), Bromeliaceae (piña), Agavaceae (agave), y Poaceae (caña de azúcar, trigo, maíz, arroz) (13).

En el caso de las gramíneas, se ha observado que la mayoría de sus células están fisiológicamente determinadas de manera irreversible en su estadio de diferenciación y su capacidad totipotente para rediferenciarse en plantas completas no se manifiesta aun en condiciones in vitro; y por ello son consideradas como recalcitrantes (25). A pesar de esto, se han logrado regenerar plantas de explantes de gramíneas utilizando dos vías morfogénicas distintas que son la organogénesis y la embriogénesis somática.

b) ORGANOGÉNESIS .

Se denomina organogénesis a la formación de órganos como raíces, tallos y hojas a partir de un explante cultivado in vitro.

En este proceso ocurre una dediferenciación celular del explante original y de acuerdo a las condiciones de cultivo se forman nuevos grupos meristemáticos, que pueden dar lugar a brotes, a raíces o a ambos.

La respuesta morfogénica está determinada por factores fisiológicos y bioquímicos de cada explante en particular, es decir la utilización de un mismo explante proveniente de plantas distintas o diversos explantes de la misma planta pueden dar lugar a respuestas morfogénicas totalmente diferentes. Los cambios cualitativos y cuantitativos del medio de cultivo van a ser también decisivos para determinar la iniciación de la organogénesis. Estos cambios pueden ser la concentración y el tipo de regulador de crecimiento, de los macro y los micronutrientes empleados y de otras sustancias orgánicas para desarrollar un determinado evento morfogénico.

La luz, la temperatura, el fotoperiodo y el pH son otros factores que inducen o limitan el desarrollo morfogénico (11 y 29).

c) EMBRIOGENESIS SOMÁTICA

Se denomina embriogénesis somática a la formación de embriones a partir de células somáticas, los cuales tienen la capacidad de germinar y producir plantas completas.

Durante este proceso de desarrollo se observa estadios morfológicos bien definidos los cuales se han denominado: estadios globular, de corazón y de torpedo, formandose un embrión bipolar en el que se puede distinguir el eje ápico brote-ápico raíz.

El concepto de que el embrión somático tiene un origen unicelular se basa en que pasa por los mismos estadios morfológicos que un embrión cigótico.

El medio de cultivo juega un papel importante para el desarrollo de los embriones somáticos y su posterior germinación. Se requiere de dos medios de cultivo, el primero para la inducción de los callos embriogénicos en el cual se pasa por los estadios globular, de corazón y de torpedo, y el segundo para permitir la germinación y desarrollo de una nueva planta (11 y 28)

El estado embriogénico del callo se adquiere en el periodo inicial del cultivo y generalmente se presenta con niveles altos de reguladores de crecimiento, siendo el más utilizado el 2,4-D (30). Otro factor que afecta el desarrollo

de embriones somáticos es una osmolaridad alta del medio de cultivo (30).

La propagación de plantas por embriogénesis somática es ventajosa si se considera su origen celular, ya que el riesgo de obtener una planta quimera es mínimo, expresándose en toda la planta las características genéticas deseables, en cambio por regeneración brote-raíz, se obtienen plantas quimeras ya que su origen es multicelular, en la organización de nuevos meristemas (32).

d) TRANSFERENCIA DE GENES A PLANTAS

Las técnicas de cultivo de tejidos han sido utilizadas ampliamente para obtener plantas transformadas mediante el uso de cepas de Agrobacterium tumefaciens (Smith y Townsend) (Conn.) que es el agente causal de la agalla de la corona. Dicha enfermedad vegetal afecta a un gran número de plantas dicotiledóneas, gimnospermas y algunas monocotiledóneas, se caracteriza por una proliferación de células con aspecto tumoral que se presenta comúnmente en la unión del tallo y la raíz. Esto ocurre cuando la planta sufre una herida por daño mecánico (insectos, viento) y es infectada por Agrobacterium.

En 1947 Armin C. Braun cultivó por primera vez el tejido tumoral de la agalla de la corona en un medio de cultivo compuesto solamente de sacarosa y sales inorgánicas, y encontró que dicho tejido tiene la propiedad de crecer

Indefinidamente, a diferencia de las células normales, las cuales requieren de la presencia de hormonas vegetales tales como las citocininas y las auxinas para poder crecer in vitro. Braun concluyó que las células tumorales fueron transformadas de manera permanente por Agrobacterium tumefaciens, y propuso que la bacteria introduce de alguna forma un principio de inducción de tumor en las células vegetales, ya que una vez formado el tumor, las células transformadas no requieren de la bacteria para crecer en ausencia de hormonas vegetales (8).

En 1974, Jeff Schell, Marc Van Montagu y colaboradores en la Universidad de Gante encontraron que el principio de inducción de tumores es un megaplásmido localizado en las cepas virulentas de Agrobacterium tumefaciens, el cual posee los genes requeridos para la tumorigénesis (37 y 52).

Durante la inducción del tumor un segmento específico del plásmido T1, denominado ADN-T (ADN Transferido), se transfiere y se expresa de manera funcional una vez que se ha integrado en el ADN nuclear de células vegetales. En el ADN-T se encuentran los genes que codifican para la biosíntesis de las citocininas y de las auxinas, y que son responsables de la independencia hormonal de las células transformadas y causa directa de la formación de los tumores.

Tomando como base el plásmido T1 de Agrobacterium tumefaciens, que es un sistema natural de transferencia genética a plantas, ha sido posible la

construcción de plásmidos o vectores no oncogénicos. En dichos vectores se han eliminado los genes del ADN-T responsables de la formación de tumores, manteniendo las señales que le otorgan su capacidad de transferir ADN al genoma de células vegetales, con los que es posible transformar células que pueden ser regeneradas en plantas completas (16).

Para poder expresar genes extraños en las plantas fue necesario construir genes quimera con señales que regulan la transcripción, funcionales en plantas, fusionados a la parte estructural de un gene extraño (por ejemplo de origen bacteriano).

En los primeros genes quimera construidos se utilizaron marcadores de selección dominantes de origen bacteriano, tales como el gene que codifica para la aminoglicosido fosfotransferasa tipo II que confiere resistencia a antibióticos aminoglicosidos tales como la kanamicina, la neomicina, la gentamicina, etc. Debido a que estos genes son funcionales en células vegetales ha sido posible la obtención de plantas transformadas (con resistencia a dichos antibióticos) utilizando las técnicas de cultivo de tejidos vegetales (6, 14 y 17).

Se ha demostrado que en las plantas transformadas de esta manera, la información genética es estable y no transmite a la prole comportándose como un factor simple de segregación mendeliana, lo cual hace posible su uso en

programas de fitomejoramiento (19). Recientemente se han logrado obtener variedades de plantas resistentes a insectos, a virus y a herbicidas utilizando esta tecnología (36).

Mediante el uso de técnicas de cultivo de tejidos de gramíneas y el cocultivo con cepas quiméricas de Agrobacterium tumefaciens resulta difícil poder transferir genes a dichas plantas, debido a las barreras anatómicas y fisiológicas que este grupo de plantas presenta. Es entonces necesario la búsqueda de metodologías más eficientes de regeneración de plantas que permitan posteriormente la aplicación de las técnicas de Ingeniería Genética a estos cultivos.

Con base en lo anteriormente mencionado se planteó el siguiente objetivo:

Conocer las condiciones para regenerar plantas de arroz a partir de callos inducidos en explantes longitudinales del brote apical.

Dicho sistema, una vez establecido servirá de base para establecer la metodología requerida para poder efectuar la transformación genética de gramíneas con cepas quiméricas de Agrobacterium tumefaciens.

ANTECEDENTES

a) TAXONOMIA

Reino Plantae
Subreino Embryobionta
División Tracheophyta
Subdivisión Spermatophytina
Clase Angiospermopsida
Subclase Monocotyledonidae
Orden Graminales
Familia Poaceae
Subfamilia Poideae
Tribo Oryzaceae
Género Oryza
Especie native (31)

b) GENERALIDADES DE UNA PLANTA DE ARROZ

El arroz es una planta anual, que posee un sistema eficiente de conducción de aire de las hojas a la raíz, lo cual hace posible su adaptación a diferentes medios ambientes. Se cultiva desde climas fríos en las altas montañas, en áreas húmedas y hasta en regiones desérticas. Además tiene una gran adaptabilidad a condiciones de suelos salinos, ácidos y alcalinos (34).

Bajo condiciones apropiadas, una planta puede dar lugar a la formación de un haz de tallos, los cuales son erectos, huecos y están provistos de nudos. De cada nudo sale una

vaina foliar que envuelve al entrenudo inmediatamente superior. Las hojas son lineales, y largas y están unidas a la vaina foliar en el nodo (3).

El sistema radicular es fibroso, con una raíz seminal que después será desplazada por raíces adventicias secundarias que nacen del nodo más bajo del tallo (10).

La inflorescencia es una panícula terminal que tiene de 30 a 500 espigas formadas cada unidad por dos lemmas estériles, la raquilla y el florot. Este incluye la lemma, la palea y la flor encerrada. En cada espiga se presenta una flor hermafrodita con 6 estambres y un pistilo (10, 26 y 33).

El grano es un cariósipide en el cual una sola semilla está fusionada a la pared del ovario. El grano está formado por: a) una vaina que consiste de dos hojas modificadas (lemma y palea) cuyas células son altamente lignificadas; b) la cubierta del cariósipide formada por 3 diferentes capas de células que son pericarpio, cubierta de la semilla y nucelo, c) el dospermo formado por una capa externa llamada aleurona que es rica en fósforo, magnesio y potasio, y el endospermo almidonoso compuesto por gran cantidad de células parenquimatosas ricas en gránulos de almidón y algunos cuerpos proteicos y d) el embrión que se encuentra en la parte ventral del cariósipide y está formado por la plúmula, la radícula y el mesocotilo (10).

El desarrollo de una planta de arroz comprende tres

fases, la primera llamada vegetativa que abarca desde la germinación de la planta hasta la iniciación de la panicula, la segunda o estado reproductivo que va desde la iniciación de la panicula a la floración y la tercera o fase de maduración que comprende desde la floración hasta la maduración de las semillas (10).

Cada fase se distingue por comprender un estado fisiológico diferente de la plántula.

En la fase vegetativa la semilla germina, emergiendo la radícula o raíz seminal a través de la coleorriza. Se desarrollan las hojas, llevándose a cabo mediante divisiones celulares periclinales que ocurren en los lados de la zona que comprende el meristemo apical. Estas células forman una protuberancia que es conocida como base foliar a partir de la cual se desarrollará la hoja, formándose primero el limbo y posteriormente lo que es la vaina. Esta protuberancia crece lateralmente y anclorra el eje, creciendo al mismo tiempo hacia arriba a partir de las células iniciales, denominándose a este tipo de crecimiento apical. El crecimiento de los bordes constituye el crecimiento marginal. Ambos crecimientos duran poco, determinándose posteriormente el crecimiento de la hoja a la base del primordio. Después de que el primordio de hoja ha encorreado el eje, las células del domo apical del lado de abajo y opuesto comienzan a dividirse para formar un nuevo primordio de hoja (12).

Las hojas se desarrollan apareciendo una cada tres o cuatro días, en la fase inicial.

El amacollamiento o desarrollo de hijuelos comienza en esta etapa, en el cual el primer hijuelo se producirá a partir del brote axilar en uno de los nodos más bajos. Una vez formados los primeros amacollos, se forman amacollos secundarios y posteriormente terciarios hasta que la planta alcanza su máximo estado de crecimiento.

El estado reproductivo comienza antes o después del máximo estado de amacollo, dependiendo de la variedad y del medio ambiente. En este estado el primordio de la panícula se ha diferenciado y llega a ser visible. La iniciación de la panícula ocurre en el tallo principal y a partir de la zona del domo apical. Durante el desarrollo de la panícula las espigas son visibles. La autopolinización y la fertilización ocurren en el estado reproductivo.

En el estado de maduración principia el desarrollo del grano, primeramente se observa un estado lechoso, en el que el contenido del cariósido es acuoso y después adquiere consistencia lechosa, posteriormente pasa a un estado pastoso, en el que la porción lechosa adquiere una consistencia dura, y finalmente el estado de madurez, en el cual la panícula cambia de color verde a amarillo. Los granos son amarillos y duros, en este tiempo ocurre la senescencia de la última hoja incluyendo la hoja bandera (10).

c) MEDIO DE CULTIVO PARA CELULAS VEGETALES

Los constituyentes de un medio de cultivo para células y tejidos vegetales incluyen:

1.- Sales inorgánicas:

Las células vegetales en crecimiento requieren del suministro continuo de sales inorgánicas, algunas de ellas se utilizan en cantidades relativamente grandes denominadas macronutrientes, y otras por el contrario son requeridas en cantidades menores llamadas micronutrientes.

Dentro de los macronutrientes la fuente de nitrógeno es aportada en forma de nitratos y/o amonio, y en ciertas ocasiones se utilizan los aminoácidos. El azufre y el magnesio son suministrados por, el, $MgSO_4$, el fósforo se adiciona en forma de NaH_2PO_4 o KH_2PO_4 , el potasio es encontrado en KCl , KNO_3 , y KH_2PO_4 , el calcio es adicionado en forma de $CaCl_2$ o $Ca(NO_3)_2$.

Los micronutrientes utilizados en el medio de cultivo son cobre en forma de $CuSO_4$, cinc adicionado como $ZnSO_4$, manganeso suministrado como $MnSO_4$, boro como H_3BO_3 , molibdeno como Na_2MoO_4 , cobalto como $CoCl_2$ y hierro que usualmente es añadido en forma quelatada con EDTA, para facilitar su disposición en el medio a diferentes intervalos de pH.

2.- Compuestos orgánicos:

a) Vitaminas: Las vitaminas actúan como cofactores en

sistemas enzimáticos. Se considera que la tiamina (vitamina B₁) es esencial en cultivo de tejidos in vitro para el crecimiento de células vegetales. Otras vitaminas como el ácido nicotínico y la piridoxina también pueden estimular el crecimiento.

b) Aminoácidos: Con excepción de la glicina, los aminoácidos no son adicionados normalmente al medio de cultivo (11 y 30). En algunos casos el suministro de ciertos aminoácidos favorece el tipo de respuesta del explante, como sucede en la producción de embriones somáticos de maíz con la adición de prolina (4).

c) Carbohidratos: La adición de una fuente de carbono al medio de cultivo de tejidos es necesaria, ya que pocas células vegetales que se desarrollan in vitro son capaces de crecer en ausencia de una fuente de carbono y energía, manteniéndose por su propia fijación de CO₂ y generación de energía por fotosíntesis.

La sacarosa constituye la fuente de carbono más utilizada, aunque también se usan monosacáridos como la glucosa, la fructosa y la galactosa.

d) Extractos naturales: Cuando los compuestos químicamente definidos del medio fallan en la inducción de una respuesta fisiológica son utilizados extractos naturales como hidrolizado de caseína, extracto de levadura, extracto de malta, endosperma líquido de coco que aportan al medio

diversos compuestos como hormonas, nitrógeno, sales minerales, vitaminas, etc.

3.- Agentes gelificantes: Los tejidos vegetales necesitan un soporte en el medio de cultivo que les facilite la disposición de los nutrientes, dentro de los cuales se encuentran el agar, la agarosa y el gelrite.

4.- pH: El crecimiento de células vegetales in vitro y la disponibilidad de los nutrientes del medio para dichas células depende del pH del mismo. Generalmente en cultivo de tejidos el pH es ajustado entre 5 y 6, con KOH, NaOH para alcalinizar y HCl para acidificar (11 y 30).

5.- Hormonas y reguladores del crecimiento vegetal

El crecimiento y desarrollo de una planta es un proceso que se encuentra estrictamente regulado por sustancias químicas que van a activar o reprimir determinados procesos fisiológicos. Las hormonas vegetales son agentes importantes que van a actuar en estos procesos.

Una hormona vegetal se define como una sustancia orgánica que se forma en ciertas zonas de la planta y que actúa en zonas distintas a su origen, induciendo respuestas fisiológicas y morfológicas. Dichos compuestos también pueden ser activos en los sitios donde fueron originados, por lo que en el sentido estricto no son equivalentes a las hormonas animales, y por lo tanto se los denomina reguladores de crecimiento, más que hormonas. Además de los compuestos que

son sintetizados en las plantas, existe un grupo de compuestos químicos sintéticos que inducen respuestas fisiológicas similares, y a los cuales por analogía también se los ha denominado reguladores de crecimiento.

Los reguladores de crecimiento se clasifican en:

- auxinas
- citocininas
- giberelinas
- etileno
- inhibidores (23)

AUXINAS

El primer tipo de hormona vegetal descubierta fueron las auxinas. Se designaron como compuestos que tenían la propiedad de promover la curvatura en coleóptilo de avena. En 1916 A. J. Haagen-Smit y col. reportaron al ácido indolacético como la auxina que se presentaba en la mayoría de las plantas.

Las auxinas se dividen en 5 grupos de acuerdo con su estructura química:

Ácidos indólicos: ácido indol-3-acético, ácido indol-propiónico, y ácido indol-butírico. Estos últimos se encuentran naturalmente sólo en algunas especies vegetales.

Ácidos naftalénicos: ácido naftalen acético, ácido naftoxi-acético.

Ácidos fenoxi-acéticos: ácido 2,4-diclorofenoxiacético,

ácido	2,4,5-triclorofenoxiacético,	ácido
3-metil-4-clorofenoxiacético.		
Ácidos benzoicos:	ácido 2,4,6-triclorobenzoico,	ácido
2,3,6-triclorobenzoico.	ácido 2-metoxi-3,6-diclorobenzoico.	
Ácidos	picolínicos:	ácido
4-amino-3,5,6-tricloropicolínico.		

Los últimos cuatro grupos se encuentran dentro de las auxinas sintéticas (23).

Las auxinas intervienen en el alargamiento de la pared celular, haciendo que se relajen las capas de fibrillas de celulosa y permitiendo que se agregen nuevas. A nivel molecular activan la síntesis de RNA y proteínas (7).

CITOCININAS

El descubrimiento de las citocininas ocurrió en 1955 cuando Miller y colaboradores aislaron una sustancia llamada cinetina (6-furfurilaminopurina) de una muestra de DNA de espermatozoos de aronco. Dicha sustancia promueve la división celular de callos de tabaco crecidos en cultivos in vitro (23).

Posteriormente se han sintetizado otras citocininas como 6-bencilaminopurina o benciladenina, y tetrabencilaminobenciladenina. Otras sustancias que producen efectos fisiológicos y morfológicos similares a las citocininas, se han encontrado en forma natural en las

plantas como la 6 dimetilaminopurina o 2-isopenteniladenina (2 IP) y la 6(4-hidroxi-3-metil-but-2-enil)-aminopurina, que se aisló del maíz y se le denominó zeatina. Todas las citocininas son derivados de la adenina (45).

Las citocininas tienen efecto en la formación de órganos en tejidos cultivados in vitro, en el alargamiento y en la división celular, en la prevención de la senescencia y en la inducción de la floración (7).

d) CULTIVO DE TEJIDOS DE GRAMINEAS

En los cereales y en los pastos la regeneración de plantas completas que provienen de tallo puede ocurrir de dos maneras diferentes, via morfogénesis brote-raíz, en la que las células se organizan dando lugar a estructuras meristemáticas que se desarrollarán en brotes y las cuales posteriormente producirán raíces; y via embriogénesis somática, proceso por el cual las células se organizan en estructuras muy similares a embriones y a partir de las cuales una planta se desarrollará sin haber pasado por la unión de dos células sexuales (32).

Se han realizado estudios tratando de encontrar las zonas o explantes de las gramíneas que puedan dividirse y diferenciarse in vitro. En el maíz, *Zea mays* L. cultivar,

Seneca 60, se ha reportado que sólo responden los explantes que provienen de la parte basal del cilindro de hojas de la zona más cercana al domo apical del meristemo, al ser cultivados en el medio de Green y Phillips con 2 mg/l de 2,4-D para promover la formación de callos (45).

Resultados similares se presentan en el sorgo, Sorghum bicolor (L.) Moench var. 0 522 (49), en Lolium multiflorum Lam (19), y el trigo, Triticum aestivum L. cultivar Zenith (53), para los cuales al cultivar los explantes de hojas de diferentes estadios de desarrollo (plantulas de diferente edad), se encontró que sólo áreas cercanas al meristemo de plantulas jóvenes son capaces de proliferar y formar callos.

Dicho gradiente de diferenciación se ha utilizado en la mayoría de los cereales y las pastas para promover la formación de callos de explantes de la parte basal de las hojas y posteriormente una respuesta tanto embriogénica como organogénica.

En la caña de azúcar, Saccharum officinarum L. clona 63-1067, se cultivaron explantes transversales de segmentos de hoja desde la parte basal hasta los 8 cm en medio MS con diferentes reguladores de crecimiento. Se encontró que los explantes respondían al medio formando 3 tipos diferentes de callos, el primero llamado callo embriogénico cuya consistencia era dura y compacta, formado por células

pequeñas y con alto contenido citoplasmático, el segundo era un callo suave, friable, translúcido, cuyas células se presentaban alargadas, denominado callo no embriogénico y un tercer tipo de callo, llamado mucilaginoso que se presentaba con células altamente disociadas. Se encontró que la concentración óptima de 2,4-D para la formación de callo embriogénico fue de 0.5 a 1.5 mg/l. El uso de picloram (0.1 a 6 mg/l) o de ácido naftalenacético (1 mg/l) + 2,4-D (0.5 mg/l) + boncladonina (0.5 mg/l), dio poco resultado en la inducción de callos embriogénicos. De los callos embriogénicos se desarrollaron estructuras muy parecidas a embriones verdaderos con escutelo, coleoptilo y coleorriza, que germinaron cuando se transfirieron a medio con o sin 0.002-0.02 mg/l de zeatina o 1 mg/l de ácido giberélico (42).

En el arroz, Oryza sativa L. al utilizar explantes transversales de la zona del brote apical de las variedades S6, S7, M9, O56 y Chía Nan 8 y al cultivarlos en medio N6 con 1-3 mg/l de 2,4-D se observa la formación de estructuras globulares y compactas que al ser subcultivadas a medio reducido en 2,4-D o con 0.1 mg/l de ácido naftalenacético + 0.2 mg/l de cinetina regeneran plantas via embriogénesis somática. El porcentaje de formación de dichas estructuras es bajo y varía con la variedad usada (49).

Para sorgo, Sorghum bicolor (L.) Moench var. O 522 se iniciaron callos de la parte basal de las hojas en medio M6

con 1-3 mg/l de 2,4-D, se obtuvo la regeneración de brotes y plantas cuando los callos eran transferidos a medio MS sin auxinas. La formación de estructuras globulares se llevó a cabo cuando el callo se transfería a medio con 0.5 mg/l de 2,4-D y la germinación de las mismas en un medio con 0.1 mg/l de cinetina (47).

Experimentando con 21 variedades diferentes de trigo Triticum aestivum L. se encontró que la respuesta del explante a las auxinas para la formación de callo es dependiente del genotipo, ya que cuando se utiliza un gradiente de hoja, las células que vienen del meristemo y que van formando parte de la hoja pierden su totipotencialidad y la velocidad con que ésta ocurra depende de la variedad usada (50).

La regeneración de plantas por embriogénesis somática a partir de explantes de la zona del meristemo apical se ha reportado para la cebada Hordeum vulgare L. cultivares Slavonac, Alkar, Sokol, y Robur, encontrándose que los reguladores como 2,4-D y 2,4,5-T solos o en combinación con benciladenina inducen la formación de callo con potencial embriogénico. El mayor porcentaje de callo embriogénico se observó cuando los explantes se cultivaron en medio MS a la concentración de 7.8 μ M de 2,4-D + 22 μ M de benciladenina, 7.8 μ M de 2,4-D + 44 μ M de benciladenina, 7.8 μ M de 2,4,5-T + 44 μ M de benciladenina, 31.3 μ M de 2,4,5-T + 22 μ M de

benziladeno. Fue posible obtener la regeneración de plantas a partir de estos callos cuando se subcultivaron en medio sin reguladores de crecimiento o con 3 μ M de ácido 2,3,5-triodobenzoico (29).

A partir de explantes longitudinales de la zona del meristemo apical de trigo, Triticum aestivum L., crecidos en medio MS con 2 mg/l de 2,4-D, se han iniciado cultivos de callos que al ser subcultivados en un medio sin hormonas son inducidos para la proliferación de brotes (51).

Al utilizar diferentes tipos de explantes de plántulas de 7 días de cebada Hordeum vulgare L., cultivares Himalaya y Akka, para la inducción de callo, se observó que para Akka al comparar el medio B5 con el MS se obtenía un 40 % más de producción de callo en el B5 y que la formación de callo era baja cuando eran inducidos de mesocotillo, brote apical y vaina de la hoja, y alta cuando provenían de raíz, embriones inmaduros y embriones maduros. La utilización de 2,4-D a la concentración de 1 mg/l de 2,4-D induce el desarrollo de callo. La regeneración de brotes ocurrió solo de callos provenientes de embriones inmaduros.

Los diferentes tipos de explantes del cultivar Akka y solamente el meristemo de Himalaya se cultivaron en medio B5 y en medio CS (Cheng-Smith). Para el cultivar Akka la formación de callo inducido de meristemo fue mejor en medio B5 y para Himalaya en medio CS. Los callos inducidos de

embriones inmaduros de Akka crecieron mejor en MS y los de embriones maduros en CS. Las raíces del cultivar Akka no formaron callos en CS y si hubo formación en MS (9).

La utilización de embriones inmaduros como fuente de explante para la inducción de callos se ha reportado para trigo, Triticum aestivum L. cultivares Froid-Centurk y Heige utilizando medio MS con 4.5 μ M y 13.5 μ M de 2,4-D. La regeneración via embriogénesis somática y organogénesis se presenta en medio con 0.45 μ M de 2,4-D solo o suplementado con 23 μ M de cinetina (21).

Para el maíz, Zea mays L., al utilizar 11 cultivares diferentes se reportó que la concentración de auxina (0.25-2 mg/l de 2,4-D) utilizada en el medio de cultivo (MS) no tenía influencia en la cantidad y en la calidad de los callos embriogénicos formados a partir de embriones inmaduros. El efecto del medio de cultivo en la producción de callos embriogénicos se refleja en la concentración de sacarosa utilizada. La organización de embriones ocurre cuando se adiciona al medio entre 6 y 12 % de sacarosa (20).

En el triticale, Triticosecale Wittmack línea 103b, 13981, 13991, y 14001, se indujo la embriogénesis somática de callos provenientes de la región osculeolar de explantos de embriones inmaduros. La condición óptima para el desarrollo embriogénico fue en el medio Kao suplementado con L-prolina, L-alanina, L-glutámico, L-arginina y 36 μ M de 2,4-D y una

longitud del embrión entre 1 y 2 mm para la línea 13991 y el medio MS con 36 μM de 2,4-D suplementado con 20 μM de citrato de amonio. Dichos embriones germinan cuando son transferidos a medio con 1 mg/l de cinetina (32).

En el arroz, Oryza sativa var. Chyokoto y Gaiya Dhan Tozar, al utilizar segmentos transversales de la raíz seminal y de las raíces nodales y cultivadas en medio MS con 3 mg/l de 2,4-D adicionado con 2 g/l de hidrolizado de caseína, se obtiene la formación de callos que presentan estructuras parecidas a embriones y que germinan dando plantas completas al ser subcultivados en medio con 0.02 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de cinetina + 2 g/l de hidrolizado de caseína. La presencia de cinetina e hidrolizado de caseína favorece la formación de embriones y de plantas. La formación de plantulas y embriones fue mas alta para Gaiya Dhan Tozar que para Chyokoto (1).

En otros reportes de arroz, Oryza sativa L. cultivar Taipei, se utiliza el ápice de raíz de plantulas de 10 dias cultivadas en medio MS con 2 mg/l de 2,4-D. Posteriormente el callo es subcultivado a medio con 2,4-D, Dicamba o Picloram. Se produjeron callos embriogénicos en medio con 1 mg/l de Picloram a las 24 semanas de cultivo, 1-4 mg/l de Dicamba a las 7 semanas de cultivo. Las estructuras parecidas a embriones fueron transferidas a medio con 1 mg/l de cinetina para su regeneración (54).

Se compararon 60 variedades de las 3 subespecies de

arroz Oryza sativa L. (Japónica, Indica y Javónica) para la producción de callos con potencial regenerativo. El medio de cultivo utilizado fue el MS con 2 mg/l de 2,4-D, se encontró que la subespecie japónica produce el mayor rendimiento y que se regeneraban brotes cuando los callos eran subcultivados a medio MS con 0.02 mg/l de 2,4-D y 10 mg/l de cinetina (2).

Callos embriogénicos y morfogénicos provenientes de embriones maduros de maíz, Zea mays L. línea B73, se mantuvieron a lo largo de 18 meses en medio MS con 2 mg/l de Dicamba, 25 mM de prolina y 100 mg/l de hidrolizado de caseína conservando su capacidad regenerativa (43), en la avena, Avena sativa L. var. Park, el 20 % de callos embriogénicos provenientes de semilla madura, mesocotilo y embriones inmaduros inician brotes o plantas completas después de 36 semanas de cultivo cuando se transfieren a medio LS con una concentración de 2,4,5-T menor a 4 μ M (18).

El uso de inflorescencias inmaduras como fuente de explante para la inducción de un cultivo embriogénico se ha reportado para Pennisetum purpureum Schum (pasto elefante) selecciones PP12 y PP13, utilizando medio N6 con 1 mg/l de 2,4-D + 0.5 mg/l de benziladenina + 1 mg/l de ácido naftalenacético ó 2 mg/l 2,4-D + 5 mg/l de benziladenina, obteniendo 70 % de producción de callo embriogénico. Los embriones somáticos germinan en medio MS sin hormonas o con 1

mg/l de ácido giberélico (14).

Al utilizar el mismo explante para Pennisetum americanum Schum (mijo perla), la producción de cultivos embrionícos en suspensión se dio en MS a 2.5 mg/l de 2,4-D y 5 % de endosperma de coco, la formación de embriones se dio en medio MS semisólido a 0.25-0.5 mg/l de 2,4-D (40), para Panicum millaceum L. MS 1563 y Panicum millare Lamk GPM 97 el medio utilizado para la producción de callo embrioníco fue el MS con 2.5 mg/l de 2,4-D y 5 % de endosperma de coco y se obtuvo la regeneración de embriones somáticos en MS con 0.2 mg/l de 2,4-D (27).

MATERIALES Y METODOS

a) Material biológico

La variedad de arroz utilizada fue la Morales A-83 que fue generada en el programa de Mejoramiento Genético de Arroz del Campo Agrícola Experimental de Zacatepec, Morelos.

Esta variedad presenta como características deseables un buen rendimiento, resistencia al acame y a la enfermedad de la quema del arroz causada por Pyricularia grisea.

Su ciclo biológico es de 180 días, la altura de las plantas es de 115 cm, el número promedio de hijuelos es de 17 y la longitud de la panícula es de 27 cm (5).

b) Fuente de explante

La regeneración de gramíneas es posible a partir de explantes multicelulares tales como embriones inmaduros o inflorescencias inmaduras, base foliar, mesocotilo y en algunos casos explantes radiculares y de microsporas vía embriogénesis somática o morfogénesis de brotes y raíces.

Debido a que es posible regenerar fácilmente plantas de la región del brote apical, se utilizaron explantes de la mitad del cilindro meristemático de plántulas etioladas y verdes de arroz.

c) Desinfección y germinación de las semillas

-De las semillas se eliminó la cascavilla (loma y palea), para facilitar su desinfección.

-El proceso de desinfección se efectuó en un ambiente estéril proporcionado por una campana de flujo laminar.

-Las semillas se sometieron a un tratamiento de bicloruro de mercurio ($HgCl_2$) al 0.01 % durante 30 minutos, se enjuagaron con agua estéril 5 veces.

-Se dejaron en imbibición durante 12 horas para facilitar una germinación homogénea de todas las semillas.

-Las semillas se cultivaron en cajas Petri con 15 ml del medio básico de Murashige-Skoog (Tabla 1) modificado con 1 % de sacarosa, 0.2 % de gelrite como agente de gelificación y a un pH de 5.5.

-Se incubaron en un cuarto de crecimiento, la mitad en condiciones de oscuridad y la otra mitad con iluminación proporcionada por lámparas fluorescentes tipo luz de día, 1500-2000 luxes, y con un fotoperíodo de 16 horas de iluminación y 8 de oscuridad.

TABLA 1. MEDIO BASICO DE MURASHIGE Y SKOOD

MACRONUTRIENTES		mg/l
NH_4NO_3		1650
KNO_3		1900
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		440
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		370
KH_2PO_4		170
HIERRO		
Na_2EDTA		37.25
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		37.05
MICRONUTRIENTES		
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		22.3
$\text{ZnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		9.6
H_3BO_3		6.2
KI		0.03
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$		0.25
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$		0.025
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$		0.025
VITAMINAS		
Glicina		2
Ac. Nicotínico		0.5
Piridoxina.HCl		0.5
Tiamina.HCl		0.1
Mio-inositol		100mg/l
Sacarosa		30 g/l
pH 5.7-5.9		

d) Disección del explante

-Se utilizaron plántulas de dos días de germinación.

-Se diseccionaron bajo un estereomicroscopio en una campana de flujo laminar.

-Se eliminó la radícula, la semilla y se dejó una porción del coleoptilo de aproximadamente 9 mm que es donde se encuentra la región meristemática del brote apical.

-Este cilindro se disectó en forma longitudinal dejando al descubierto la mitad del meristemo apical y la región subapical.

-Se diseccionaron 50 explantes de este tipo para cada uno de los tratamientos utilizados por experimento.

e) Medios de cultivo para la inducción de callos

-Se utilizó el medio básico de Murashige-Skoog (Tabla 1) suplementado con los siguientes reguladores de crecimiento que definieron los tratamientos utilizados:

1.- Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 2 mg/l

2.- Acido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) 2 mg/l

y bencilaminopurina (BAP) 1 mg/l

3.- Acido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) 2mg/l

4.- Acido 2,4,5-triclorofenoxiacético (2,4,5-T) 2mg/l

y bencilaminopurina (BAP) 1 mg/l

- 5.- Acido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba) 2 mg/l
- 6.- Acido 3,6-dicloro-2-metoxibenzoico (Dicamba) 2 mg/l
y benzilaminopurina (BAP) 1 mg/l
- 7.- Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) 2 mg/l
- 8.- Acido 4-amino-3,5,6-tricloropicolínico (Picloram) 2 mg/l
y benzilaminopurina (BAP) 1 mg/l

-Debido a que en el cultivo de tejidos de gramíneas se requiere auxinas sintéticas para la inducción de callos, se emplearon los anteriores tratamientos.

f) Inducción de callos

-Los explantes obtenidos se colocaron en los diferentes medios para la inducción de callos. Por cada tratamiento se colocaron 50 explantes de plántulas cultivadas en condiciones de luz (verdes) y 50 explantes de plántulas cultivadas en condiciones de oscuridad (etioladas).

-Se incubaron durante 4 semanas en un cuarto de crecimiento en condiciones de oscuridad.

De cada tratamiento se evaluó la respuesta de los explantes con respecto a su capacidad de inducción de callo embrionico.

Se empleó el diseño de bloques al azar con un arreglo en parcelas divididas donde el factor medio de cultivo (tratamiento) se consideró como parcela grande con 8 niveles,

los cuales corresponden a 2,4-D, 2,4-D BAP, 2,4,5-T, 2,4,5-T BAP, Dicamba, Dicamba BAP, Picloram y Picloram BAP. El factor tipo de explante se consideró como parcela chica con 2 niveles, etiolado y verde.

El número de repeticiones por cada tratamiento fue de 4 y cada repetición constó entre 10 y 15 explantes..

La evaluación de la variable calle embriogénico se hizo por medio de porcentajes para cada repetición, por tal motivo para aplicar la técnica del análisis de varianza se utilizó la transformación de arco seno de los datos, usando la siguiente expresión:

$$y = \arcsin \sqrt{\text{Porcentaje}}$$

Posterior al análisis de varianza se realizó una comparación de medias utilizando la prueba de Tukey.

g) Obtención de peso fresco y seco de callos

A las cuatro semanas de cultivo de los callos se obtuvo una muestra representativa de los mismos y se procedió a pesarlos en una balanza analítica Mettler H80, para la obtención del peso fresco de los callos inducidos en los diferentes tratamientos. Se pesaron 10 callos por cada tratamiento.

Para la obtención del peso seco se utilizaron los mismos callos que para el peso fresco procediéndose a secarlos en un horno BG MOD E 51, durante 5 horas a 100°C y posteriormente

se pesaron en una balanza analítica Mettler 1100. Se pesaron 10 callos por cada tratamiento.

h) Regeneración de plantas

Una vez formados los callos se disectaron en un microscopio estereoscópico, se eliminó la parte necrosada y se separaron los fragmentos del callo con estructuras embriogénicas y se cultivaron en el medio de regeneración.

De cada tratamiento se subcultivaron entre 20 y 30 callos en cajas Petri que contenían 15 ml de medio MS con 0.02 mg/l de 2,4-D + 1 mg/l de cinetina + 2 g/l de hidrolizado de caseína.

Se incubaron en el cuarto de crecimiento en condiciones de luz (lámparas fluorescentes tipo luz de día 1500-2000 luxes) con un fotoperíodo de 16 horas, luz-8 horas oscuridad.

Se utilizó un diseño completamente al azar. Se evaluó la respuesta de regeneración de los callos inducidos de explantes verdes mediante un análisis de varianza. El mismo diseño y análisis fue utilizado para callos con respuesta de regeneración provenientes de explantes etiolados.

El número de repeticiones para cada tratamiento varió entre 2 y 5. El número de explantes por cada repetición fue variable entre 5 y 10.

Se evaluó en porcentaje la respuesta de los callos para cada repetición. Se realizó una transformación de los

datos utilizando la transformación de arco seno.

Con los datos transformados se realizó el análisis de varianza y una comparación de medias utilizando el método de diferencia mínima significativa. Mediante una prueba de t_c se hizo una comparación del tipo de explante del que provenía el callo.

Las plantas que fue posible regenerar de los callos iniciados en los diferentes medios, fueron separadas y cultivadas en frascos con 40 ml de medio básico de Murashige-Skoog, para que pudieran enraizar y desarrollarse.

i) Establecimiento de plantas en suelo

Las plantas desarrolladas de aproximadamente 15 cm de longitud fueron sembradas en suelo contenido en vasos de polietileno y crecidas en una cámara a una humedad relativa del 100 %.

Todas las plantas provenientes de los diferentes tratamientos se desarrollaron normalmente.

j) Histología de callos embrionarios y no embrionarios

De los callos inducidos en los diferentes tratamientos, se procesaron aquellas estructuras de apariencia embrionaria y callos no embrionarios, para su observación histológica.

Se fijaron bloques de callos de aproximadamente 5 mm³ que contenían estructuras de apariencia globular. También se

procesaron muestras de callos no embrionicos y embriones somáticos germinando en comparación con embriones cigóticos también germinando.

Fijación: Etanol-acido acético 3:1 v/v durante 3 horas.

Embebido: Etanol absoluto	1 hora
Butanol-cloroformo 3:1 v/v	1 hora
Butanol-cloroformo 1:1 v/v	1 hora
Butanol-cloroformo 1:3 v/v	1 hora
Cloroformo con parafina	1 o 2 días
Parafina filtrada 59-60 °C	3 horas
Parafina filtrada 59-60 °C	2 horas
Parafina filtrada 59-60 °C	2 horas
Parafina al vacío 59-60 °C	2 horas

Selección: los cortes se hicieron en un microtomo. El grosor de los mismos fue de 10 micras.

Quitar parafina: se sumergieron los cortes en una solución de Histo-clear durante 20 minutos, por dos veces.

Hidratación: Etanol absoluto	10 minutos
etanol 90 %	10 minutos
etanol 70 %	15 minutos
etanol 40 %	10 minutos
etanol 40 %	10 minutos
agua destilada	10 minutos
agua destilada	10 minutos

Tinción: se sumergieron los cortes en solución de acetocarmin durante 30 segundos.

Se lavaron con agua destilada para remover el exceso de colorante.

Deshidratación: etanol 50 %	1 minuto
etanol 50 %	1 minuto

etanol 70 %	1 minuto
etanol 95 %	1 minuto

Contratación: los cortes se sumergieron en solución de fastgreen durante 15 segundos.

Deshidratación rápida a través de 3 cambios de etanol absoluto.

Transferencia a fenol-histoclear 1:3 v/v 5 minutos

Histo-clear: 3 cambios de 5 minutos cada uno.

Montar en una gota de euparal.

RESULTADOS

a) Inducción de callos embriogénicos y no embriogénicos

Se indujeron callos en todos los tratamientos probados, en los que se observaron dos tipos de morfología; la primera en la cual los callos son de apariencia nodular, compactos y de color amarillo, o amarillo pálido y con presencia de estructuras embriogénicas, denominado callo embriogénico (Figura B-1 y B-2); y la segunda en la que son de apariencia friables y de color blanquecino denominados callos no embriogénicos (Figura B-3).

Tomando en cuenta estos dos criterios se evaluó el experimento después de cuatro semanas de cultivo haciendo una evaluación visual en un estereomicroscopio.

En todos los tratamientos se presentan los dos tipos de callo (Figura A-4).

El mayor porcentaje de callo embriogénico se obtuvo en los tratamientos que contenían 2,4-D y 2,4-D/BAP, disminuyendo respectivamente para 2,4,5-T, Dicamba y encontrándose los menores porcentajes para Picloram (Gráfica 1).

El análisis para la variable callo embriogénico nos muestra que no existe diferencia significativa entre el tipo

de explante ya sea verde o etiolado, sin embargo existe una diferencia altamente significativa para los medios de cultivo utilizados (tratamientos) (Tabla 2).

La prueba de Tukey nos señala como mejor tratamiento para la formación de callo embrionógico al 2,4-D etiolado, encontrándose también como mejores tratamientos al mismo nivel estadístico al 2,4-D/BAP etiolado, 2,4-D/BAP verde y 2,4-D verde. El tratamiento con menor respuesta en la formación de callo embrionógico fue el Picloram/BAP etiolado (Tabla 3).

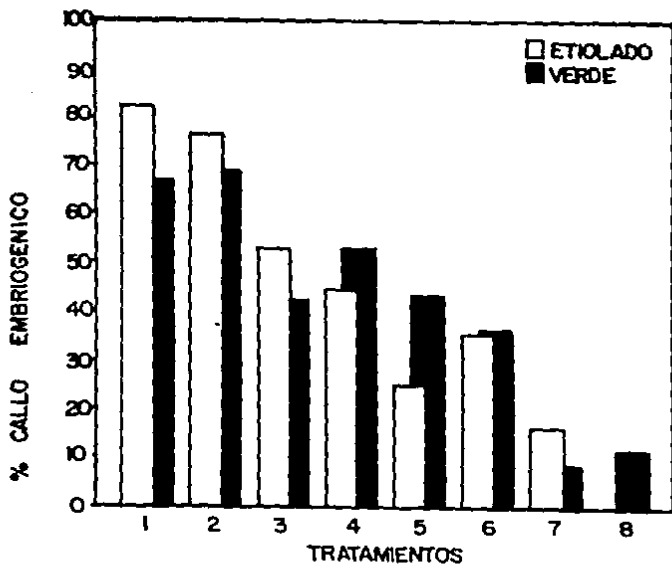
En los tratamientos que contienen BAP se observó un efecto necrótico en el callo producido, mientras que en medios con Picloram y Picloram/BAP mostraron proliferación marcada de raíces (Figura 8-3).

El peso fresco de los callos nos muestra que los de menor peso son los inducidos en 2,4-D, 2,4-D/BAP, aumentando el peso para los de 2,4,5-T, 2,4,5-T/BAP, Dicamba, Dicamba/BAP y los de mayor peso fueron los de Picloram y Picloram/BAP (Gráfica 2).

El peso seco nos muestra que los callos de menor peso son los de 2,4-D, 2,4-D/BAP, 2,4,5-T, 2,4,5-T/BAP, Dicamba, Dicamba/BAP, y los de mayor peso son los de Picloram y Picloram/BAP.

El porcentaje en peso seco de callos inducidos de plantas etioladas son mayores que los de plantas verdes, a

GRAFICA 1. EFECTO DE AUXINAS SINTETICAS Y DE BAP EN LA INDUCCION DE CALLOS EMBRIOGENICOS A PARTIR DE EX-PLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) Var. MORELOS A-83



- 1) 2,4-D
 2) 2,4-D/BAP
 3) 2,4,5-T
 4) 2,4,5-T/BAP

- 5) DICAMBA
 6) DICAMBA/BAP
 7) PICLORAM
 8) PICLORAM/BAP

4
 TABLA 2. Análisis de varianza para la variable callo embrionógico proveniente de explantes del brote apical de arroz (*Oryza sativa* L.) var Moreton A-83.

FUENTES DE VARIACION	GRADOS DE LIBERTAD	SUMAS DE CUADRADOS	CUADRADOS MEDIOS	F ₁₈ CALCULADAS
Repeticiones	3	322.0391		
Tratamientos (T)	7	35367.38	5052.482	33.45017 **
Error (a)	21	3171.945	151.045	
Explantos (E)	1	38.30469	38.30469	.3413553 ns
T x E	7	1291.280	184.4699	1.643918 ns
Error (b)	24	2693.125	112.2135	
TOTALES	63	42884.08		

Prmedio General: 41.65375
 Coeficiente de Variación (a): 20.50524
 Coeficiente de Variación (b): 25.4313

ns = no significativa

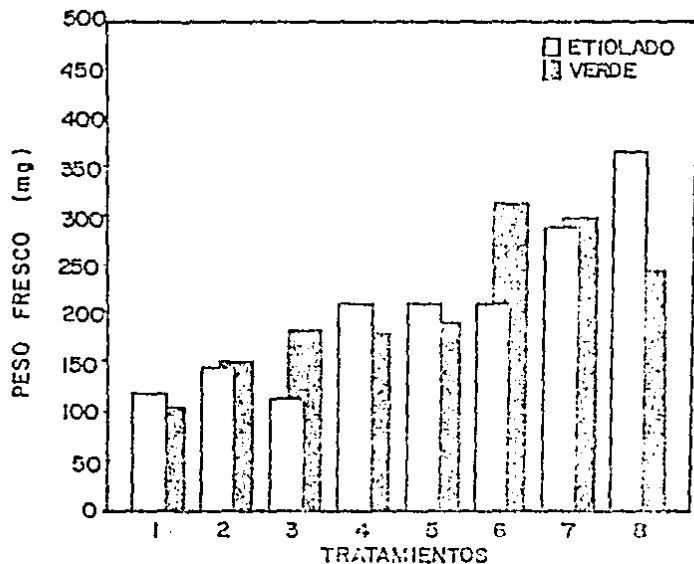
** = altamente significativa

TABLA 3. SEPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DE SUKEY PARA LA
 VARIABLE CALLO EMBRIOGENICO PROVENIENTE DE EXPLANTES DEL
 BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var. MORELOS A-83

TRATAMIENTO	MEDIA (% DE CALLO EMBRIOGENICO)	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
2,4-D eL	82.3875	a
2,4-D BAP eL	76.50501	a b
2,4-D BAP V	69.00	a b c
2,4-D V	66.6675	a b c
2,4,5-T eL	53.2225	b c d
2,4,5-T BAP V	52.895	b c d
2,4,5-T BAP eL	44.54	c d e
DICAMBA V	43.58	c d e
2,4,5-T V	42.42501	c d e
DICAMBA BAP V	36.67	d e f
DICAMBA BAP eL	35.7625	d e f
DICAMBA eL	25.4225	d e f g
PICLORAM eL	16.68	e f g
PICLORAM BAP V	11.585	f g
PICLORAM V	9.037501	f g
PICLORAM BAP eL	0	g

Los valores de las medias están representados por datos transformados de acuerdo con la fórmula $y = \arcsin \sqrt{\text{Porcentaje}}$. Los tratamientos con la misma letra son iguales estadísticamente.

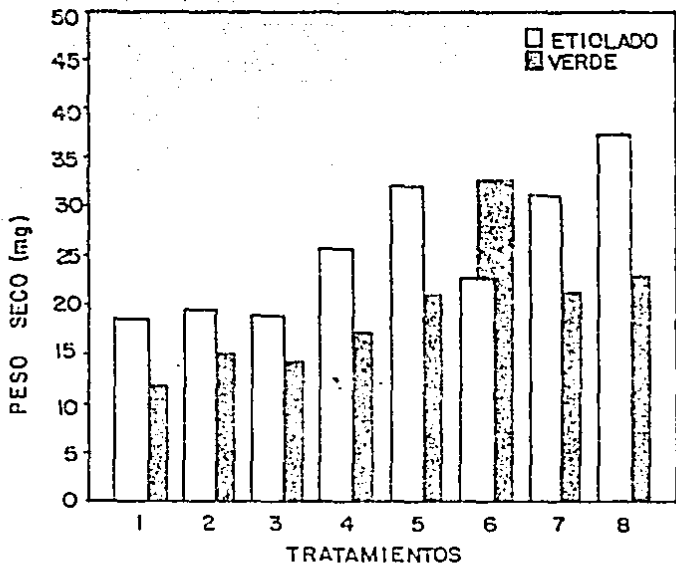
GRAFICA 2. PESO FRESCO DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) Var. MORELOS A-83



- 1) 2,4-D
- 2) 2,4-D/BAP
- 3) 2,4,5-T
- 4) 2,4,5-T/BAP

- 5) DICAMBA
- 6) DICAMBA/BAP
- 7) PICLORAM
- 8) PICLORAM/BAP

GRAFICA 3. PESO SECO DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var. MORELOS A-83



- 1) 2,4-D
- 2) 2,4-D/BAP
- 3) 2,4,5-T
- 4) 2,4,5-T/BAP

- 5) DICAMBA
- 6) DICAMBA/BAP
- 7) PICLORAM
- 8) PICLORAM/BAP

excepción de los de Dicamba/BAP, en el que el porcentaje es mayor para callos inducidos de explantes verdes (Gráfica 3).

Con los resultados obtenidos podemos observar que los callos compactos son de menor masa y volumen celular que los callos disgregables.

b) Histología de callos embriogénicos y no embriogénicos

En la figura C-1 del callo embriogénico se observan estructuras globulares con mayor tinción que el resto del callo. En tales zonas se presentan células meristemáticas pequeñas, isodiamétricas, presentando en su citoplasma sólo un núcleo grande. Las células se disponen en el tejido en forma muy compacta y dejando sólo pocos espacios intercelulares.

El otro tipo de células que se puede o no presentar en ciertas zonas del callo embriogénico y en su totalidad en un callo no embriogénico son células grandes, altamente vacuolizadas y diferenciadas, pudiendo ocupar su vacuola cerca del 90 X del volumen celular. En dichas células la tinción no es tan alta como en las meristemáticas, debido a que no están dividiéndose a la velocidad con que lo hacen las meristemáticas o bien presentan ya una especialización (Figura C-2).

En el corte del embrión somático (Figura C-4), se

observan estructuras típicas de un embrión cigótico de gramíneas, presentando como apical (d) primera y segunda hoja foliar (h), escutelo (e) en el que se presenta una mayor tinción en la parte central, definiéndose dicha zona como células meristemáticas del procambium. También se observa una protuberancia al lado izquierdo que define parte de lo que sería el coleoptilo (c). La radícula se encontraba presente, pero por efecto del corte no se observa.

En el corte del embrión cigótico (Figura C-5), se observa la zona del domo apical (d), primera y segunda hoja foliar (h), coleoptilo (c) y radícula (r).

En la Figura C-6, se observa regeneración vía organogénesis. Se presenta el corte de un brotito emergiendo del callo, presentando su domo apical (d), y primera y segunda hoja foliar (h). Su tinción es mayor debido a la alta división de sus células meristemáticas. En dicho brote no se presentan las estructuras de un embrión como serían el coleoptilo, escutelo y radícula. La zona del callo que se encuentra en contacto con el brote, presenta células vacuolizadas.

c) Regeneración de plantas

La capacidad regenerativa de un callo depende del grado de diferenciación celular alcanzada, así callos con

estructuras embriogénicas muestran una mayor cantidad de plantas regeneradas, mientras que los callos con células muy vacuolizadas no presentan el fenómeno de regeneración, aunque en algunos casos se observa solamente la proliferación de raíces.

Para ello se subcultivaron callos de cada tratamiento en medio de regeneración. Se observaron dos tipos de respuesta morfogénica, una caracterizada por la aparición de manchas verdes en diferentes lugares del callo, las cuales se van diferenciando morfológicamente hasta formar brotes sin raíces (Figura B-7) y a la que se denominó respuesta tipo organogénica. En otros casos la regeneración empieza con la emergencia de la radícula y posteriormente el desarrollo de brotes (Figura B-4, B-5 y B-6) de manera similar al proceso de germinación de una semilla, por lo que se denominó como tipo embriogénica.

Los mayores porcentajes de regeneración de plantas, se obtuvieron en callos inducidos en medio con Dicamba/BAP, Dicamba, 2,4-D/BAP, y 2,4,5-T/BAP. A pesar de encontrarse en los tratamientos con 2,4-D el mayor porcentaje de callos embriogénicos, al ser subcultivados al medio de regeneración, no muestran un alto porcentaje regenerativo. Los callos inducidos en los medios que contenían BAP en combinación con cada una de las auxinas, muestran una respuesta de regeneración siempre mayor (Gráfica 4).

El análisis de varianza para la variable regeneración a partir de callos provenientes de explantes etiolados, nos muestra que existe una diferencia significativa de regeneración entre los tratamientos de los cuales se generaron originalmente los callos (Tabla 4).

Al utilizar una separación de medias por el método de diferencia mínima significativa al 5 %, nos define como mejor tratamiento de regeneración a partir de callos provenientes de explantes etiolados al Dicamba/BAP, encontrándose al mismo nivel estadístico 2,4-D/BAP, Dicamba y 2,4-D. Los tratamientos de los que se obtuvo menor porcentaje de regeneración fueron Picloram y Picloram/BAP (Tabla 5).

El análisis de varianza para la variable regeneración a partir de callo proveniente de explantes verdes también nos determina una diferencia altamente significativa de regeneración entre los tratamientos del cual provienen los callos (Tabla 6).

El mejor tratamiento para la variable regeneración a partir de callo proveniente de explantes verdes se presentó en Dicamba/BAP, encontrándose al mismo nivel estadístico Dicamba, 2,4,5-T/BAP y 2,4-D/BAP. El tratamiento en el que se obtuvo menor porcentaje de regeneración fue el 2,4-D, encontrándose al mismo nivel estadístico Picloram/BAP, Picloram y 2,4,5-T (Tabla 7).

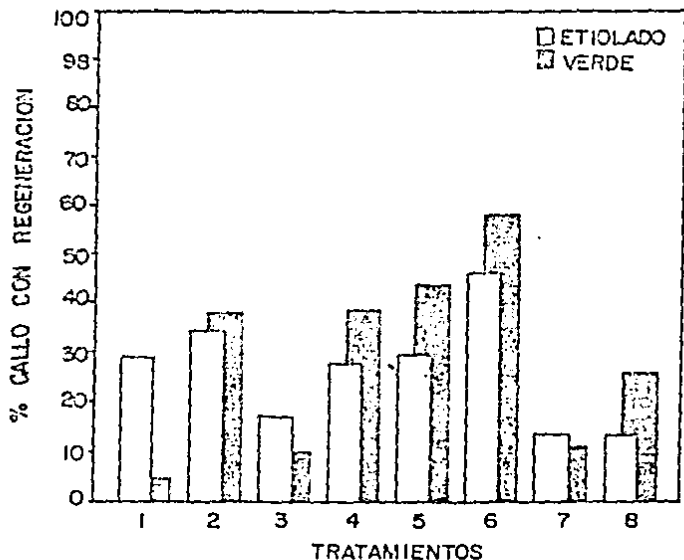
La prueba de t_c aplicada para la comparación entre

callos provenientes de explantes verde y etiolados, nos reporta que no existe diferencia entre el tipo de explante del cual se originó el callo para obtener la regeneración de plantas.

Los callos inducidos en Dicamba/BAP verde y 2,4-D/BAP verde, regeneraron el mayor número de plantas (Tabla 8).

Se observó que las plantas que se desarrollan via embriogénesis somática tienen un crecimiento mucho más rápido que las de tipo organogénico, ya que el sistema radicular se encuentra completamente desarrollado (Figura B-8 y B-9).

GRAFICA 4 REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES DEL BROTE APICAL DE - ARROZ (*Oryza sativa* L.) Var. MORELOS A-83



- 1) 2,4-D
- 2) 2,4-D/BAP
- 3) 2,4,5-T
- 4) 2,4,5-T/BAP

- 5) DICAMBA
- 6) DICAMBA/BAP
- 7) PICLORAM
- 8) PICLORAM/BAP

TABLA 4. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE
 REGENERACION A PARTIR DE CALLOS PROVENIENTES DE EXPLANTES
 ETIOLADOS DEL BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var.
 MORLOS A-63.

F.V.	gl	SC	CM	F _c
TRATAMIENTOS	7	2264.5194	323.50270	3.05*
error	15	1590.6833	105.04553	
Total	22	3855.2027		

* Significativo al 5 %

TABLA 5. SEPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DE DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA AL 5% PARA LA VARIABLE REGENERACION A PARTIR DE CALLOS INDUCIDOS DE EXPLANTES ETIOLADOS DEL BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var. MORELOS A-83

TRATAMIENTO	MEDIA (% DE RESPUESTA)	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
DICAMBA BAP	45.85	a
2,4-D BAP	33.85333	a b
DICAMBA	29.15667	a b c
2,4-D	28.96	a b c
2,4,5-T BAP	27.485	b c
2,4,5-T	17.02667	b c
PICLORAM	13.28	c
PICLORAM BAP	13.28	c

Los valores de las medias están representados por datos transformados de acuerdo a la fórmula $y = \arcsen \sqrt{\text{Porcentaje}}$

Los tratamientos con la misma letra son iguales estadísticamente.

TABLA 6. ANALISIS DE VARIANZA PARA LA VARIABLE
 REGENERACION A PARTIR DE CALLOS PROVENIENTES DE EXPLANTES
 VERDES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var.
 MORELOS A-83

F.V.	gl	SC	CM	F _c
TRATAMIENTO	7	9584.7674	1369.2523	7.423**
error	18	3320.1404	184.4522	
Total	25	12904.908		

** Altamente significativo al 1 %

TABLA 7. SEPARACION DE MEDIAS POR EL METODO DE DIFERENCIA MINIMA SIGNIFICATIVA AL 5 % PARA LA VARIABLE REGENERACION A PARTIR DE CALLOS PROVENIENTES DE EXPLANTES VERDES DEL BROTE APICAL DE ARROZ (Oryza sativa L.) var. MORELOS A-83.

TRATAMIENTO	MEDIA (% DE RESPUESTA)	SIGNIFICANCIA ESTADISTICA
DICAMBA BAP	58.33	a
DICAMBA	42.346	a b
2,4,5-T BAP	38.23	a b
2,4-D BAP	37.44	a b
PICLORAM BAP	25.905	b c
PICLORAM	11.07	c
2,4,5-T	10.0	c
2,4-D	4.441	c

Los valores de las medias están representados por datos transformados de acuerdo con la fórmula $y = \arcsin \sqrt{\text{Porcentaje}}$.

Los tratamientos con la misma letra son iguales estadísticamente.

TABLA 8. PLANTAS REGENERADAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) var. MORCELOS A-53, VIA ORGANOGENESIS Y VIA EMBRIOGENESIS SOMATICA.

TRATAMIENTO	No. TOTAL DE PLANTAS	EMB	ORG
2,4-D et	9	5	4
2,4-D V	1	1	
2,4-D BAP et	14	10	4
2,4-D BAP V	31	20	11
2,4,5-T et	14	8	6
2,4,5-T V	2	1	1
2,4,5-T BAP et	11	9	2
2,4,5-T BAP V	18	8	10
DICAMBA et	9	4	5
DICAMBA V	28	17	11
DICAMBA BAP et	29	15	14
DICAMBA BAP V	46	22	24
PICLORAM et	6	3	3
PICLORAM V	10	4	6
PICLORAM BAP et	2	2	
PICLORAM BAP V	9	8	1

FIGURA A

- 1) Disección del brote apical de una plántula de arroz de 2 días de edad.
- 2) Mitad longitudinal del meristemo apical de plántulas de arroz de 2 días de edad. Fotografía tomada en microscopio electrónico de barrido. 48X.
- 3) Zona meristemática de la mitad longitudinal de plántulas de arroz de 2 días de edad. Se observa domo apical (d), zona subapical (sa) y hojas foliares (h). Fotografía tomada en microscopio electrónico de barrido. 120X.
- 4) Callos inducidos en medios con auxinas sintéticas y BAP, a las 4 semanas de cultivo.

FIGURA A

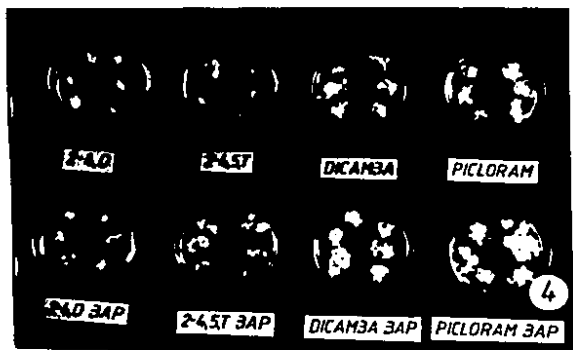
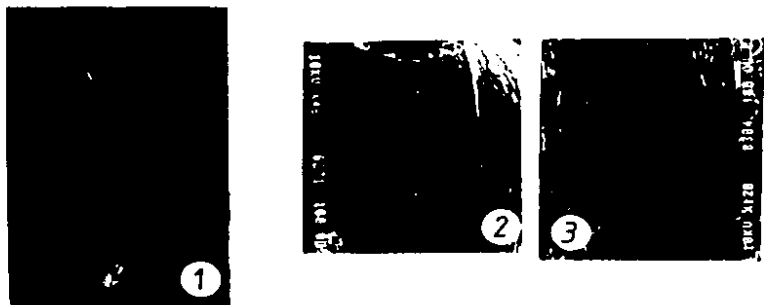


FIGURA B

1) Callo embriogénico inducido en medio con 2,4-D/BAP, a las cuatro semanas de cultivo.

2) Ampliación de una sección del callo embriogénico.

3) Callo no embriogénico inducido en Picloram, mostrando proliferación de raíces, a las cuatro semanas de cultivo.

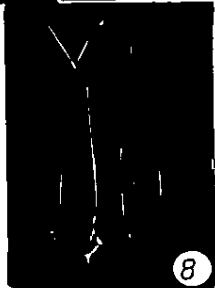
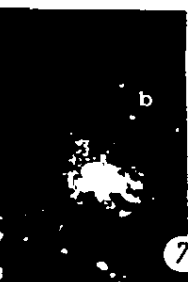
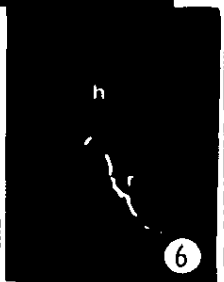
4, 5 y 6) Embrión somático en los inicios de la germinación en el medio de regeneración, mostrando la radícula (r) y el brote (h).

7) Brotes emergiendo de callo.

8) Plántulas completas a los 10 días después de la germinación.

9) Plantas establecidas en suelo, a los 4 meses.

FIGURA B



11

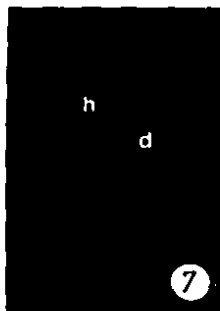
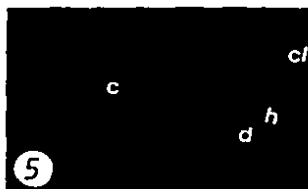
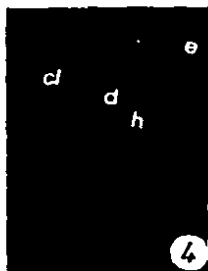
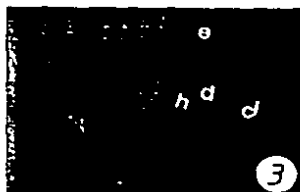
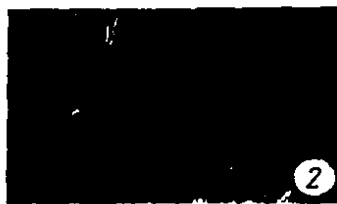
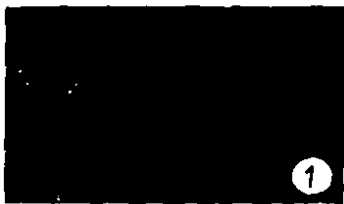


FIGURA C

Fotografías tomadas en un fotomicroscopio invertido Zeiss, campo claro, ICM 403.

- 1) Corte histológico de un callo embriogénico mostrando estructuras globulares. 32X.
- 2) Callo no embriogénico en donde se observan células completamente diferenciadas y altamente vacuolizadas sin ningún sitio meristemático. 32X.
- 3) Corte histológico de embriones somáticos en los inicios de la germinación, en donde se aprecia el domo apical (d), primera y segunda hojas foliares (h), coleoptilo (cl) y escutelo (e) 32X.
- 4) Embrión somático al inicio de la germinación cultivado *in vitro*. 51.2X
- 5) Embrión cigótico al inicio de la germinación, en donde se observa el domo apical (d), primeras hojas foliares (h), coleoptilo (cl) y coleorriza (c). 32X.
- 6) Corte de un brote emergiendo del callo, se observa el domo apical (d) y las primeras hojas foliares (h). 32X.
- 7) Ampliación de una sección de la figura C-6. 51.2X.

FIGURA C



DISCUSION

La inducción de embriogénesis somática en cereales y pastos es una de las técnicas más utilizadas para la propagación vegetativa y selección de variantes somaclonales. En la mayoría de los casos se han utilizado como explantes embriones inmaduros e inflorescencias inmaduras, de los cuales se han logrado establecer cultivos de callos embriogénicos con una alta capacidad regenerativa. Una de las desventajas que presenta el uso de estas técnicas, es el largo periodo que se requiere para la obtención de explantes, ya que primero es necesario el establecimiento de plantas en suelo hasta la fase reproductiva o de maduración (que en el arroz varía de 4 a 5 meses) (41) y posteriormente la esterilización ya sea de inflorescencias o embriones inmaduros, en los cuales puede haber problemas de contaminación por ser material que crece en condiciones no axénicas, en este paso el número de explantes colectados puede ser un factor limitante, ya que está en relación con el número de plantas sembradas. Después vendría la formación de callos embriogénicos y luego la regeneración de plantas. De esta manera el proceso completo se lleva a cabo entre 7 y 8 meses.

Una alternativa para eliminar este problema es el utilizar explantes como el broto apical y base foliar de

plántulas germinadas in vitro, en los que no se tiene el problema de tiempo para obtener el explante, cantidad, ni de esterilización, por lo cual es fácilmente accesible a la manipulación en cualquier época del año. De esta manera el periodo que se requiere para inducir callos embriogénicos y regenerar plantas disminuye a 2 o 3 meses.

En este trabajo se analizó la posibilidad de inducir callos embriogénicos con capacidad regenerativa a partir de explantes del brote apical. Los resultados obtenidos nos indican que el Dicamba en interacción con BAP promueve una mayor capacidad regenerativa que el resto de los reguladores de crecimiento. Dichos resultados no concuerdan con lo obtenido por otros investigadores para arroz, los cuales usaron explantes transversales del brote apical de la zona superior al meristemo (19), segmentos transversales de raíz seminal y raíces nodales (1) y ápice de raíz (34) y reportaron que el 2,4-D es el regulador más activo para la inducción de callos embriogénicos con capacidad regenerativa. Dicho regulador también ha resultado ser el más eficiente en la formación de callos embriogénicos en explantes de la parte basal de las hojas de sorgo (47), en embriones inmaduros de trigo (21) y embriones inmaduros de triticale (32).

Se observó que en todos los tratamientos utilizados, la adición de BAP induce una mayor capacidad de regeneración de plantas, lo cual está de acuerdo con los resultados obtenidos

En explantes de la zona del brote apical de cebada (29). Este es el primer reporte que indica que el Dicamba como auxina sintética es más efectivo que el 2,4-D, el 2,4,5-T y el Picloram para la inducción de callos con capacidad regenerativa a partir de explantes del brote apical de arroz, con una eficiencia de regeneración de 49.09 % para callos inducidos de explantes etiolados y 58.33 % para callos inducidos de explantes verdes.

Los dos tipos de respuesta ya sea la embriogénesis somática o la organogénesis se encontró en los callos inducidos en los diferentes tratamientos, o incluso en el mismo callo, como había sido reportado para sorgo (47) y para trigo (21).

Se demostró que se pueden utilizar tanto explantes verdes como etiolados para la inducción de callos embriogénicos, entre los cuales no se encontró una diferencia significativa en respuesta.

Este sistema está siendo utilizado para la infección (cocultivo) y posible transferencia genética con cepas de Agrobacterium tumefaciens debido a que proporciona una gran cantidad de explantes en un periodo corto. La inducción de callo embriogénico se puede llevar a cabo en medios selectivos cuyo contenido son los componentes básicos del mejor medio de inducción, más el agente selectivo que puede ser kanamicina o higromicina. Además este tipo de explante

ofrece un gran potencial para la introducción de material genético extraño por otras vías, como recientemente se ha reportado para soya usando la aceleración de partículas por descargas eléctricas (22).

CONCLUSIONES

Es posible la regeneración de plantas de arroz a partir de explantes del brote apical.

El mejor medio de inducción de callos con capacidad regenerativa fue el Dicamba BAP, tanto para explantes verdes como etiolados.

Se regeneraron plantas via embriogénesis somática y organogénesis brote-raíz en todos los callos inducidos con los diferentes reguladores de crecimiento.

Mediante cortes histológicos se comprobó la presencia de embriones somáticos y de algunos estadios de la embriogénesis somática, así como la de brotes regenerados via organogénesis. Las plantas regeneradas de esta manera fueron establecidas en suelo satisfactoriamente.

LITERATURA REVISADA

- 1.- Abe, T. y Y., Futsuhara. 1985. Efficient plant regeneration by somatic embryogenesis from root callus tissues of rice (Oryza sativa L.). J. Plant Physiol. 121. 111-118.
- 2.- Abe, T. y Y., Futsuhara. 1986. Genotypic variability for callus formation and plant regeneration in rice (Oryza sativa L.). Theor Appl Genet 72. 3-10.
- 3.- Angladotto, A. 1975. El arroz. Editorial Blume. Barcelona. 35-72.
- 4.- Armstrong, C. L. y C. E. Green. 1989. Establishment and maintenance of friable, embryogenic maize callus and the involvement of L-proline. Planta. 164. 207-214.
- 5.- Batalla, M. de L. 1984. Moroles A771, nueva variedad de arroz de riego para el estado de Morelos. INIA, CIAMEC, Zacatepec, Morelos. Folleto Técnico No. 9.
- 6.- Bavan, M. W., R. B., Flavell, y M. D., Chilton. 1983. A chimeric antibiotic resistance gene as a selectable marker for plant cell transformation. Nature. 304. 184-187.

- 7.- Bidwell, R. G. S. 1979. Fisiología vegetal. AGT Editor, Mexico. 600-625.
- 8.- Chilton, M. D. 1983. A vector for introducing new genes into plants. Scientific American. 249. 36-45.
- 9.- Dale, P. J. y E. Deambrogio. 1979. A comparison of callus induction and plant regeneration from different explants of Roridum vulgare. Z. Pflanzenphysiol. 94. 65-77.
- 10.- De Datta, S. K. 1981. Principles and practices of rice production. John Wiley y Sons, Inc. Nueva York. 146-171.
- 11.- Dodds, J. H. y L. W., Roberts. 1982. Experiments in plant tissue culture. Cambridge University Press. Cambridge. 21-35, 78-88, 89-97.
- 12.- Esau, K. 1976. Anatomía vegetal. Ediciones Omega. Barcelona. 453-512.
- 13.- Flick, G. E., D. A., Evans y W. R., Sharp. 1983. Organogenesis. En: Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding. Vol. 1. D. A., Evans, W. R., Sharp, P. V., Amaratunga y Y., Yamada (eds.) Macmillan Publishing Company. Nueva York. 1. 13-81.

- 14.- Fraley, R. T., S. G., Rogers, R. B., Horsch, P. R., Sanders, J. S., Flick, S. P., Adams, M. L., Bittner, L. A., Brand, C. L., Fink, J. S., Fry, O. R., Galluppi, S. B., Goldberg, N. L., Hoffmann y S. C., Woo. 1983. Expression of bacterial genes in plant cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 80. 4803-4807.
- 15.- Hahn, R., P., Stabel, A. P., Czernilofsky, H. H., Steinbiz, L., Herrera-Estrella, y J., Schell. 1985. Uptake, integration, expression and genetic transmission of a selectable chimeric gene by plant protoplasts. Mol Gen Genet. 199. 161-168.
- 16.- Herrera-Estrella, L., A., Dopicker, M., Van Montagu y J., Schell. 1983. Expression of chimeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid derived vector. Nature. 303. 209-213.
- 17.- Herrera-Estrella, L., M., De Block, E., Messens, J. P., Hernalsteens, M., Van Montagu y J., Schell. 1983. Chimeric genes as dominant selectable markers in plant cells. The EMBO Journal. 2. 987-993.
- 18.- Heyser, J. W. y M. W., Nabors. 1982. Long term plant regeneration, somatic embryogenesis and green spot formation in secondary oak (Quercus rubra) callus. Z. Pflanzenphysiol. 107. 153-160.

- 19.- Joarder, O. I., N. H., Joarder y P. J., Dale. 1986. In vitro response of leaf tissues from Lolium multiflorum a comparison with leaf segment position, leaf age and in vivo mitotic activity. Theor. Appl. Genet. 73. 286-291.
- 20.- Lu, C. V., Vasil y I. K., Vasil. 1983. Improved efficiency of somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of maize (Zea mays L.) Theor. Appl. Genet. 66. 285-289.
- 21.- Magnusson, I. y C. H. Bormann. 1983. Anatomical observations on somatic embryogenesis from scutellar tissues of immature zygotic embryos of Triticum aestivum. Physiol. Plant. 63. 137-149.
- 22.- McCabe, D. E., W. E. Swain, B. J., Martinell y P. Christou. 1988. Stable transformation of soybean (Glycine max) by particle acceleration. Bio/technology. 6. 923-926.
- 23.- Moore, T. C. 1979. Biochemistry and physiology of plant hormones. Springer-Verlag. Nueva York. 32-89, 147-180.
- 24.- Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum. 15. 473-497.

- 25.- Ozias-Aktsi, P. y H. Lorz. 1984. Progress and limitations in the culture of cereal protoplasts. Trends in Biotechnology, 2. 119-123.
- 26.- Pursglove, J. W. 1985. Tropical crops. Monocotyledons. Longman, Nueva York. 161-199.
- 27.- Rangau, T. S., e I. K. Vasil. 1983. Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue cultures of Panicum millocoom L. and Panicum miliare Lamk. Z. Pflanzenphysiol. 109. 49-53.
- 28.- Reinert, J., Y. P. S., Bajaj y B., Zbell. 1977. Aspects of organization - organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. En: Plant Tissue and Cell Culture, H. E., Street (ed.), Blackwell Scientific Publications, Oxford. 389-427.
- 29.- Rengel, Z. y S., Jelaska. 1986. Somatic embryogenesis and plant regeneration from seedling tissues of Hordeum vulgare L. J. Plant. Physiol. 124. 385-392.
- 30.- Seabrook, J. E. A. 1980. Laboratory Culture. En: Plant tissue culture as a source of biochemicals, F. J. Stane (ed.), CRC Press, Inc. Boca Raton, Florida. 1-20.

- 31.- Stace, C. A. 1984. Plant taxonomy and biogeobotanics.
Edward Arnold, Londres. 250-251.
- 32.- Stolarz, A. y H., Lörz. 1986. Somatic embryogenesis in
vial multiplication and plant regeneration from
immature embryo explants of hexaploid Triticale (x
Triticosecale Wittmack). Z. Pflanzenzüchtg. 96. 333-362.
- 33.- Stoskopf, N. C. 1985. Cereal grain crops. . Reston
Publishing Company, Inc. Virginia. 22-45.
- 34.- Swaminathan, M. S. 1984. Rice. Scientific American. 250.
1-11.
- 35.- Tarkenton, L. y M. K., Davey. 1975. From single cells to
plants. Wykeham Publications, Londres. 1-16.
- 36.- Vack, M., A., Roynaerts, H., Hoffe, S., Jansons, M., De
Beuckeleer, C., Deun, M., Zabeau, M., Van Montagu, y J.,
Leemans. 1987. Transgenic plants protected from insect
attack. Nature. 328. 33-37.
- 37.- Van Larebeke, N., G., Engler, M., Holstors, S., Van Den
Elsacker, I., Zaenen, R. A., Schilperoort, y J., Schell.
1974. Large plasmid in Agrobacterium tumefaciens
essential for crown gall-inducing ability. Europe. 252.
169-170.

- 38.- Vasil, I. K. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration in cereals and grasses. En: Proc. 9th Intl. Cong. Plant Tissue and Cell Culture, 101-104.
- 39.- Vasil, I. K. 1983. Regeneration of plants from single cells of cereals and grasses. En: Genetic engineering in eukaryotes. P. F., Lurquin y A., Kleinhofs (eds.) Plenum Publishing Corporation, USA, 233-252.
- 40.- Vasil, I. K., Vasil. 1982. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of Pennisetum americanum (Pearl Millet, Gramineae). Amer. J. Bot. 69, 1441-1449.
- 41.- Vergara, B. S. 1979. Crecimiento y desarrollo de la planta. En: Cultivo del arroz, Manual de Producción, Escuela de Agricultura, Universidad de Filipinas, Editorial Limusa, México, 33-53.
- 42.- Wei-Jane, H. e I. K., Vasil. 1983. Somatic embryogenesis in sugarcane (Saccharum officinarum L.) I. The morphology and physiology of callus formation and the ontogeny of somatic embryos. Protoplasma, 110, 169-180.
- 43.- Wang., A. S. 1987. Gallus induction and plant regeneration from maize mature embryos. Plant Cell Reports, 6, 360-362.

- 44.- Wang, D. & I. K. Vasil. 1982. Somatic embryogenesis and plant regeneration from inflorescence segments of Pennisetum purpureum Schum (napier or elephant grass). Plant Science Letters. 25. 147-154.
- 45.- Wareing, P. F. & I. D. J. Phillips. 1970. The control of growth and differentiation in plants. Pergamon Press. Oxford. 47-70.
- 46.- Wenzler, H. & F. Morris Jr. 1986. Mapping regions of the maize leaf capable of proliferation in culture. Protoplasma. 131. 103-105.
- 47.- Wernicke, W. & R. Brettell. 1980. Somatic embryogenesis from Sorghum bicolor leaves. Nature. 287. 138-139.
- 48.- Wernicke, W. & R. I. S. Brettell. 1982. Morphogenesis from cultured leaf tissue of Sorghum bicolor - Culture initiation. Protoplasma. 111. 19-27.
- 49.- Wernicke, W., R. Brettell, T. Wakizuka & I. Potrykus. 1981. Adventitious embryoid and root formation from rice leaves. Z. Pflanzenphysiol. 103. 361-365.

- 50.- Wernicke, W. y L. Milkovitz. 1984. Developmental gradients in wheat leaves - Response of leaf segments in different genotypes cultured in vitro. J. Plant Physiol. 115. 49-58.
- 51.- Wernicke, W. y L. Milkovitz. 1986. The regeneration potential of wheat shoot meristems in the presence and absence of 2,4-dichlorophenoxy-acetic acid. Protoplasma. 131. 131-141.
- 52.- Zaenen, I., N. Van Larebeke, H. Touchy, M. Van Montagu y J. Schell. 1974. Supercoiled circular DNA in crown gall inducing Agrobacterium strains. J. Mol. Biol. 86. 109-127.
- 53.- Zamora, A. D. y K. J. Scott. 1983. Callus formation and plant regeneration from wheat leaves. Plant Science Letters. 29. 103-109.
- 54.- Zimny, J. y H. Lorz. 1986. Plant regeneration and initiation of cell suspensions from root-tip derived callus of Oryza sativa L. (rice). Plant Cell Reports. 5. 89-92.