

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS DE ALGUNOS
GENOTIPOS DE ARROZ (Oryza sativa L.) A PARTIR DE
CALLOS ORIGINADOS DE EMBRIONES CIGÓTICOS
MADUROS.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

Camila Amellali Oquelí Otero

Carlos Augusto Salazar Méndez

Para optar al grado de:

Licenciado(a) en Biología



Ciudad Universitaria, San Salvador, septiembre de 1999.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA



**REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS DE ALGUNOS
GENOTIPOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A PARTIR DE
CALLOS ORIGINADOS DE EMBRIONES CIGÓTICOS
MADUROS.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

Camila Amellali Oquellí Otero

Carlos Augusto Salazar Méndez

Para optar al grado de:

Licenciado(a) en Biología

ASESOR: M. Sc. JOSÉ RAFAEL VEGA LÓPEZ

ASESOR ADJUNTO: LICDA. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA



Ciudad Universitaria, San Salvador, septiembre de 1999.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR
FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA
ESCUELA DE BIOLOGÍA

**REGENERACIÓN DE PLÁNTULAS DE ALGUNOS
GENOTIPOS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A PARTIR DE
CALLOS ORIGINADOS DE EMBRIONES CIGÓTICOS
MADUROS.**

TRABAJO DE GRADUACIÓN PRESENTADO POR:

Camila Amellali Oquelí Otero

Carlos Augusto Salazar Méndez

Para optar al grado de:

Licenciado(a) en Biología

ASESOR: MSc. JOSÉ RAFAEL VEGA LÓPEZ



ASESORA ADJUNTA: LICDA. ZOILA VIRGINIA GUERRERO MENDOZA



Ciudad Universitaria, San Salvador, septiembre de 1999.

UNIVERSIDAD DE EL SALVADOR

RECTOR
DR. JOSÉ BENJAMÍN LÓPEZ GUILLÉN

SECRETARIO GENERAL
LIC. ENNIO ARTURO LUNA

FISCAL
DR. JOSÉ HERNÁN VARGAS CAÑAS

FACULTAD DE CIENCIAS NATURALES Y MATEMÁTICA

DECANO
ING. JOSÉ FRANCISCO MARROQUÍN



DIRECTOR DE LA ESCUELA
M.Sc. FRANCISCO ANTONIO CHICAS BATRES

SAN SALVADOR, EL SALVADOR, CENTRO AMÉRICA

DEDICATORIA

Dedico este trabajo, fruto de su gracia, a DIOS TODOPODEROSO: quien ha sido luz, fortaleza y guía en cada momento de mi vida . A mis padres: Héctor F. Oqueli Colindres (q.e.p.d.) y Diana M. Otero de Oqueli, quienes han sido mis modelos a seguir por su dedicación, esfuerzo, ideales, valentía y amor que siempre me han profesado; en especial a ella por que en últimos años ha sido el pilar de nuestra familia . A mi hermana: Aleida M. Oqueli Otero, porque aún en la distancia siempre ha sido la mejor compañía durante el largo camino. A José Arturo: por su apoyo incondicional y amor, el cual me ayudó a seguir adelante.

Camila Amellali Oqueli Otero.

Dedico el presente trabajo a DIOS TODOPODEROSO: por darme siempre su bendición y proveerme de buenos pensamientos. A mi esposa: Glenda Marlene Olmedo de Salazar, por estar siempre a mi lado brindándome su apoyo y comprensión. A mis padres: Rafael Augusto Salazar (q.e.p.d.), sé que desde el cielo ha sentido como suyos mis éxitos; Lillian Méndez de Salazar, por su formación para ser un hombre de bien y su apoyo incondicional. A mi hermano: Rafael Edgardo Salazar Méndez, por demostrarme a cada momento que puedo contar con él ante cualquier situación. A mi abuela: Matilde Pacheco de Méndez, por que siempre estuvo pendiente de mí.

Carlos Augusto Salazar Méndez.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos primeramente a *JEHOVÁ YIRÉ* por habernos permitido alcanzar ésta nueva meta, en nuestras vidas y habernos provisto de la sabiduría necesaria para realizarla.

Al Licenciado José Rafael Vega López, quien fungió como asesor oficial de nuestro Trabajo de Graduación, por transmitirnos su entusiasmo hacia la investigación y la profundización a temas actualizados en el campo de la biotecnología; así como por su orientación a lo largo de todo el trabajo. A la Licenciada Zoila Virginia Guerrero Mendoza, por su valiosa participación y apoyo.

Agradecemos especialmente a los delegados observadores: Licenciada Rhina Esquivel y al Dr. Rigoberto Ayala, por su apoyo incondicional y su colaboración indispensable en el desarrollo de esta investigación.

Al Ingeniero Agrónomo Ramón Eduardo Servellón, de la sección de Fitomejoramiento, del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, por su colaboración en la obtención del material utilizado en el proceso experimental.

A nuestras madres, parientes y amigos, en especial Hada, Tania y Karen; por estar junto a nosotros con su fé y apoyo.





INDICE DE CONTENIDOS

Página No.

INDICE DE CONTENIDOS.....	IV
INDICE DE FIGURAS.....	VI
RESUMEN.....	XI
INTRODUCCIÓN.....	I
1. Antecedentes.....	i
2. Cultivo de Tejidos.....	5
3. Medios de Cultivo.....	9
4. Otros Componentes.....	13
5. Investigaciones en Arroz.....	14
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	16
1. Cultivo de Arroz.....	16
2. Descripción Botánica.....	17
3. Requerimientos de clima y suelo.....	17
4. Situación del Cultivo de Arroz en El Salvador.....	18
5. Aplicación de Biotécnicas.....	20
OBJETIVOS.....	26
METODOLOGÍA.....	27
1. Área de Estudio.....	27
2. Material Explante.....	27
3. Técnicas <i>in vitro</i>	29
4. Tratamientos.....	33
5. Selección y Desinfección del material explante.....	36
6. Siembra de Explantes.....	38



7. Subcultivo a Medio de Regeneración.....	40
8. Análisis de los Datos.....	40
RESULTADOS.....	41
1. Adición de 2,4-D al Medio.....	44
2. Adición de L-Triptófano al Medio.....	48
3. Optimización del Medio de Cultivo.....	58
3.1. Optimización con Agua de coco.....	58
3.2. Optimización con Sacarosa Reactivo.....	66
4. Deshidratación.....	66
DISCUSIÓN.....	70
1. Calogénesis.....	72
2. Importancia de la Auxina en el Medio.....	74
3. Optimización con Agua de coco.....	80
4. Optimización con Sacarosa Reactivo.....	82
5. Deshidratación.....	83
6. Factores Físicos.....	84
CONCLUSIONES.....	85
RECOMENDACIONES.....	87
BIBLIOGRAFÍA.....	89
GLOSARIO.....	96
ANEXOS.....	98



INDICE DE FIGURAS

Figura No.	Página No.
1 Vista General del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Escuela de Biología.....	28
2 Cámara de Flujo Laminar.....	28
3 Preparación de Medios de Cultivo	
4 MS básico más modificaciones.....	30
5 Homogenización del Medio de Cultivo.....	31
6 Decantado de 15ml de Medio de Cultivo en Frascos Gerber.....	31
7 Esterilización del Medio de Cultivo en un Autoclave de mesa.....	32
8 Preparación de Material de Siembra.....	32
9 Selección del Material Explante.....	37



Figura No.	Página No.
10 Descortezado de los Granos de Apariencia sana.....	37
11 Extracción del Embrión Cigótico Maduro De cada Grano de Arroz.....	39
12 Siembra del Material Explante (embrión) en el Medio de Cultivo.....	39
13 Formación del callo en condiciones de Oscuridad.....	41
14 Selección de callos a Medio de Regeneración.....	41
15 Fraccionamiento del Callo.....	42
16 Subcultivo a Medio de Regeneración.....	42
17 Callos a Medio de Regeneración en condiciones De 16 horas luz.....	43
18 Estantes de Almacenamiento.....	43



19	Porcentaje de callogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 1mg/L de 2,4-D.....	46
20	Porcentaje de callogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 2mg/L de 2,4-D.....	47
21	Porcentaje de callogénesis y de callos a Medio de Regeneración resultantes, del Tratamiento con 1mg/L 2,4-D+ 20 μ m/L de L-Triptófano.....	50
22	Porcentaje de callogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 2mg/L 2,4-D+ 20 μ m/L de L-Triptófano.....	51
23	Porcentaje de callogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 1mg/L 2,4-D+ 40 μ m/L de L-Triptófano.....	53
24	Porcentaje de callogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultante del Tratamiento con 2mg/L 2,4-D+ 40 μ m/L L-Triptófano.....	54



Figura No.	Página No.
25 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 1mg/L 2,4-D + 60µm/L L-Triptófano.....	56
26 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 2mg/L 2,4-D + 60µm/L L-Triptófano.....	57
27 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 1mg/L 2,4-D + 20µm/L L-Triptófano + 5ml/L agua de coco.....	60
28 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 1mg/L 2,4-D + 20µm/L L-Triptófano + 10ml/L agua de coco.....	61



<p>29 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio De Regeneración, resultantes del Tratamiento Con 2mg/L 2,4-D + 20μm/L L-Triptófano + 5ml/L de agua de coco.....</p>	63
<p>30 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio De Regeneración, resultantes del Tratamiento Con 2mg/L 2,4-D + 20μm/L L-Triptófano + 10ml/L de agua de coco.....</p>	64
<p>31 Comparación entre los Porcentajes de calogénesis y Callos a Medio de Regeneración de las combinaciones Para el Tratamiento con agua de coco.....</p>	65
<p>32 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio De Regeneración, resultantes del Tratamiento Con 1mg/L 2,4-D + 20μm/L L- Triptófano + Azúcar Reactivo.....</p>	67
<p>33 Porcentaje de calogénesis y de callos a Medio de Regeneración, resultantes del Tratamiento con 2mg/L 2,4-D + 20μm/L L-Triptófano + Azúcar Rc.....</p>	68



INTRODUCCION

ANTECEDENTES

A mediados del siglo XIX el conocimiento de la teoría celular, inició el interés por definir la relación funcional de un tejido con otro y de investigar el potencial desarrollo de las células aisladas de las plantas (Lindsey y Jones 1992). En 1975 Duhamel, realiza el primer descubrimiento en la formación de callos que aparecen como respuesta natural de las plantas ante una herida o lesión; y la subsecuente aparición de brotes en la zona basal del área afectada (Gautheret 1992). Para 1838, Schleiden y Schwan, trabajan simultáneamente con células animales y vegetales, determinando la capacidad celular de autonomía y totipotencialidad. Las células somáticas no están destinadas a la producción de un individuo completo, su totipotencia, aunque postulada por la teoría celular, no presentaba los métodos experimentales capaces de corroborar dicha afirmación. Su demostración requería de dos etapas: primero, la multiplicación a partir de una sola célula; y segundo, la transformación de la misma dando lugar a un organismo completo. El primer

paso se logró en 1954 y el segundo se alcanzaría once años después (Gautheret 1992).

Estos logros tardaron varios años desde los trabajos de Duhamel, y requirieron de la visión de muchos investigadores. Trécul (1853), realizó experimentos en la formación natural de callos, trabajó con especies arbóreas como *Robinia*, *Pawlonia*, *Ulmus*; comprobando que el tejido de regeneración provenía no sólo del cambium (observado por Duhamel en sus investigaciones), sino también del floema, de partes jóvenes del xilema e incluso de los rayos medulares. Vochting (1878), trabajando de forma similar, enfocó su atención en la polaridad que caracteriza el desarrollo de los fragmentos vegetales. Esto último fue confirmado por Goebel en 1902, en apoyo al principio de totipotencia. Sachs (1880-1882) promulgó una teoría general que establecía la existencia de sustancias que intervienen en la formación orgánica y se disponen polarmente en la planta; afirmación que fue respaldada por Wiesner en 1884. Para 1893, Recharging determinó el tamaño mínimo que debía presentar un explante, para permitir la división celular (Gautheret 1992).

Finalmente en 1902, el botánico alemán Haberlandt, estableció el primer concepto de la técnica del cultivo de tejidos, afirmando que los resultados al

cultivar células vegetales aisladas de plantas superiores en soluciones nutritivas simples, conducirían a una importante visión del conjunto de propiedades y potencialidades que presenta la célula como organismo elemental, además de proporcionar información acerca de las interrelaciones e influencias complementarias a las que están expuestas las células de un organismo multicelular completo (Lindsey y Jones 1992).

Carrel en 1912 consiguió la proliferación indefinida de células animales. En fisiología vegetal, los progresos tardaron en aparecer. En 1934, White trabajó con raíces de tomate en un medio sencillo a base de sales inorgánicas, sacarosa y extracto de levadura. Simultáneamente Gautheret, descubrió que el tejido cambial de *Salix caprea* y *Populus alba*, podían proliferar durante varios meses tras su aislamiento aséptico; pero que su crecimiento era limitado. Durante los siguientes cinco años el reconocimiento de la auxina, ácido 3-indolácetico, permitieron realizar avances significativos. En 1939, Gautheret reseñaba la propagación del primer tejido vegetal de crecimiento ilimitado (Lindsey y Jones 1992).

Los mismos resultados fueron obtenidos a la vez por Nobécourt (1937) y White (1939). Gautheret en 1955 demostró las variaciones en las respuestas



de los cultivos con respecto a las auxinas, y observó la anérgia en los tejidos. Cuando las condiciones del uso de auxinas fue establecido correctamente, se obtuvieron los primeros cultivos de tejidos normales; éxito alcanzado por Ball (1950) con *Sequoia* y posteriormente por Henderson *et al.* (1952) con girasol (Gautheret 1992).

Durante los próximos diez años se realizaron ensayos para el establecimiento de los medios de cultivo, se comprobó la eficacia del agua de coco en la estimulación tumoral, se conoció la importancia en el balance entre auxinas y citoquininas, la acción de las giberelinas así como del ácido absísico. Murashige y Skoog (1962), al estudiar los requerimientos nutritivos en tejidos de tabaco, propusieron una fórmula que está caracterizada por la presencia de altas concentraciones de amonio (NH_4) y nitratos (NO_3), que permitían un crecimiento de cinco a siete veces mayor que con los medios utilizados anteriormente (Gautheret 1992).

Esta fórmula conocida como MS, ha sido la base para la creación de medios de cultivo modificados, como por ejemplo: entre las auxinas más utilizadas, con ácido indolacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y ácido 2,4-Diclofenoxiacético (2,4-D); con citoquininas como la Bencilaminopurina (BAP) (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994).

El Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales

El surgimiento de la Biotecnología Vegetal y su contribución e introducción en cultivares nuevos e incluso el poder prescindir de la planta en su conjunto ha traído como consecuencia los avances de la técnica de los cultivos de células de tejido vegetales y de la biología molecular (Lindsey y Jones 1992).

En los últimos 25 años han surgido nuevas y poderosas técnicas para complementar las técnicas tradicionales; actualmente se define como biotecnología, al conjunto de principios científicos e ingenieriles que se aplican a procesos de producción material a través de agentes biológicos, para obtener bienes y servicios (Arias 1990). La biotecnología vegetal es un área de la biología, que se está expandiendo rápidamente con técnicas como la fusión celular, la transferencia de embriones, técnicas de ADN recombinante, nuevas técnicas para bioprocesamiento y el cultivo de tejidos vegetales, entre otras; y este crecimiento es producto de la integración de varias disciplinas que hasta hace poco se consideraban independientes: la biología molecular, la ingeniería genética, la fitopatología, la fisiología vegetal, por mencionar algunas (Lindsey y Jones 1992)

Por cultivo *in vitro* se entiende el conjunto de técnicas y de metodologías que permiten el cultivo de partes de una planta tales como órganos, tejidos, células o simples protoplastos; en un recipiente de vidrio con sustancias nutritivas en condiciones de esterilidad y en un ambiente controlado (Mendoza de Gyves, 1994).

Existen dos vías morfogénicas para alcanzar la regeneración de una planta a través de un explante: La morfogénesis directa, la cual se realiza a partir del propio explante (generalmente tomado de los meristemas sin diferenciación) y su inducción al proceso de organogénesis, dando lugar a la formación de raíz (rizogénesis) o brotes (caulogénesis); o bien se puede inducir la formación de embriones somáticos a partir de células somáticas. Por otro lado, la morfogénesis indirecta, consiste en la formación previa de un callo que puede considerarse como la desdiferenciación de un tejido organizado (Lindsey y Jones 1992); y posteriormente ser inducidos los procesos de organogénesis o de embriogénesis. Así mismo por ésta vía se puede mantener un subcultivo de callos indefinidamente. Ambas rutas tienen como objetivo final la regeneración de una planta completa (Kuan y Ospina 1990) (Anexo 1).

Entre las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales, hay varias que pueden ser aplicadas conjuntamente, permitiendo así que los logros alcanzados en un área de investigación dependan en gran medida del éxito en otras áreas (Smith y Drew 1990). Las técnicas están enfocadas al mantenimiento de la estabilidad genética, son especialmente valiosas para acelerar los métodos convencionales de cultivo y propagación, reduciendo las necesidades de espacio y trabajo (Lindsey y Jones 1992). Smith y Drew en 1990 identifican ocho técnicas como las de mayor aplicación: a) Cultivo de embriones, b) Cultivo de meristemos, c) Micropropagación, d) Variación somaclonal, e) Selección *in vitro*, f) Cultivo de anteras, g) Cultivo de protoplastos, h) Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es el proceso mediante el cual las células somáticas haploides y diploides, se desarrollan hacia plantas diferenciadas a través de los estados embriogénicos característicos pero sin la fusión de gametos. Este proceso ocurre de forma natural en numerosas especies, tanto en tejidos reproductivos como en tejidos somáticos (Williams y Maheswaran 1986).

Los primeros resultados a favor de esta teoría, fueron obtenidos simultáneamente por Reinert y Steward *et al.* en 1958; estos investigadores



lograron inducir la formación de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994).

En todos los sistemas, las células embriogénicas presentan una serie de características similares a las células meristemáticas de rápida división lo que incluye un tamaño pequeño, contenido citoplasmático denso, núcleo alargado con nucleolo prominente, pequeñas vacuolas y presencia de gránulos de almidón; sus propiedades histoquímicas y ultraestructurales sugieren una síntesis intensiva de ADN y gran actividad metabólica. Para la embriogénesis indirecta, via callo o suspensión celular, se crea un grupo compacto de células embriogénicas conocido como el complejo proembrional, del cual se desarrollan los embriones (Williams y Maheswaran 1986).

Con sus trabajos, Williams y Maheswaran (1986), así como Zimmerman (1993); han demostrado que en varios aspectos los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos. En general estos dos métodos son morfológicamente idénticos desde el estado globular del embrión, en adelante. Pueden presentarse diferencias en el número de células o en el grado de expansión de las mismas en diferentes estadios; los embriones

somáticos pueden presentar patrones de segmentación temprana un tanto desiguales a los embriones cigóticos, así como pueden formar un número mayor de cotiledones con respecto a lo normal, o la fusión de los mismos.

Medios de Cultivo

Un medio de cultivo incluye macroelementos (C,H,O,N,P,K,S,Ca,Mg) y microelementos (B,Zn,Mn,Cu,Mo,Fe,Cl) en concentraciones adecuadas. Varios de éstos tienen diferentes formas de ser asimilados por el tejido explante. Dado que pueden surgir problemas de toxicidad para el explante, debe controlarse la concentración de éstos elementos por ajustes de pH (Kuan y Ospina 1990; Krikorian 1991).

Los carbohidratos utilizados en los medios de cultivo como fuente de carbono para la célula vegetal son sacarosa (sucrosa), dextrosa (glucosa) y fructuosa. En algunos casos, el uso de sorbitol y de manitol es para mantener la presión osmótica del medio (Kuan y Ospina 1990). Las vitaminas son parte del complejo de nutrientes requeridos en el medio de cultivo y favorecen el crecimiento celular, entre ellas están : Tiamina (B₁), Piridoxina (B₆), ácido nicotínico (B₃), ácido pantotéico complementado con calcio (B₅), Cobalamina

(B₁₂) (Kuan y Ospina 1990; Krikorian 1991). Los reguladores de crecimiento en el medio de cultivo son determinantes para el metabolismo de las células vegetales, ya que en poca cantidad pueden inducir, inhibir o cambiar la fisiología y morfología de las plantas (Dixon 1987).

En 1978, Kohlenbach, continuando estudios realizados por Halperin y Wetherell (1964), y el de otros investigadores; concluyó que la presencia de auxinas en el medio, si bien es de importancia para la inducción de la embriogénesis, la presencia de altas concentraciones en ciertas etapas del desarrollo embrional no permitía la formación normal de los embriones, dando lugar a estructuras sin una clara definición morfológica que le dan al callo un aspecto nodular. Estas estructuras se caracterizan por pequeñas células superficiales con citoplasmas densos, con tendencia a un crecimiento desorganizado. El mismo autor realizó estudios con el segundo requisito esencial de la embriogénesis que es el suministro suficiente de nitrógeno en forma de amonio (NH₄) y nitrato (NO₃); también se puede complementar con las concentraciones de nitrógeno orgánico provisto por aminoácidos tales como la glutamina y alanina, la caseína hidrolizada o por el agua de coco (Abdelnour-Esquivel y Escalant 1994). Las citoquininas se han descrito como inhibidoras del

proceso de embriogénesis somática, aunque algunos estudios demuestran que ésta afirmación no puede generalizarse, como en el caso del arroz (*Oryza sativa L.*), (Kolenbach 1978).

Monnier(1974), estudiando diversos factores observó que la fuente principal de carbohidratos para embriones, era la sacarosa, cuyas concentraciones varían de acuerdo al tamaño del embrión cuando es extraído. Notó la supresión en el crecimiento de la raíz con el uso de kinetina, y la formación de embriones largos y delgados al usar giberelinas en los medios de cultivo.

Entre los factores físicos, Abdelnuor-Esquivel y Escalant (1994), detallan a nivel general la influencia de éstos factores sobre el cultivo de tejidos vegetales. El pH por ejemplo, es específico para cada tipo de planta, por lo que es necesario ajustarlo a los requerimientos de la especie en estudio; sin embargo, el pH adecuado puede oscilar en un rango de 4.5 a 7 para las plantas.

La intensidad y calidad de la luz es muy baja, se recomienda mezclar diferentes tipos de luz en una misma sala para tener diferentes longitudes de onda. Con respecto a la temperatura, ésta se puede fijar en función del tiempo,

ya sea de acuerdo con los períodos de luz y oscuridad o por horas (Kuan y Ospina 1990). Usualmente la temperatura del cuarto de cultivo se mantiene alrededor de los 25 C. Algunas especies pueden requerir variaciones en la temperatura de acuerdo a su tratamiento y para un mejor crecimiento (Dixon 1987).

La mayoría de las investigaciones se han enfocado en definir el adecuado medio de cultivo para cereales y muy pocos han considerado el efecto del intercambio de gases alrededor del cultivo. En los sistemas relacionados con la formación de callos en cereales, el intercambio directo de gases entre el tejido y el aire, está limitado por las envolturas de protección colocadas alrededor del recipiente como prevención a la contaminación microbacteriana y para reducir la deshidratación. La cantidad de tejido presente, el tamaño del tejido vegetal utilizado como explante, el tamaño del recipiente y las condiciones del cultivo; incluyendo temperatura y densidad de luz, son factores que influyen sobre las distintas respuestas morfogénicas. Bajo estas condiciones la acumulación de gases puede afectar los tejidos en desarrollo, tanto promoviendo crecimiento y diferenciación; así como, en el caso de otras



emisiones volátiles, se ha demostrado que pueden retardar el crecimiento y promover necrosis (Adkins *et al.* 1990; Adkins 1992).

Otros Componentes

El dióxido de carbono en grandes concentraciones está presente en el cultivo de varias especies, asociado generalmente con el etileno (Zobel 1987, citado por Adkins 1992). Estas altas concentraciones tienen efecto sobre la respiración; la fotosíntesis y por lo tanto en el crecimiento del tejido vegetal. En cultivo de meristemos, la proliferación de brotes es promovida por la presencia de CO_2 , posiblemente por su acción en la fotosíntesis (Infante *et al.* 1989; Righette *et al.* 1990, citados por Adkins 1992); sin embargo, en callos heterotróficos y cultivos celulares, altas concentraciones de CO_2 a menudo inhibe la proliferación de brotes y no tiene efecto alguno sobre el crecimiento, tal como se evidenció en experimentos con *Daucus* y *Catharantes* (Tate y Page 1991, citados por Adkins 1992).

En arroz, el intercambio de gases en la atmósfera envolvente puede ser afectado por las condiciones ambientales del cultivo especialmente por la temperatura y la luz; los cultivos de callos creciendo en condiciones estandar

sobre un medio de proliferación puesto en cajas Petri, utilizan oxígeno y producen dióxido de carbono y etileno; en un estudio realizado con el cultivar de arroz indica IR42, se encontró un 5% de oxígeno, 12% de CO_2 y 12ppm de etileno. El agotamiento del oxígeno conjuntamente con la mayor producción de dióxido de carbono, etileno y precursores de acetaldehídos, se traduce a una reducción en el crecimiento del tejido y a una necrosis progresiva del mismo (Adkins 1992).

Investigaciones en Arroz

La regeneración en las plantas de arroz, ha sido obtenida en cultivo *in vitro* de tejidos vegetales a partir de callos inducidos a través de: a) Apices radicales de arroz con la acción del 2,4-D (Yatasawa *et al.* 1967); b) Embriogénesis somática (Williams y Maheswaran 1986); c) Via protoplastos en genotipos de arroz indica, por ser cultivares importantes como fuentes de alimento en regiones tropicales (Lee *et al.* 1989; Wang *et al.* 1989; Yin *et al.* 1993); d) Cultivo de anteras (Arias 1990); e) Utilizando protoplastos de tejidos aislados de la base foliar (Gupta y Pattanayak 1993).



Varias investigaciones han demostrado que la inducción callogénica y la regeneración de plantas de arroz, es posible controlarlas genéticamente, tal es el caso de trabajos como los realizados por Siriwardana y Murray (1983); Chowdry *et al.* (1993); Mitsuoka *et al.*(1994); así como los realizados por Sivamani *et al.* (1996).

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACION

El Cultivo del Arroz

El cultivo de arroz es de vital importancia en El Salvador, ya que es un grano básico de la dieta alimenticia de su población. A nivel mundial, los cereales constituyen la fuente primaria de calorías y proteínas, más del 52% del alimento mundial son derivados de cereales tales como el trigo, arroz, maíz, cebada, avena, entre otros (Paniagua y Portillo 1989).

El arroz (*Oryza sativa* L.), ocupa el segundo lugar en el consumo mundial, después del trigo, siendo el alimento básico para aproximadamente la mitad de la población mundial. Este grano no es muy rico en vitaminas, no obstante, la industria ha elaborado el arroz enriquecido para corregir esa deficiencia. Sus elementos constituyentes son el agua (10 a 14%), proteínas (5 a 10%), grasas (0.3 a 0.6%), carbohidratos (73 a 81%) y fibras en un 0.2 a 1%. El contenido de proteínas es menor que en el trigo y el maíz, a pesar de ello su valor nutritivo es alto (Parsons *et al.* 1982).



Descripción Botánica

Es una gramínea anual de crecimiento determinado, su sistema radicular comprende las raíces seminales o temporales y las adventicias o permanentes; alcanza alturas entre 50 y 150 centímetros. Algunas especies presentan dormancia, lo cual según algunos autores, es más notorio en la subespecie indica (Parsons *et al.* 1982).

El tallo está formado por una serie de nudos y entrenudos. El nudo lleva una hoja y una yema que puede desarrollarse o constituirse en un hijo. El entrenudo maduro es hueco y de longitud variable, aumentando desde los inferiores a los superiores. Las flores de la planta de arroz están agrupadas en una inflorescencia llamada panícula (Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, CENTA 1995, Anexo 2).

Requerimientos de clima y suelo

El arroz es una de las plantas más adaptables a diversas condiciones ambientales, como es el clima, el CENTA (1995) hace notar que este cultivo se adapta de 0 a 800 msnm y en las regiones tropicales puede adaptarse hasta los 1500 msnm. Las temperaturas óptimas generalmente oscilan entre 20 y 30 C;

aunque algunos investigadores sugieren que puede germinar aún a 12 C, esto varía de acuerdo al estado de desarrollo de la planta; sin embargo, el requerimiento más crítico en su producción es la disponibilidad de agua. Con respecto al suelo, puede crecer en condiciones arenosas hasta suelos pesados de textura franco arenosa, incluyendo aquellos con problemas de drenaje interno y externo. Existen varios genotipos cada uno de los cuales se adaptan a una región en especial; estas variedades pertenecen a los siguientes grupos y razas geográficas: -Grupo *indica*, -Grupo *japonica*, -Grupo *javanica* (Parsons *et al.* 1982).



Situación del Cultivo de Arroz en El Salvador

Los fenómenos naturales en nuestro país se caracterizan por presentar variaciones abruptas; de sequía extrema a prolongadas inundaciones y viceversa, causando todo esto daños a las cosechas y por consiguiente permite la proliferación de plagas y enfermedades las cuales causan grandes pérdidas monetarias al agricultor; es en este sentido que los países de Centroamérica están actualmente realizando esfuerzos tendientes a mejorar las condiciones de tecnología y producción (Paniagua y Portillo 1989).

Debido a que el sector agropecuario ha experimentado cambios dramáticos en el área política y comercial a partir de 1989, el peso del sector en términos económicos ha disminuido significativamente; sin embargo, en términos de impacto social sigue siendo importante (CENTA 1995).

El CENTA como instituto generador de tecnología para el agricultor, ha evaluado diversas variedades como lo son: X-10, CICA-4, CICA-6, NILO-1, NILO-3, MASOL-1 y CENTA-1; que fueron recomendadas en El Salvador para 1981 (CENTA 1981) (Características Básicas de las Principales Variedades de Arroz Recomendadas en El Salvador, 1981 Anexo 3). Con la base tecnológica y la capacidad de los competidores para aprovechar el recurso, debido a que algunas variedades recomendadas en 1981 se tornaron susceptibles a enfermedades; en 1993 la variedades recomendadas por el CENTA fueron: CENTA A-1, CENTA A-2, CENTA A-3, CENTA A-4, CENTA A-5, CENTA A-6, con lo que se pretende aumentar el rendimiento por unidad de área (CENTA 1995) (Cuadro: Características Agronómicas de las Variedades de Arroz Recomendadas por CENTA para El Salvador 1993, Anexo 4).



Para 1997 las variedades recomendadas por el CENTA, y con mayor demanda por el agricultor, son las variedades CENTA A-5 y CENTA A-6; esto es producto sin duda de sus características agronómicas de muy buen vigor, resistencia al acame, desgrane, resistencia a *Pyricularia* hoja y *Pyricularia* cuello, además de su rendimiento de 138 y 140 QQ/Mz respectivamente (Servellón 1997. Comunicación personal).¹

Aplicación de Biotécnicas

La aplicación de las biotécnicas en la agricultura se pueden enmarcar en el mejoramiento nutritivo y de calidad de las plantas, mediante el enriquecimiento de sus condiciones protéicas, forma, color, textura, entre otras; lo mismo que en el desarrollo de la capacidad genética de las plantas para conferirles resistencia a plagas y enfermedades; así como también, en el desarrollo de plantas en condiciones adversas de la naturaleza (Mendoza de Gyves 1994).

Las técnicas de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permitirán en forma más exacta los cambios requeridos por las plantas para obtener un mejor desarrollo. Esto implicará, por una parte, incrementos sustanciales en los

¹ Ing. Ramón Eduardo Servellón, Sección de Fitomejoramiento. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal, CENTA.

rendimientos por unidad de superficie, reducciones importantes en los costos de producción por incremento en la productividad; así como, por economías en los costos de fertilización y control químico de plagas y enfermedades (Mendoza de Gyves 1994).

En el caso del arroz, fué el primer cereal con el que se iniciaron las investigaciones con la aplicación de biotécnicas. El cultivo *in vitro* de tejidos de arroz, comenzó en Japón en los años sesenta, siendo en 1964 cuando se obtuvo por primera vez la inducción de callos por Furashashi y Yatazawa (citados por Arias 1990). El cultivo *in vitro* de tejidos vegetales permite realizar la selección genética en el laboratorio, reduce los costos en programas de evaluación de campo ya que se realizan en cortos períodos de tiempo, permitiendo a la vez el establecimiento de bancos de germoplasma.

Dentro de las técnicas de cultivo *in vitro* más utilizadas en arroz, la embriogénesis somática presenta varias ventajas. Desde los primeros resultados de esta técnica al inducir la formación de embriones somáticos a partir de raíces de zanahoria, hace más de treinta y cinco años por Steward y Reinert, esta técnica ha sido reconocida como una importante vía de

regeneración a partir de sistemas de cultivos celulares, así como un modelo potencial para estudiar los eventos morfogénicos y regulatorios que ocurren en los estadios embrionarios; comprendiéndose así la regulación en la expresión de genes en las etapas primarias del desarrollo del cigoto fertilizado hacia el embrión maduro (Zimmerman 1993). A pesar que los cereales son un grupo reconocido como "recalcitrantes" para su manipulación en el laboratorio; grandes avances se han logrado en la utilización de esta técnica en arroz (Sivamani *et al.* 1996). Para Rueb, 1992, la suspensión de células embriogénicas ha sido seleccionada por la gran capacidad de división celular obtenida, aún cuando el establecimiento de tales cultivos es laborioso, la embriogénesis somática resuelve el problema de pérdida de la capacidad de regeneración de estas plantas.

La técnica de embriogénesis somática en *Oryza sativa* L , ha sido ampliamente estudiada a partir del cultivo de meristemas, raíz, embriones maduros e inmaduros, o través de protoplastos y mediante los estadios tempranos de la inflorescencia; cada uno de ellos ha reportado evidencias morfogénicas e histológicas de dicha técnica, como lo es la iniciación de



embriones somáticos en células del epitelio escutelar del grano de arroz, así como, el desarrollo anatómico del embrión maduro (Jones y Rost 1989).

Williams y Maheswaran en 1986, evidenciaron a través de ésta técnica, que para una embriogénesis indirecta, vía callo o suspensión celular, los reguladores de crecimiento son requeridos no solamente en la desdiferenciación de las células del material explante, sino también en la determinación del estado embrional; sugiriendo con esto, la necesidad del balance entre auxinas y citoquininas para una mayor regeneración de plantas.

En la década pasada, grandes investigaciones se han llevado a cabo con arroz, siendo el propósito el establecer un sistema eficiente y confiable de transformación genética. Actualmente dos técnicas están siendo las más utilizadas: a) Electroporación de protoplastos, y b) Bombardeo de microproyectiles a embriones inmaduros o callos embriogénicos. Ambas han generado buenos resultados en la transformación de subespecies japónicas de arroz; recientemente la transformación por *Agrobacterium*, provee una técnica alternativa para la transformación de protoplastos. Sin embargo es el método de biobalística el más utilizado ya que reduce el tiempo de regeneración de las

plantas transformadas y proporciona una alta fertilidad de las mismas (Sivamani *et al.* 1996).

En contraste con las variedades japónicas, las subespecies indicas de *Oryza sativa* ; a pesar de tener una mayor importancia económica por su gran consumo a nivel mundial y ser las predominantes en nuestros países, presentan una mayor dificultad en su transformación, debido a que su capacidad de regeneración es mucho más baja. Aún cuando algunos estudios han tenido éxito con estas variedades, no han gozado de gran popularidad; ya sea por la complejidad de la técnica utilizada o por la baja productividad de la misma. Al no haber un protocolo de cultivo de tejido propio para el desarrollo y regeneración de callos para variedades indicas de arroz; ajustes en las condiciones del cultivo llevarán a optimizar la inducción de callos, su propagación y la regeneración de plantas diferenciadas (Sivamani *et al.* 1996).

Es con base a lo anterior y conociendo lo importante que es para el país, fomentar investigaciones que nos permitan alcanzar y dominar las técnicas actuales de desarrollo; que éste estudio básico se llevó acabo, sentando las



bases para posteriores trabajos que evalúen puntualmente los resultados aquí obtenidos.



OBJETIVOS

GENERAL

- Evaluar la capacidad de regeneración en condiciones de laboratorio, de algunos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.).

ESPECIFICOS

- Examinar modificaciones al medio de cultivo utilizado para la inducción callogénica y regeneración de plantas, de algunos genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.).
- Describir el proceso de embriogénesis somática en arroz (*Oryza sativa* L.).
- Describir el crecimiento del tejido calloso a partir del explante utilizado.
- Determinar las condiciones de formación de callos y de regeneración de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.).
- Optimizar mediante la adición al medio de cultivo, de "agua de coco" y sacarosa reactivo, el proceso de formación de callos morfogénicos.
- Fomentar la investigación biotecnológica para el desarrollo científico en El Salvador.



METODOLOGIA

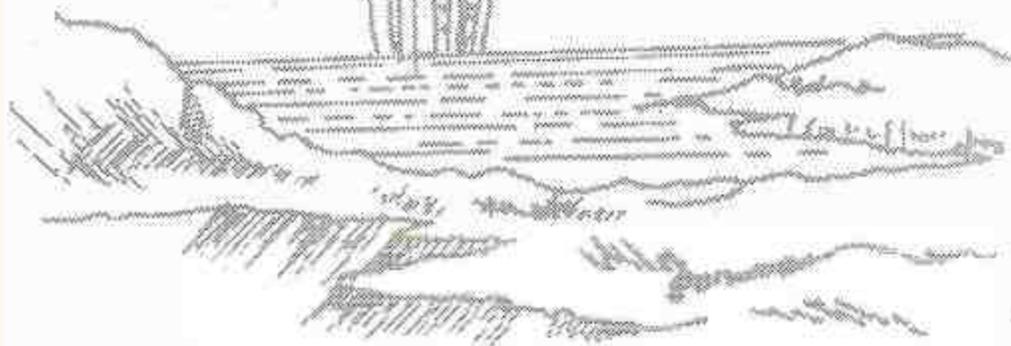


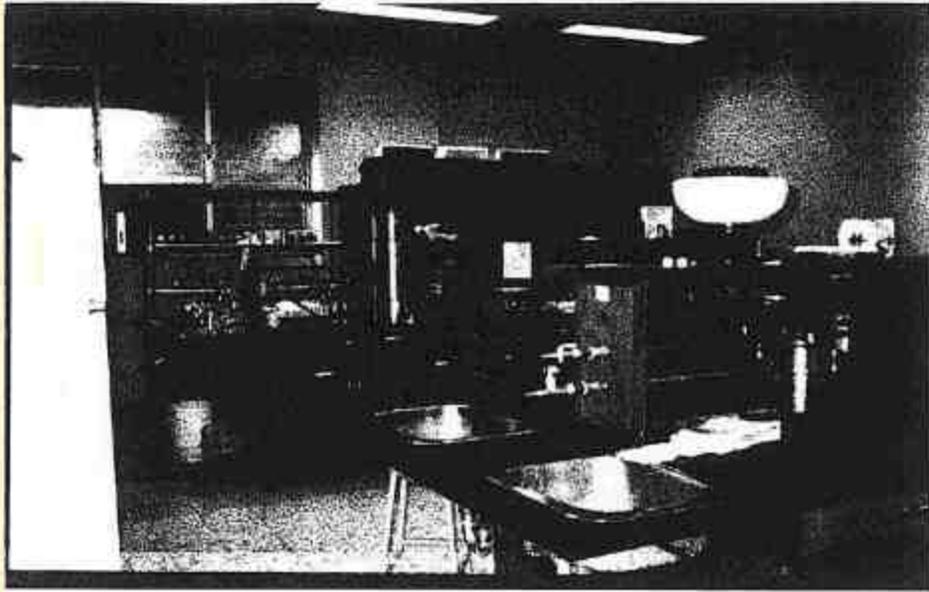
AREA DE ESTUDIO

El trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales de la Escuela de Biología, Universidad de El Salvador, ubicada en el Departamento de San Salvador, situada al final de la 25 Avenida Norte y limitada al nor-oriente por la calle Circunvalación, al sur por la Autopista Norte y calle San Antonio Abad, y finalmente al poniente por la Avenida Don Bosco.

MATERIAL EXPLANTE

Las semillas de arroz utilizadas para el desarrollo de la investigación fueron proporcionadas por el Ingeniero Ramón Eduardo Servellón del Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal (CENTA); siendo las variedades CENTA A-1, CENTA A-2, CENTA A-4, CENTA A-5, CENTA A-6, X-10, Keybonnet.





FIGURANº 1. Vista General del Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Escuela de Biología.

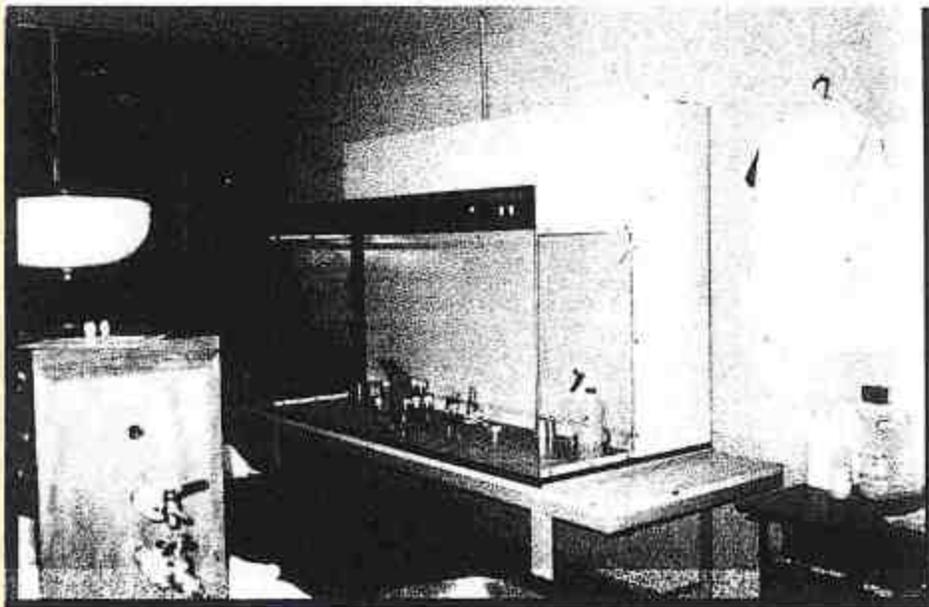


FIGURA Nº 2. Cámara de Flujo Laminar.

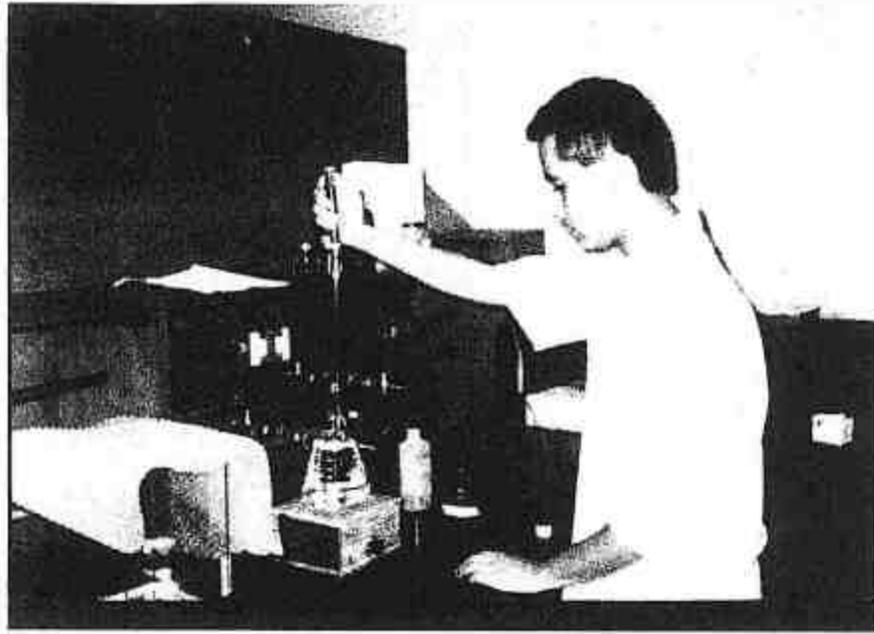
TECNICAS *IN VITRO*



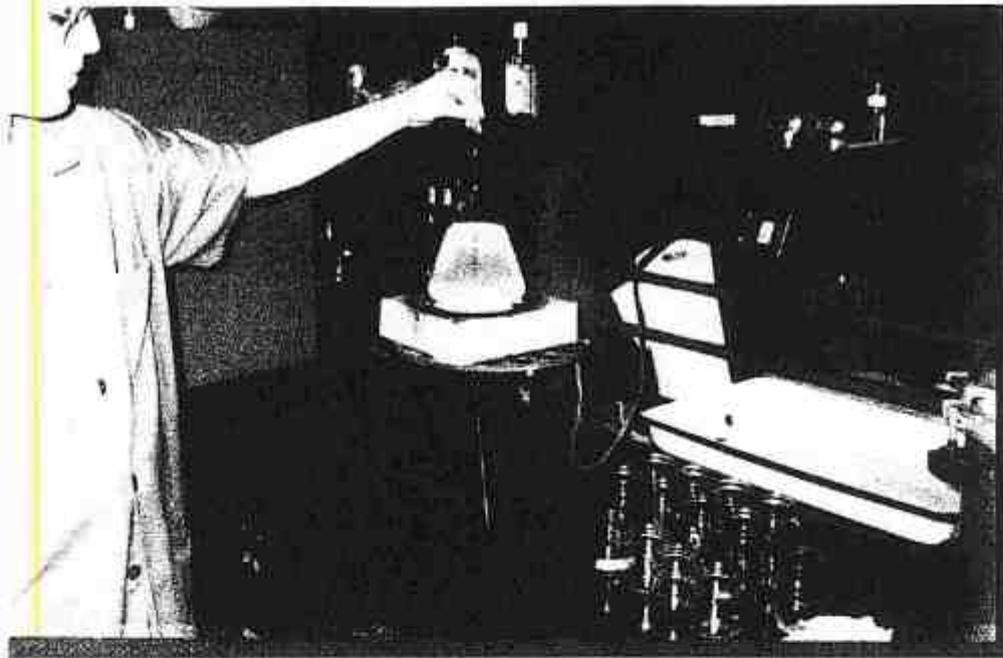
PREPARACION DE MEDIOS DE CULTIVO

Inicialmente se procedió a la preparación de todas las soluciones Stock, las cuales contienen: macronutrientes, micronutrientes, complejos vitamínicos, reguladores de crecimiento, entre otras sustancias (Anexo 5, Protocolo de Medios de Cultivo Murashige y Skoog 1962), una vez se realizaron las soluciones se colocaron en condiciones de temperatura entre los 0 y 5 C .

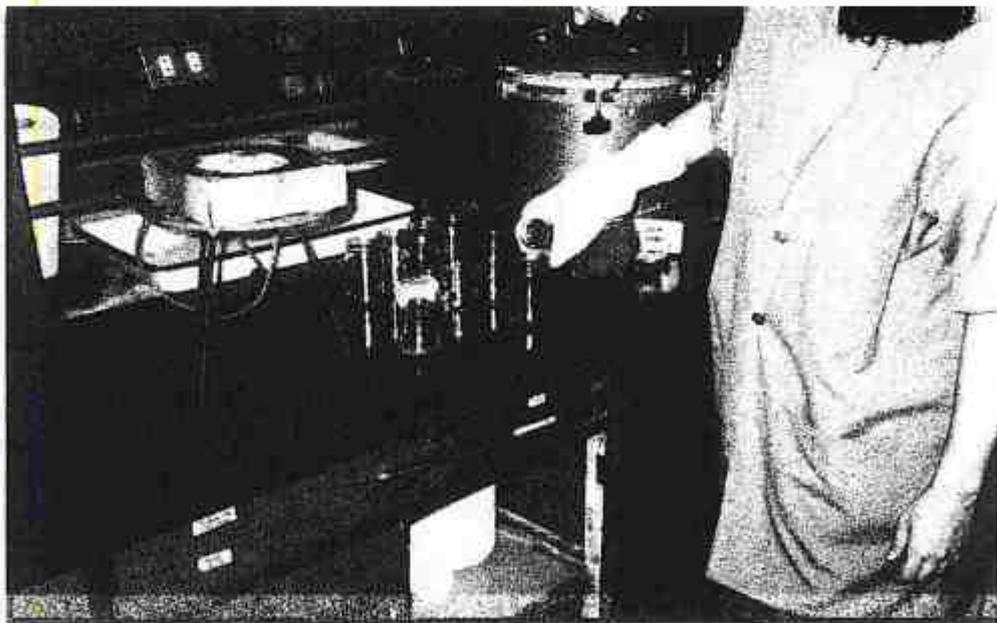
A continuación en un Erlenmeyer con capacidad de 1000 ml se adicionaron las cantidades de soluciones Stock correspondientes para preparar un litro de medio de cultivo, finalizado lo anterior se agregaron 30 gL⁻¹ de sacarosa comercial y se aforó hasta alcanzar los 1000 ml, todo lo anterior se realizó en constante agitación, posteriormente se midió el pH de la solución hasta alcanzar los 5.8, al término de esta fase y continuando la agitación del medio se adicionó 8 gL⁻¹ de Agar. Finalmente se llevó al autoclave por 20 min a 120 C y a 15 Lb de presión por pulgada cuadrada.



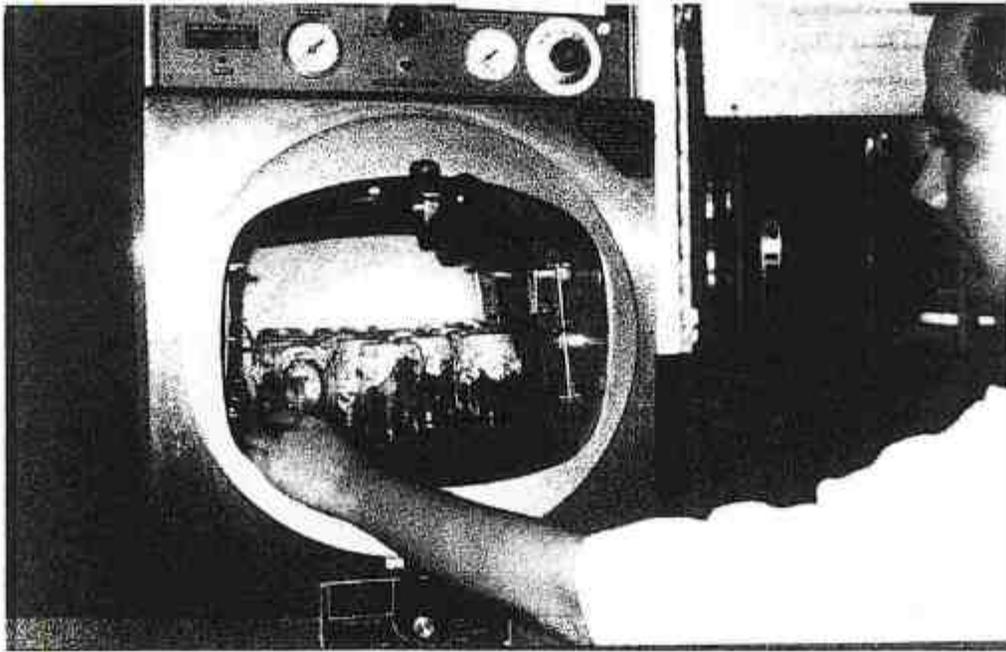
FIGURAS Nº 3 y 4
Preparación de Medios de
Cultivo, MS Básico y
sus modificaciones.



FIGURANº 5. Homogenización del Medio de Cultivo.



FIGURANº 6. Decantado de 15ml de Medio de Cultivo en frascos Gerber.



FIGURANº 7. Esterilización del Medio de Cultivo en un Autoclave de Mesa.



FIGURANº 8. Preparación de Material de Siembra.



TRATAMIENTOS

Se realizaron cinco tratamientos:

I Germinación: En éste experimento no se agregó reguladores de crecimiento al medio de cultivo, Murashigè y Skoog 1962, ya que se realizó para comprobar la viabilidad de la semilla obtenida. Se llevó acabo un solo experimento para cada variedad de arroz y los callos se colocaron en condiciones de oscuridad durante dos semanas.

II Adición al medio de cultivo de 2,4-D: El 2,4-Diclorofenoxiacético es una auxina artificial, la cual fue añadida en tres concentraciones de, 1mgL^{-1} , 2mgL^{-1} y 3mgL^{-1} , al medio básico utilizado. Se realizaron tres verificaciones de éste tratamiento, y los callos obtenidos se subcultivaron en un medio de regeneración.

II Adición de L-Triptófano: Para éste tratamiento se seleccionaron los mejores datos obtenidos con los tratamientos de 2,4-D y se conjugaron con tres concentraciones de L-triptófano, las cuales fueron de, $20\mu\text{mL}^{-1}$, $40\mu\text{mL}^{-1}$, $60\mu\text{mL}^{-1}$; para el mismo sólo se tomaron en cuenta las variedades de arroz que

habían tenido éxito con el tratamiento anterior, quedando las combinaciones, de las concentraciones de la siguiente manera:

Cuadro 1. Arreglo de tratamientos de 2,4-D y L-triptófano

2,4-D //L-Trip.	20 μ m/L	40 μ m/L	60 μ m/L
1mg/L	1mgL ⁻¹ + 20 μ mL ⁻¹	1mgL ⁻¹ + 40 μ mL ⁻¹	1mgL ⁻¹ + 60 μ mL ⁻¹
2mg/L	2mgL ⁻¹ + 20 μ mL ⁻¹	2mgL ⁻¹ + 40 μ mL ⁻¹	2mgL ⁻¹ + 60 μ mL ⁻¹

El tratamiento tuvo una repetición y los callos obtenidos se colocaron en un medio de regeneración.

IV Optimización del Medio de Cultivo:

- a) A partir del experimento anterior, se seleccionaron los mejores resultados de la combinación entre 2,4-D y L-Triptófano. Esta primera optimización del medio fue el añadir 5ml y 10ml de "agua de coco", para aumentar los niveles de nutrimentos en el medio, posteriormente se colocaron en medio de regeneración.

Cuadro 2. Arreglo de concentraciones entre 2,4-D+ L-Triptófano + "agua de coco"

2,4-D+L-Trip.//AC	5ml	10ml
$1\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1}$	$1\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1} // 5\text{AC}$	$1\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1} // 10\text{AC}$
$2\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1}$	$2\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1} // 5\text{AC}$	$2\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1} // 10\text{AC}$

b) En el siguiente tratamiento se trabajó con las mismas concentraciones de 2,4-D y L-Triptófano, que en el apartado anterior (1mg/L 2,4-D + $20\mu\text{m/L}$ L-Triptófano, y 2mg/L 2,4-D + $20\mu\text{m/L}$ L-Triptófano), manteniéndose las variedades seleccionadas. Esta nueva adición consistió en agregar 30gL^{-1} Sacarosa Reactivo en sustitución del azúcar comercial utilizada hasta el momento.

V Estrés Hídrico (Deshidratación): Como último tratamiento se seleccionó la variedad de mayor éxito durante todos los experimentos, en el cual los callos, después de haber estado durante tres semanas en medio de callogénesis, fueron fraccionados y sometidos a deshidratación durante 24 h sobre papel

filtro previamente esterilizado, y aislados en placas Petri selladas con plástico marca Plastic rap Diamond; posteriormente se colocaron en condiciones de oscuridad. Pasadas las 24 h se cultivaron en un medio de regeneración. Todos los resultados se registraron en una hoja de recolección de datos(Anexo 6).

Haciendo uso de la cámara de flujo laminar , se procedió a vaciar el medio de cultivo en frascos Gerber previamente esterilizados en el autoclave; finalizado, estos fueron debidamente sellados con tapas de papel aluminio y plástico para microondas marca Plastic rap Diamond, todo con el propósito de evitar la contaminación, se identificaron debidamente y se almacenaron en estantes secos y protegidos de la luz.



SELECCIÓN Y DESINFECCION DE MATERIAL EXPLANTE

El material explante se mantuvo entre los 0 y 5 C, luego se procedió a seleccionar y descortezar los granos de apariencia sana, inmediatamente cada variedad se colocó en un Erlenmeyer de 125 ml al cual se le agregó Hipoclorito de Sodio al 3% más dos gotas de Texapón, se mantuvieron en ésta solución por alrededor de 30 min en constante agitación, posteriormente se lavaron 5 veces



FIGURANº 9. Selección del Material Explante.



FIGURANº 10. Descortezado de los Granos de Apariencia Sana.

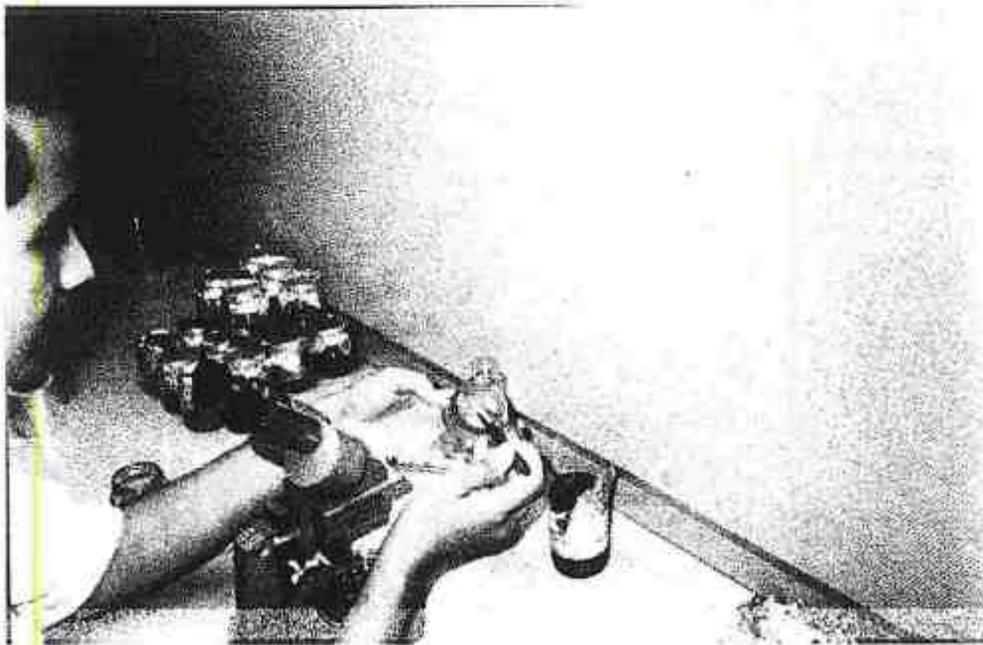
con agua destilada estéril y se dejaron en remojo durante aproximadamente 6 a 8 horas antes de proceder a su siembra.

SIEMBRA DE EXPLANTES

Haciendo uso de la cámara de flujo laminar, previamente desinfectada con alcohol 90%, con el auxilio de pinzas y bisturios esterilizados, observando a través de un microscopio estereoscopio; se procedió a extraer el embrión cigótico maduro de cada uno de los granos de arroz, como primer paso se retiró la aleurona para dejar al descubierto el embrión, el cual fue colocado de forma que la región escutelar quedara en contacto con el medio de cultivo contenido en los frascos Gerber. Se sembraron 5 embriones por frascos hasta totalizar 50 para cada una de las variedades ocupadas según tratamiento. Finalizada la siembra, cada uno de los frascos fue sellado con plástico para microondas marca Plastic rap Diamond e identificados de acuerdo al tratamiento que se realizaba. Todo el material fue puesto en estantes en oscuridad, y a temperatura de 25 a 28 C y por aproximadamente 3 semanas (Anexo 7).



FIGURANº 11. Extracción del Embrión Cigótico Maduro de cada grano de Arroz.



FIGURANº 12. Siembra del Material Explante (embrión) en el Medio de Cultivo.

SUBCULTIVOS A MEDIO DE REGENERACION

Transcurridas de tres a cuatro semanas, todo el material callogénico resultante de todos los tratamientos; fueron transferidos a un medio de regeneración Murashige y Skoog (1962) conteniendo 0.05 mgL^{-1} de ácido naftalenacético y 0.5 mgL^{-1} de benzilaminopurina depositado en frascos Gerber esterilizado de la misma forma que en el apartado anterior. Se colocaron un aproximado de 5 callos por frasco tomando en cuenta el tamaño de estos para dar lugar a su crecimiento . Se colocaron en estantes bajo condiciones de luz blanca durante 8 horas y a temperatura de 27 C por un periodo de cuatro semanas, en espera del desarrollo de las plántulas.

ANALISIS DE DATOS

Para el análisis de los datos se trabajó con estadística descriptiva como lo es la media aritmética, desviación estandar; también se calculó el porcentaje de callogénesis (Anexo 8):

$$\% \text{ callogénesis} = \# \text{ de callos obtenidos} / \# \text{ de callos sembrados}$$

y el porcentaje de callos a medio de regeneración:

$$\% \text{ a MSR} = \# \text{ de callos seleccionados a MRS} / \# \text{ de callos obtenidos}$$





FIGURANº 13. Pasadas 3 a 4 semanas de formado el callo en condiciones de oscuridad.



FIGURANº 14. Selección de Callos a Medio de Regeneración.

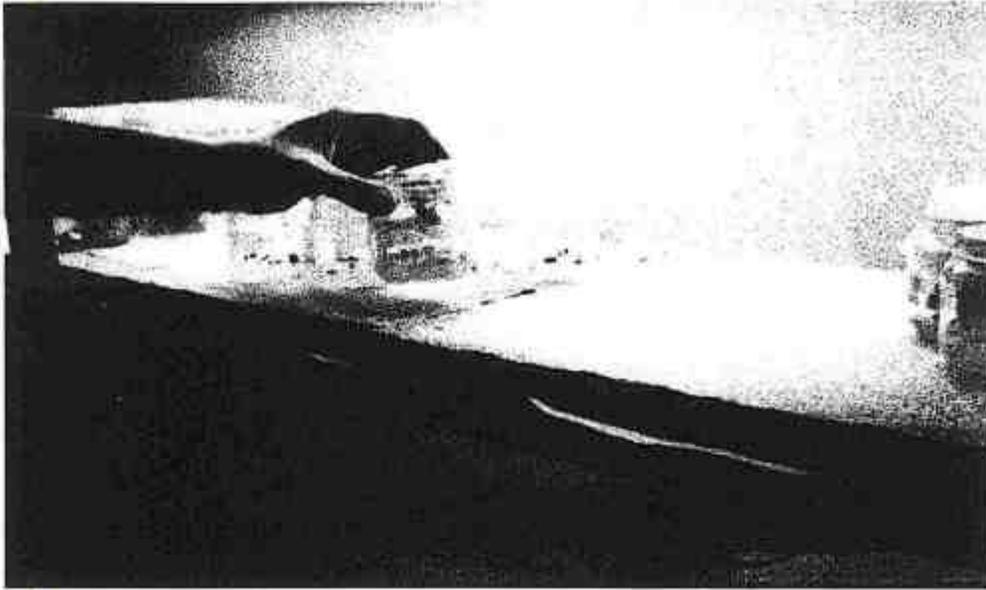




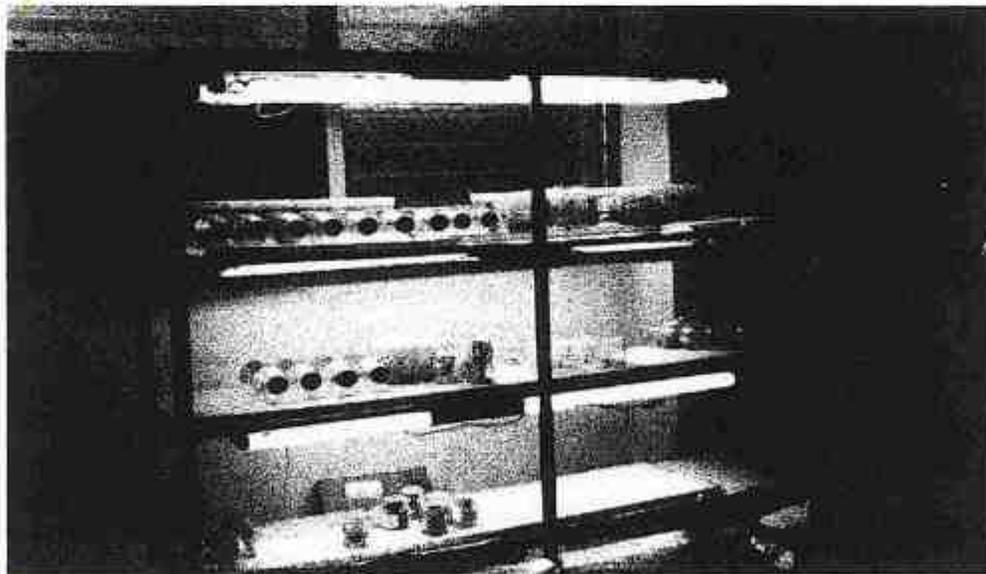
FIGURANº 15. Fraccionamiento del callo.



FIGURA Nº 16. Subcultivo a Medio de Regeneración.



FIGURANº 17. Callos a Medio de Regeneración en Condiciones de 16 horas luz.



FIGURANº 18. Estantes de Almacenamiento.

RESULTADOS

A lo largo de los distintos tratamientos se fueron observando claras diferencias en las respuestas de cada variedad a las condiciones a las que fueron sometidas. El primer tratamiento evidenció que toda la semilla utilizada era viable, cada embrión germinó en condiciones de oscuridad durante dos semanas y así mismo se comprobó que el medio proporcionaba los nutrimentos necesarios para su desarrollo. Las siete variedades fueron entonces consideradas para llevar a cabo los demás tratamientos.

Adición de 2,4-D al medio de Calogénesis

Se trabajó con tres concentraciones distintas en un rango que nos permitiera ir acortando los extremos e indicarnos cual de ellas era la mejor para la producción de callos morfogénicos dadas las condiciones del laboratorio.

Como resultado de este experimento se descartaron dos variedades ya que no hubo producción de callos con ninguna de las concentraciones utilizadas, estas variedades fueron CENTA A-2 y CENTA A-4; la primera variedad sólo

unos cuantos embriones aislados lograron producir callo pero este no llegó a desarrollarse en las semanas de duración del experimento. La segunda variedad, CENTA A-4, no presentó formación de callo alguno (el material explante se necrosó después de dos semanas) con ninguna de las concentraciones. El experimento también demostró que las mejores concentraciones para la producción de callos eran: a) 1mg/L donde las variedades CENTA A-1, CENTA A-6, X-10 y Keybonnet tuvieron una producción calogénica del 100%, siendo la variedad Keybonnet la de mayor proporción de callos a medio de regeneración con un 70%; las variedades CENTA A-2, CENTA A-4 y CENTA A-5, no desarrollaron callos para ésta concentración (Figura 19); y b) 2mgL⁻¹ con una producción de callos del 100% para las variedades CENTA A-5, CENTA A-6, X-10 y Keybonnet y un 60% para CENTA A-1, con un 70% de callos a medio de regeneración de la CENTA A-5 (Figura 20); ya que los callos obtenidos con estas concentraciones eran de mayor tamaño y de apariencia sana, no se necrosaban rápidamente, presentaban una coloración amarillo-pálido que probablemente sea un indicador de la obtención de callos morfogénicos.

La concentración de 3mg/L de 2,4-D resulta ser tóxica para los mismos, observándose principalmente una necrosis masiva del tejido. Algunas variedades como CENTA A-6 formaron callos de crecimiento normal en

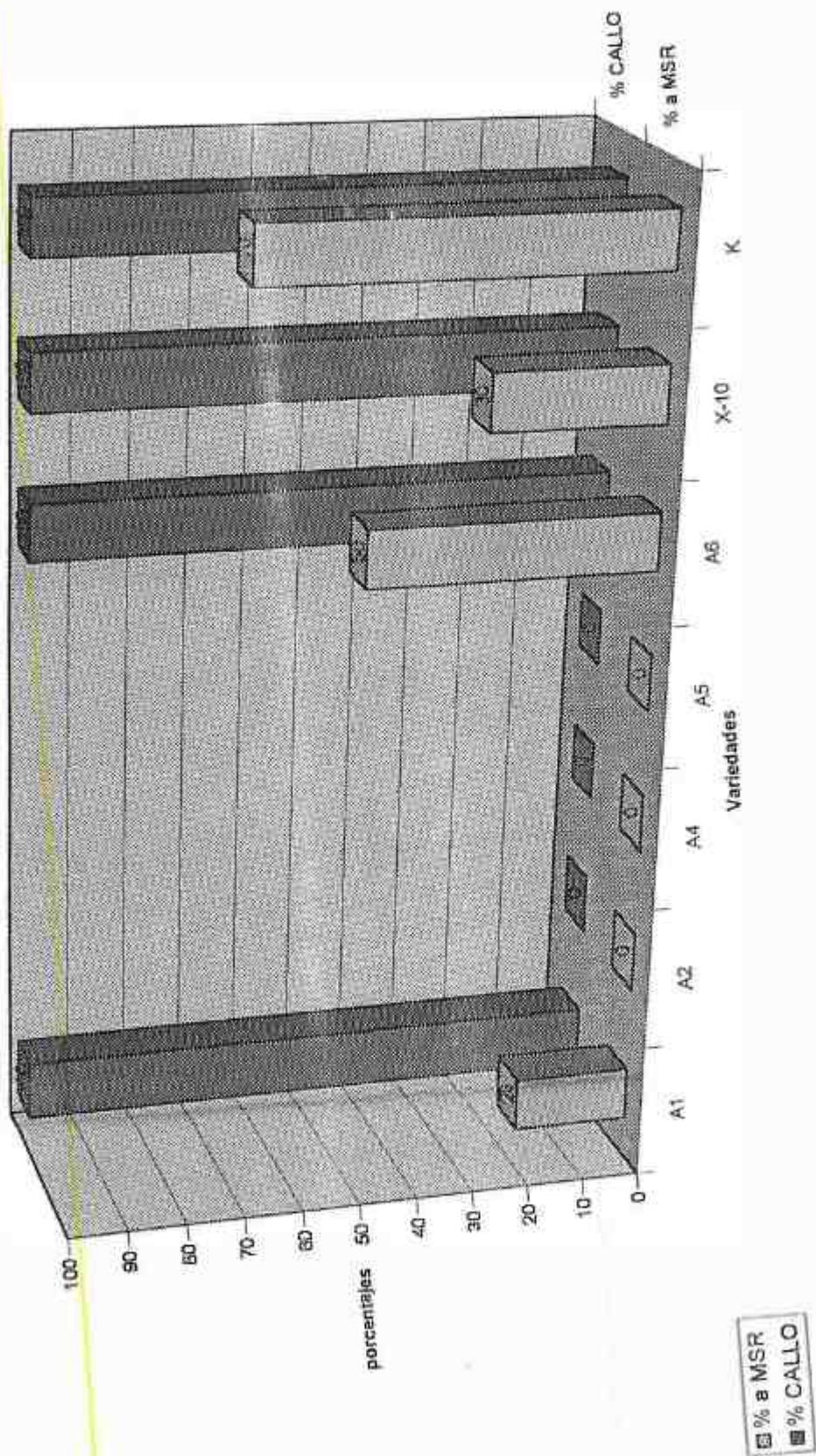


Figura 19. Porcentaje de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultados tratamiento 1 mg/L de 2,4-D

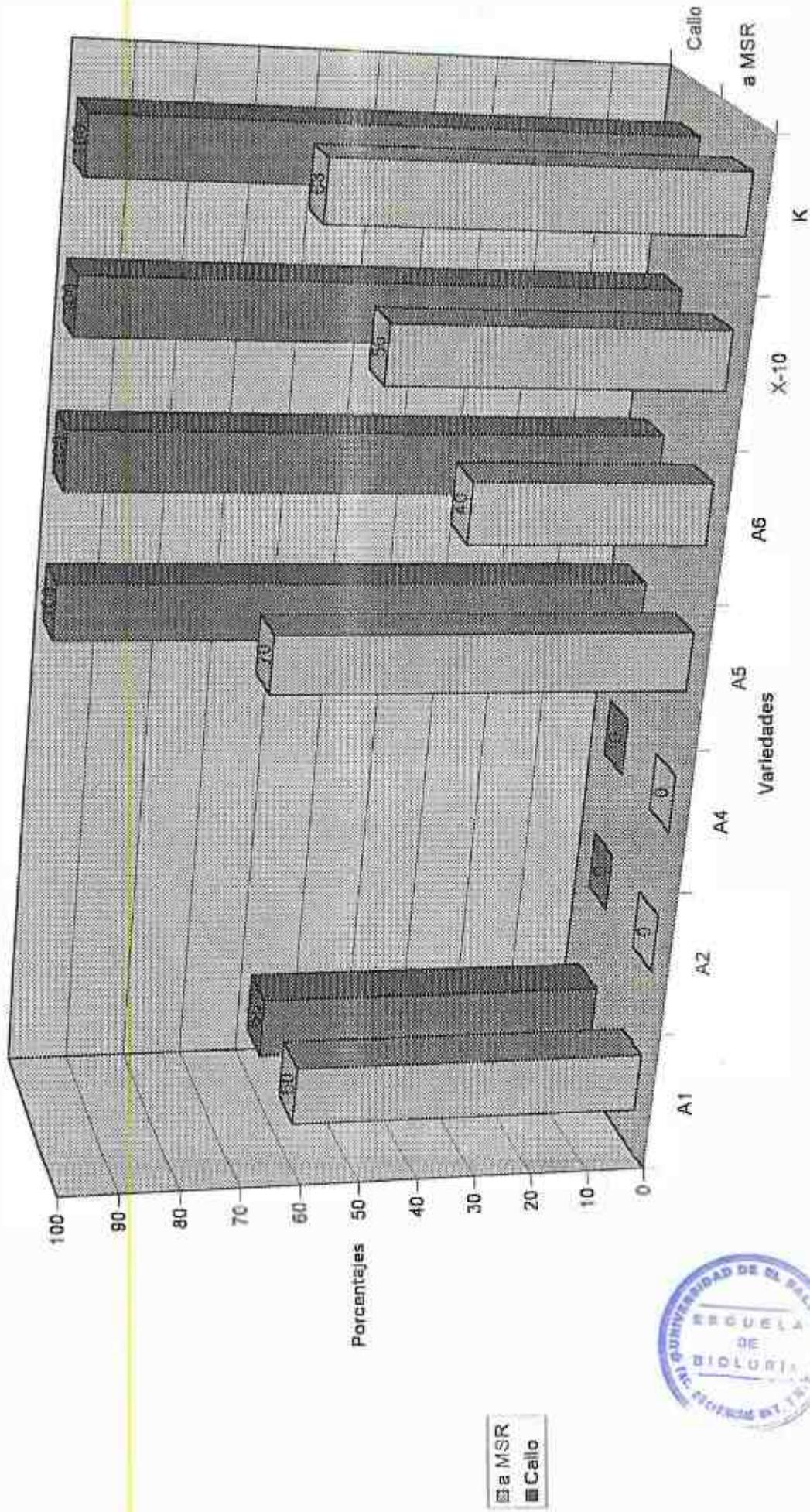


Figura 20. Porcentaje de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 2mg/L de 2,4-D

presencia de ésta concentración, pero aún así los callos producidos eran de menor tamaño, de coloración amarillo intenso, y su necrosis comenzó a las dos semanas de sembrado el explante.

El tratamiento arrojó los primeros indicios de las variedades de mejor respuesta, siendo estas las variedades Keybonnet, X-10 y CENTA A-5; las variedades CENTA A-1 y CENTA A-6, tuvieron así mismo buena producción de callos pero estos eran de menor tamaño y tendientes a necrosarse con mayor rapidez que en las variedades restantes.

Adición de L-Triptófano

Sólo dos concentraciones fueron utilizadas en este experimento (1mgL^{-1} y 2mgL^{-1} de 2,4-D), que requería la combinación de las mismas con tres concentraciones distintas de L-Triptófano ($20\mu\text{m/L}$, $40\mu\text{m/L}$, $60\mu\text{m/L}$), la unión de ellas fue aplicada al medio de cultivo, las cinco variedades utilizadas para este experimento fueron CENTA A-1, CENTA A-5, CENTA A-6, X-10 y Keybonnet.

Las figuras 21 y 22 muestran, los datos obtenidos de la primera siembra, que consistió en las dos combinaciones de $1\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{m/L}^{-1}$ y $2\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{m/L}^{-1}$

de 2,4-D y L-Triptófano respectivamente. Para la combinación de 1mgL^{-1} (2,4-D) más $20\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano) , en general todas las variedades utilizadas tuvieron una buena respuesta a los medios de calogénesis y regeneración (Fig. 21) , produciendo callos grandes de color amarillo claro, poco desarrollo de raíz, y sin necrosis temprana; la excepción en esta fase fue la variedad CENTA A-1 que tuvo buena producción de callos pero estos eran pequeños, de rápida necrosis en el perímetro del callo y de un color amarillo oscuro; la variedad CENTA A-6 presentó la menor proporción de callos a medio de regeneración con un 62%. La variedad Keybonnet tuvo el mismo porcentaje de calogénesis y de transferencia a medio de regeneración.

Los resultados de la concentración 2mgL^{-1} (2,4-D) más $20\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano) (Fig. 22), fueron de un 100% de calogénesis para todas las variedades, la diferencia radicó en los porcentajes de callos a medio de regeneración siendo de 44% para la variedad Keybonnet, que fue la de mejor respuesta; el tamaño de los callos fue mucho más pequeño pero con las mismas características de coloración y enraizamiento que con la concentración anterior.

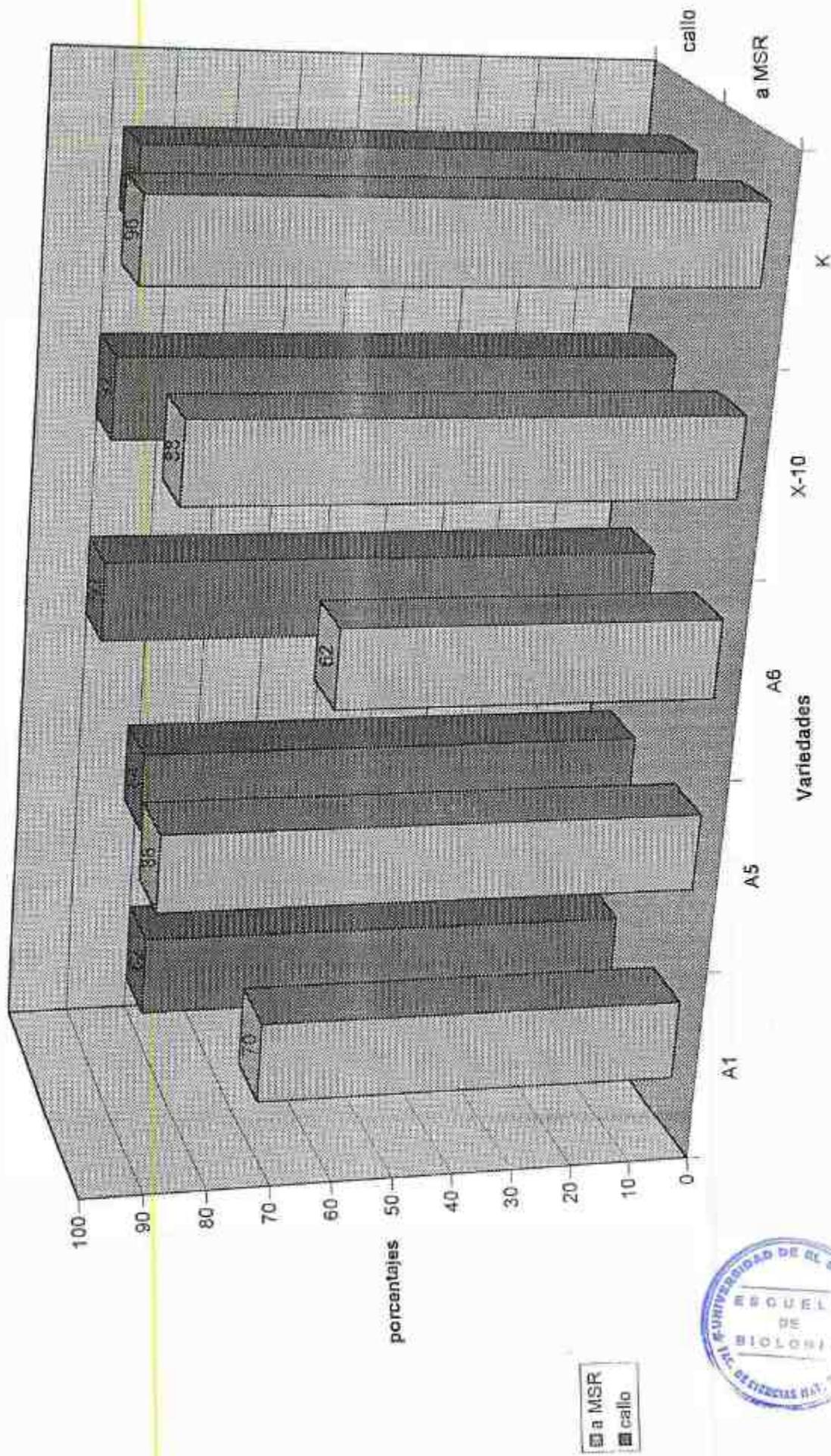


Figura 21. Porcentajes de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 1mg/L 2,4-D+20 μm/L L-Triptófano

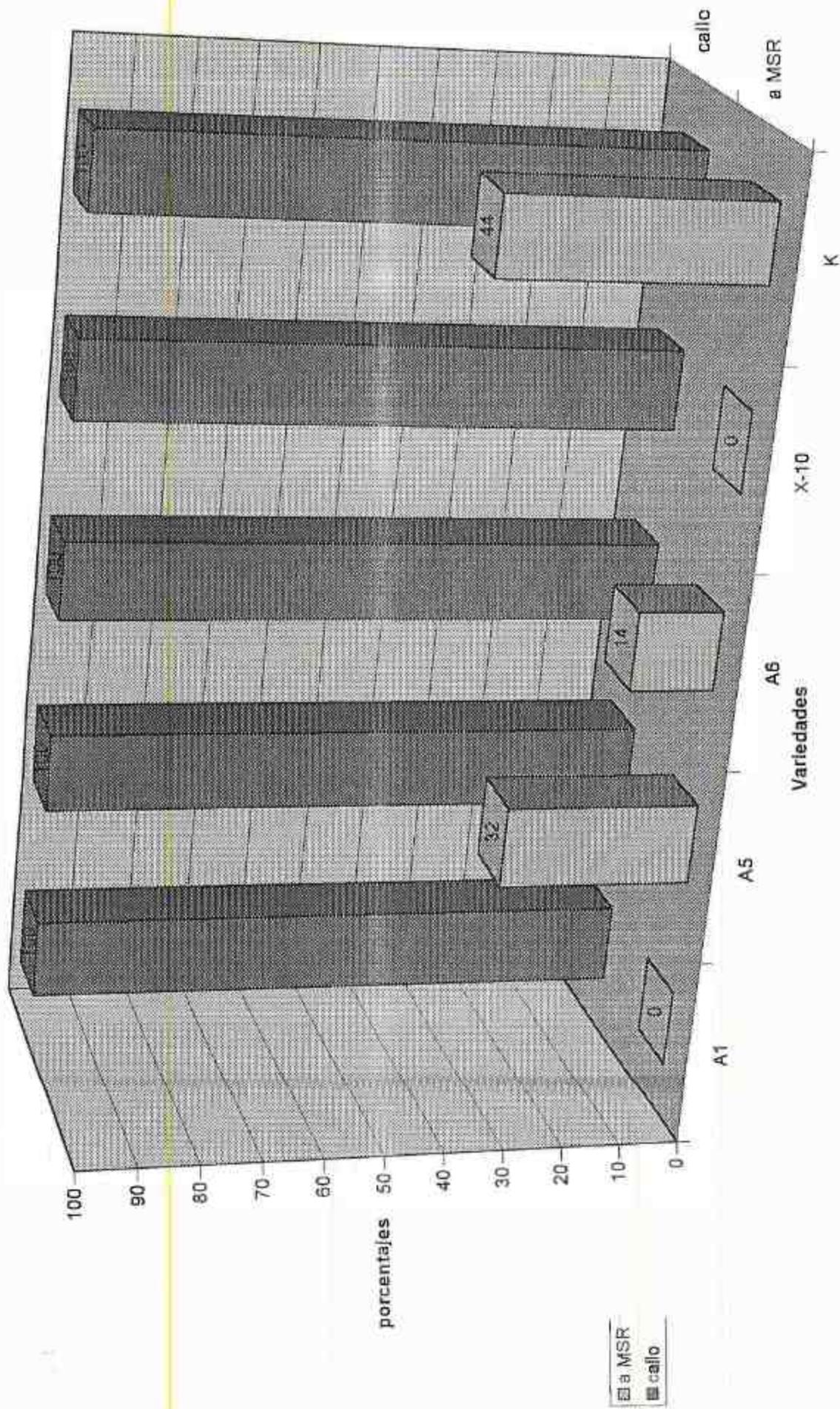


Figura 22. Porcentaje de callogénesis y callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 2mg/L 2,4-D+20 μ m/L L-Triptófano

La segunda siembra de este tratamiento se realizó con las combinaciones de 1mgL^{-1} y 2mgL^{-1} de 2,4-D, con la segunda concentración de L-Triptófano de $40\mu\text{mL}^{-1}$.

La siembra, en concentración de 1mgL^{-1} (2,4-D) + $40\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano), arrojó como resultados un notable descenso en la producción y calidad de los callos obtenidos. Únicamente la variedad CENTA A-6 tuvo un 100% de callogénesis, la totalidad de estos callos no eran viables para pasar a medio de regeneración debido a que eran muy pequeños, y no presentaban las características morfogénicas deseadas; los callos obtenidos de la variedad CENTA A-5 se dejaron un par de semanas más para registrar su desarrollo, pero comenzaron a necrosarse, lo que aceleró su paso a un medio de regeneración (Fig. 23). Entre ambas concentraciones evaluadas hubo ciertas diferencias en el porcentaje de producción de callos, la segunda combinación (2mgL^{-1} (2,4-D) + $40\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano)), tuvo una mejor producción de callos (100% para todas las variedades) y hubo una mejor respuesta de éstos para su paso a medio de regeneración (Keybonnet con un 58%) (Fig. 24). Sin embargo de forma general se observó una disminución en tamaño y una coloración más oscura de los mismos. No hubo necrosis sino hasta transcurridas cinco semanas

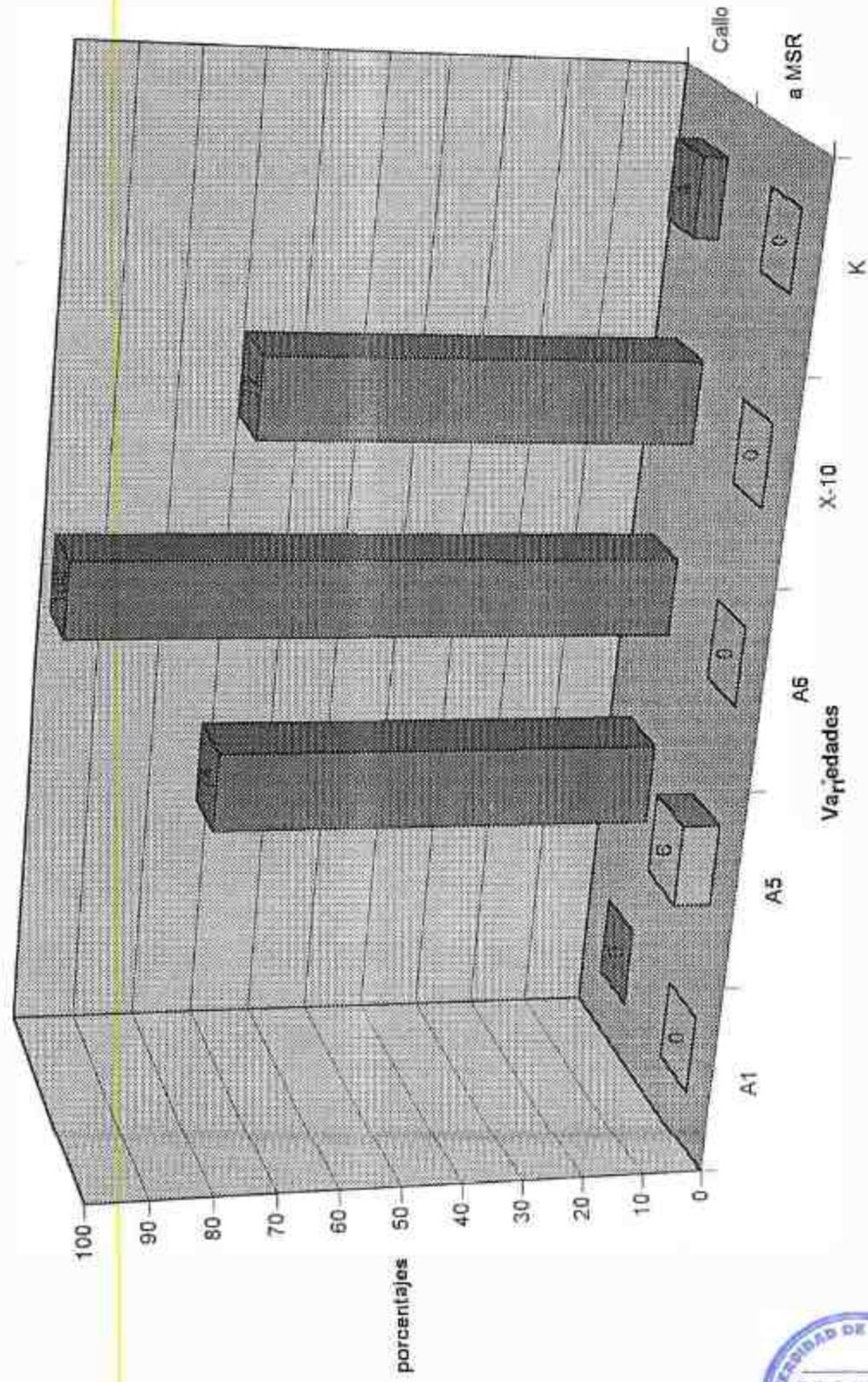


Figura 23. Porcentajes de callogenesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 1mg/L de 2,4-D + 40/mg/L L-Triptófano

a MSR
 Callo



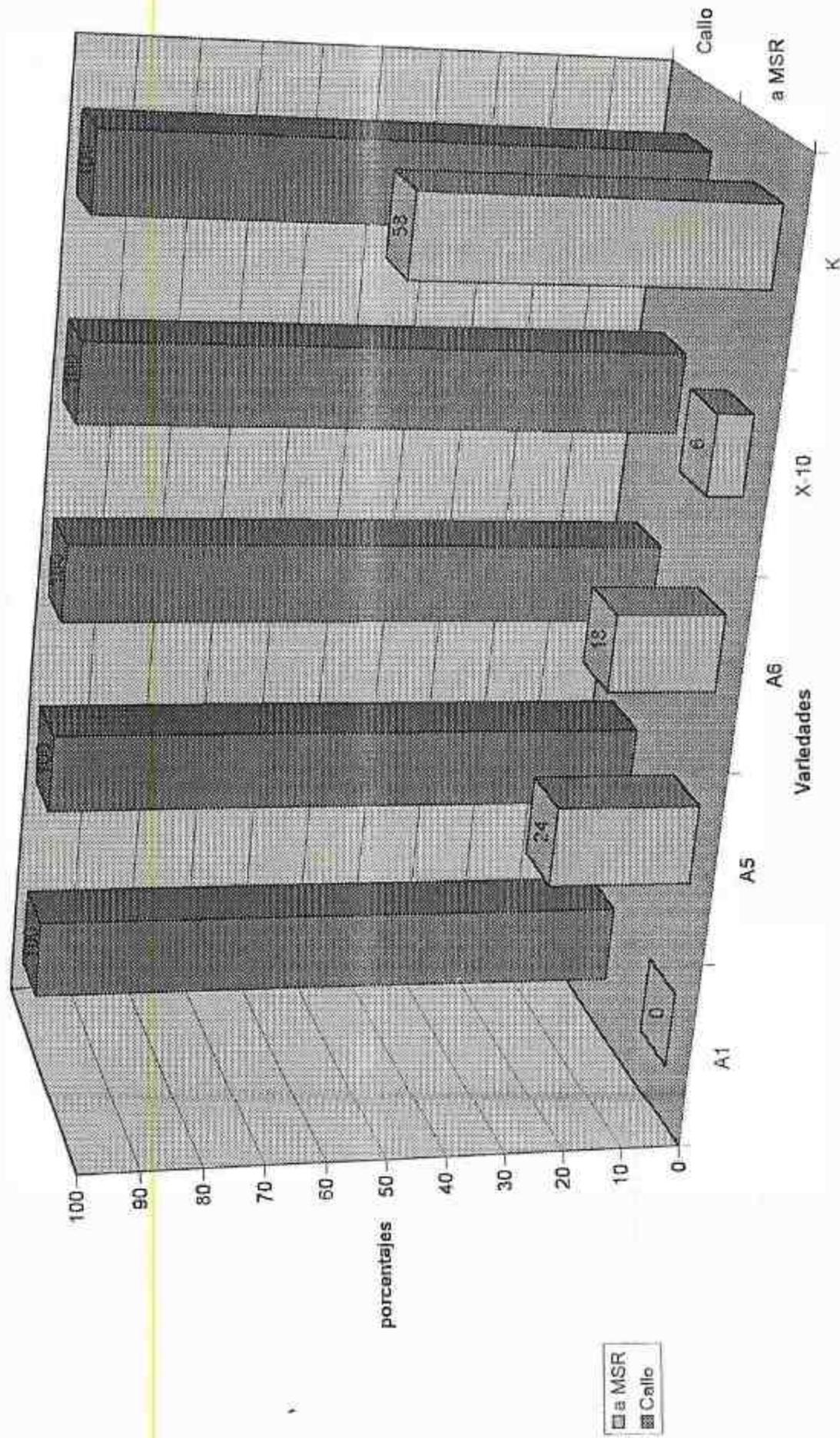


Figura 24. Porcentajes de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 2mg/L 2,4-D+40^µm/L L-Triptófano

después de las siembras, ésta comenzó por la periferia del callo hasta cubrirlo todo.

La tercera siembra se realizó con la última combinación entre 2,4-D y L-Tritófano en concentraciones de $1\text{mgL}^{-1}+60\mu\text{mL}^{-1}$ y $2\text{mgL}^{-1}+60\mu\text{mL}^{-1}$. A este nivel los callos obtenidos eran muy pequeños, muy adheridos al embrión, el desarrollo de raíz se presentaba disminuido, las cuales fueron más gruesas que las anteriores; la coloración del callo era casi parda y la necrosis comenzó cuando apenas había transcurrido semana y media de su siembra.

La figura 25, demuestra que las variedades Keyonnet y CENTA A-1, tuvieron los mayores porcentajes de callogénesis (100% y 90% respectivamente) no así en los porcentajes a medio de regeneración donde la variedad CENTA A-5 tuvo los mejores resultados (56%).

La figura 26, evidencia que las variedades de mejor respuesta fueron, para ésta concentración, CENTA A-6 con un 72% y CENTA A-1 DE 70%, aunque los callos de mejor apariencia para medio de regeneración fueron los de la variedad CENTA A-5 (10%), que presentaban un tamaño reducido al igual que el resto de las variedades pero su coloración y textura evidenciaban un callo

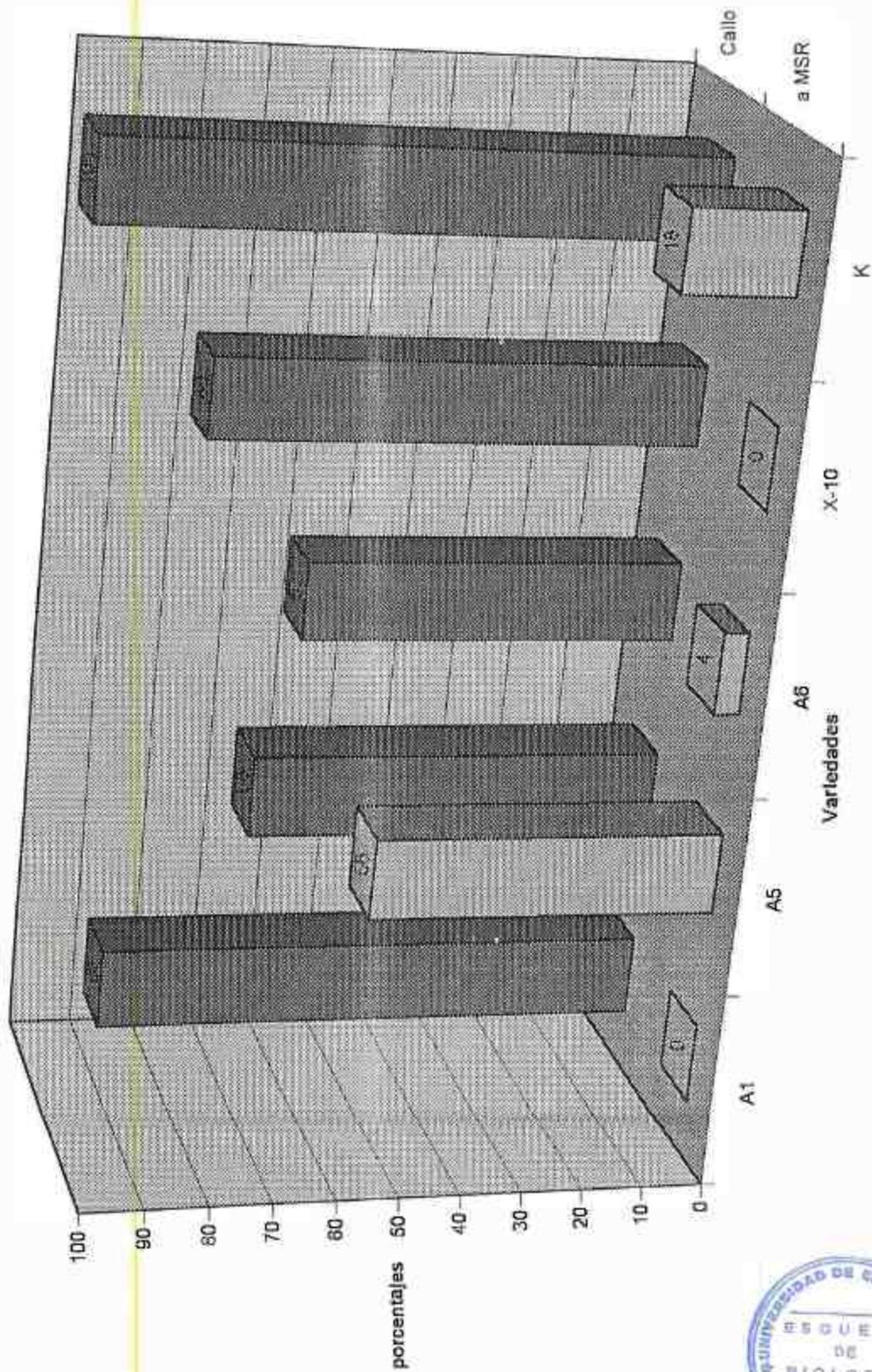


Figura 25. Porcentajes de callogénesis y callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 1mg/L 2,4-D + 60 μg/L L-Triptófano

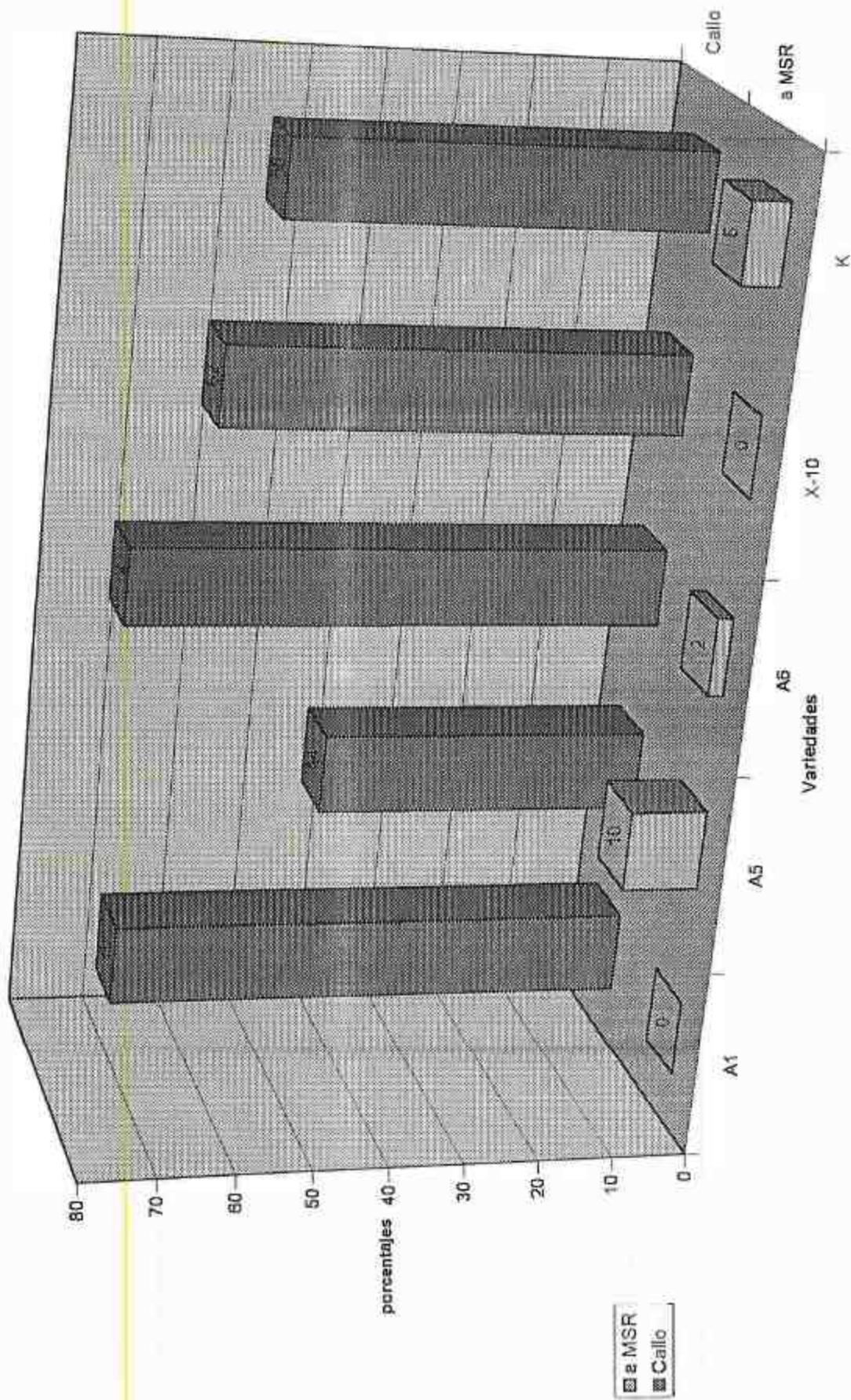


Figura 26. Porcentaje de calogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 2 mg/L 2,4-D + 60 µg/L L-Triptófano

típicamente morfogénico: color blanco, compacto, textura dura, no se desmoronaba fácilmente, a la luz se observó actividad fotosintética en la superficie y el alargamiento de la raíz era reducido; esto a la tercera semana de sembrado el explante.

Optimización de Medio de Cultivo

La optimización del medio de cultivo se realizó en dos experimentos alternos para los cuales se escogieron las mejores concentraciones de 2,4-D y L-Triptófano (se retomaron los mejores resultados del experimento anterior tomando en cuenta la producción de callos, la calidad y firmeza de estos); éstas concentraciones fueron de 1mgL^{-1} 2,4-D + $20\mu\text{mL}^{-1}$ de L-Triptófano y de 2mgL^{-1} 2,4-D + $20\mu\text{mL}^{-1}$ de L-Triptófano.

a) El primer experimento consistió en agregar al medio de cultivo 5 y 10 mL^{-1} de "agua de coco"; acá pudo constatarce que dichos tratamientos produjeron callos con un mejor desarrollo tanto en tamaño como en coloración (de amarillo pálido a blanco); con los 5ml de agua de coco, (Fig. 27), nuevamente hubo una ligera separación entre variedades siendo las de mejor respuesta los callos obtenidos de las variedades CENTA A-5 (68% de callogénesis) y Keybonnet

(64% de callogénesis), las otras tres variedades tuvieron callos un poco más pequeños en diámetro y coloración amarillo intenso; se observó, sin embargo, que estas respuestas resultaban mejores que las obtenidas en las mismas variedades, pero sin añadirles el agua de coco; los callos eran más firmes al tacto, con un tamaño superior al obtenido anteriormente, el enraizamiento era escaso contándose una raíz gruesa y corta, ubicada a un costado del callo y de fácil sustracción, la necrosis bajo esta concentración era tardía y comenzaba a las 5 semanas posterior a su siembra. Así también, fue CENTA A-5, con un 56% la de mejor respuesta en medio de regeneración. Sin embargo en el medio donde se agregó los 10ml de agua de coco, las variedades presentaban un mayor enraizamiento y una necrosis más rápida.

La figura 28, contiene los resultados de la concentración $1\text{mgL}^{-1}+20\mu\text{mL}^{-1}+10\text{mL}^{-1}$ de agua de coco, en el encontramos que se mantienen las variedades CENTA A-5 y Keybonnet como las de mejor respuesta en callogénesis (56% cada una), bajo esta concentración fue la variedad Keybonnet la que tuvo más callos a medio de regeneración (52%).



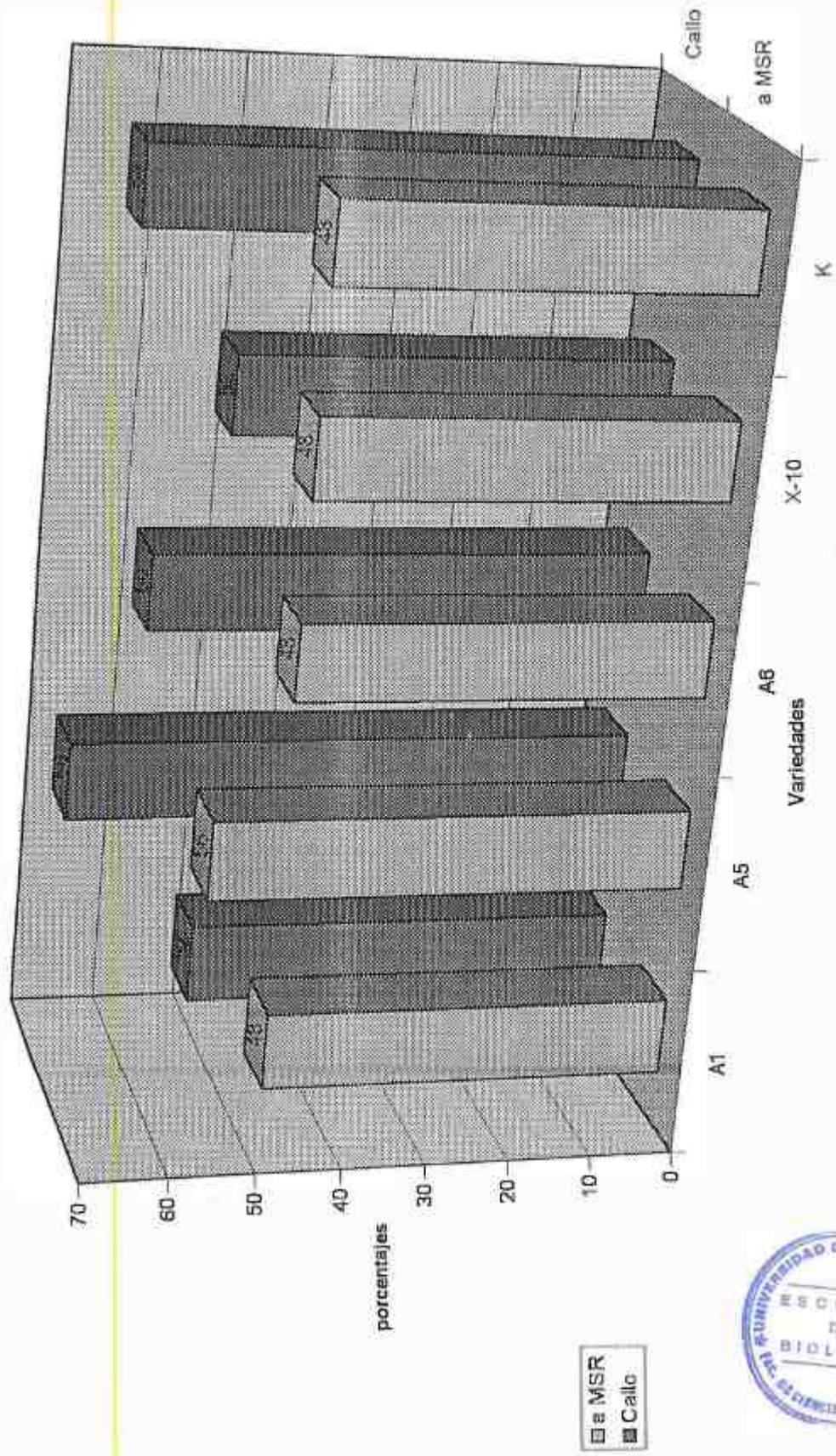


Figura 27. Porcentajes de calogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 1mg/L 2,4-D + 20 µm/L L-Triptófano + 5 ml/L agua de coco

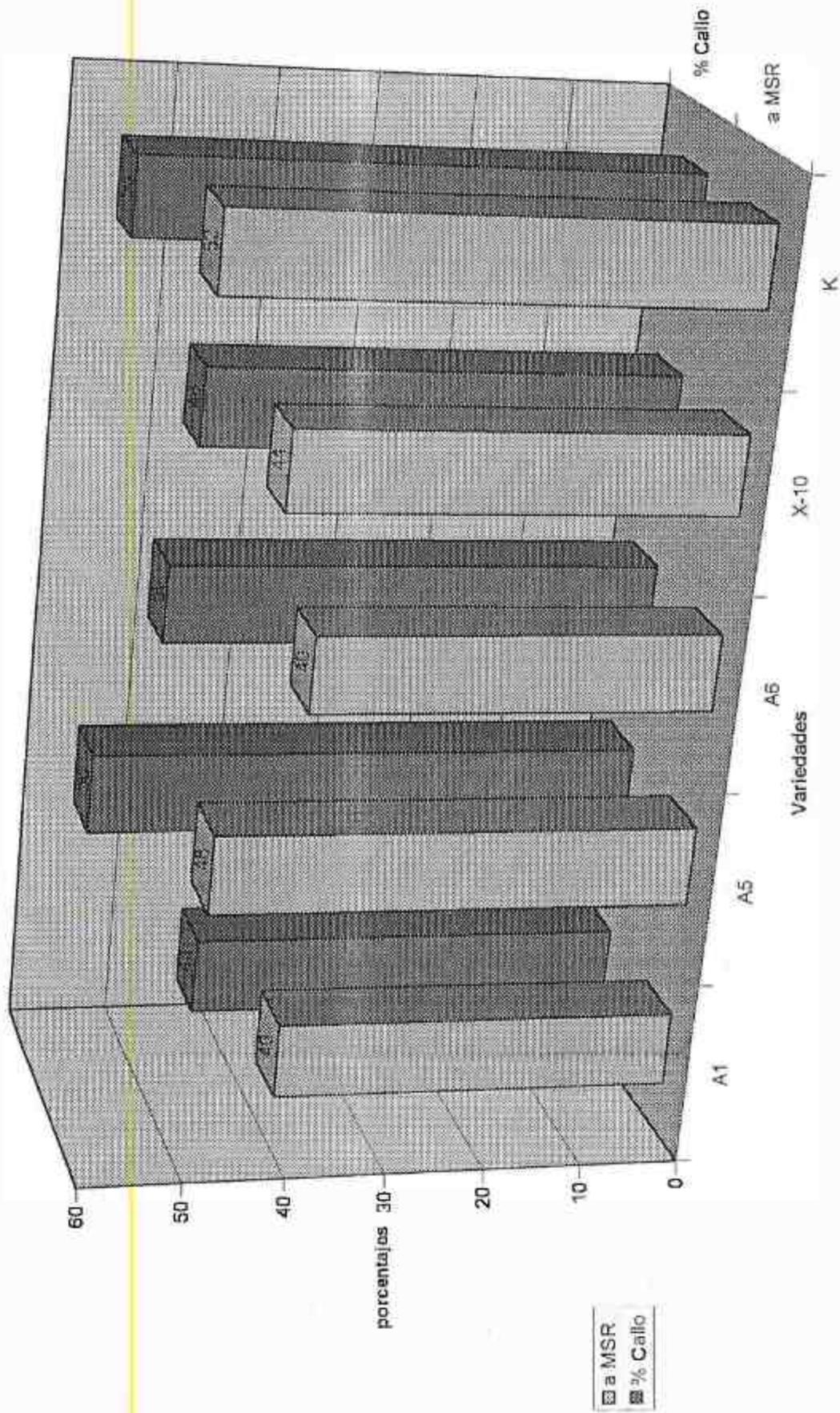


Figura 28. Porcentajes de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultados del tratamiento 1mg/L 2,4-D + 20^µm/L L-Triptófano + 10ml/L agua de coco

Para las combinaciones de $2\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1}$, de 2,4-D y L-Triptófano respectivamente, con 5 y 10mL^{-1} de agua de coco; en la figura 29 , ($2\text{mgL}^{-1} + 20\mu\text{mL}^{-1} + 5\text{mL}^{-1}$), se observa que los porcentajes de calogénesis estuvieron en el ámbito de 56 a 64% y que la variedad CENTA A-5 seguía presentando los mejores porcentajes en medio de regeneración.

Por último la concentración de 2mgL^{-1} (2,4-D) + $20\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano) + 10mL^{-1} (agua de coco), la figura 30, muestra que la misma variedad, CENTA A-5, continuó dando los mejores resultados tanto en calogénesis como en regeneración con un 52% y 44% respectivamente.

Haciendo una relación entre las cuatro concentraciones evaluadas en éste tratamiento, la mejor combinación fue de 1mgL^{-1} (2,4-D)+ $20\mu\text{mL}^{-1}$ L-Triptófano)+ 5mL^{-1} (agua de coco) , tuvo mejores porcentajes de calogénesis y de regeneración; así como también pudo observarse que la variedad CENTA A-5 presentaba una mejor respuesta en todas ellas , por encima de las demás (Figura 31).

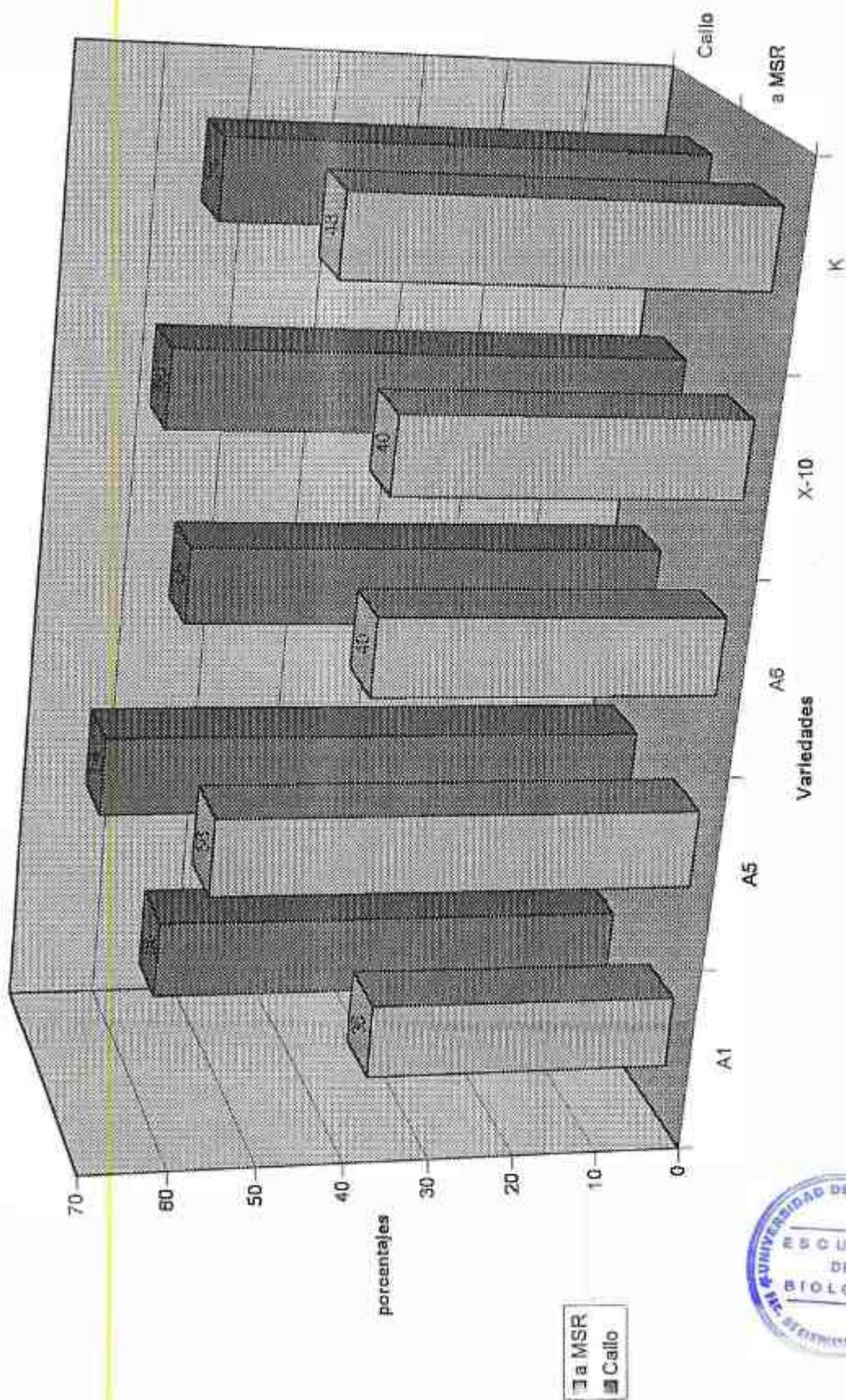


Figura 29. Porcentaje de calogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 2mg/L 2,4-D + 20^µm/L L-Triptófano + 5ml/L agua de coco

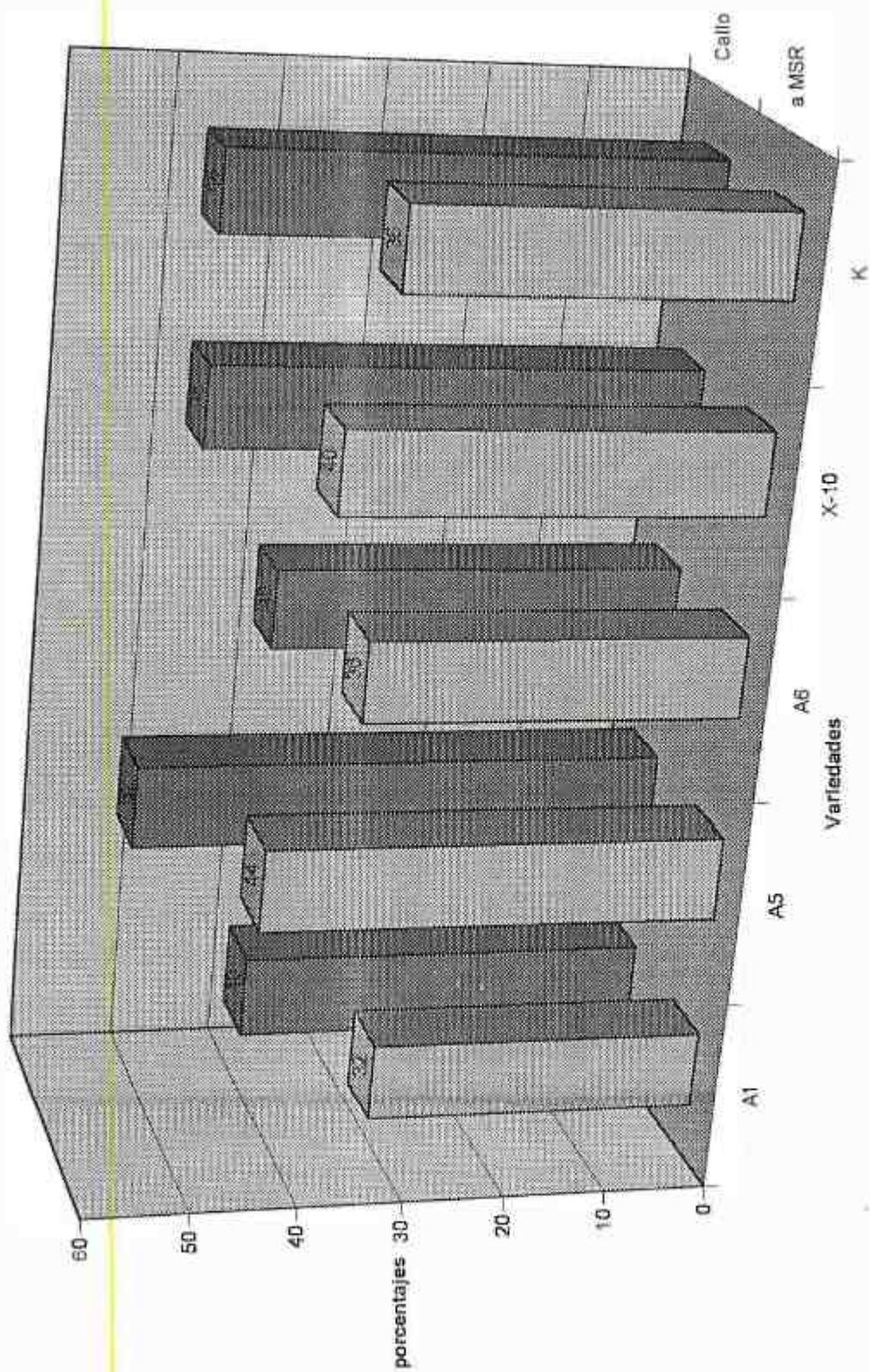


Figura 30. Porcentaje de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultante del tratamiento 2mg/L 2,4-D + 20µm/L L-Triptófano + 10ml/L agua de coco

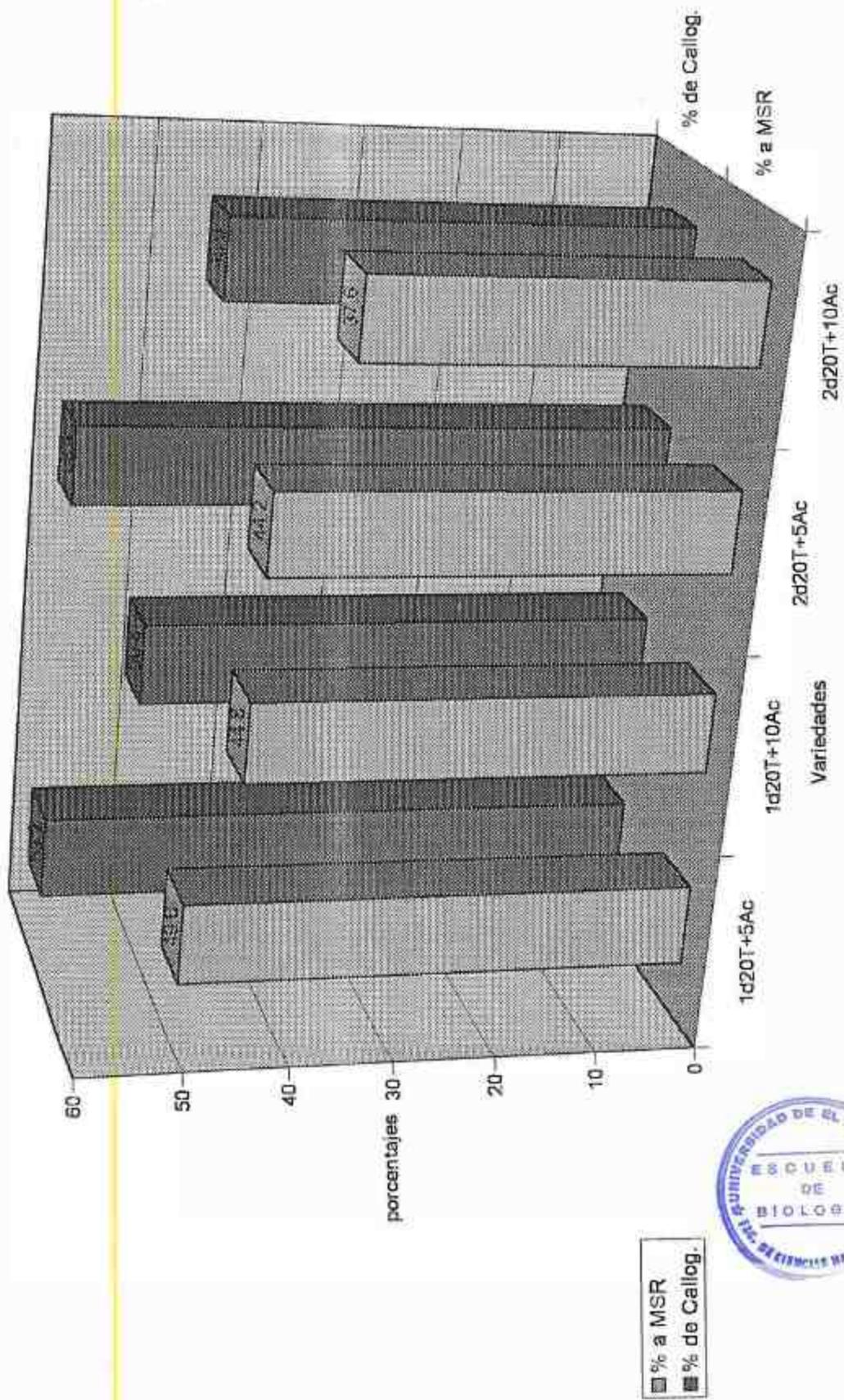


Figura 31. Comparación entre los porcentajes de callogénesis y de callos a medio de regeneración de las combinaciones para el tratamiento de agua de coco

b) El segundo experimento realizado en la optimización del medio estuvo vinculado directamente con la fuente de carbono. La adición de Sacarosa reactivo dió como resultados, que para las combinaciones de 1mgL^{-1} (2,4-D) + $20\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano) + Sacarosa reactivo; los porcentajes de callogénesis fueron entre los 42 y 48 % éste último de CENTA A-5, y los porcentajes de regeneración en un 40 a 44% (Fig. 32).

Para la segunda combinación evaluada (2mgL^{-1} (2,4-D)+ $20\mu\text{mL}^{-1}$ (L-Triptófano) + Sacarosa reactivo), figura 33, los porcentajes descendieron en un 5.2% con respecto a la concentración anterior, encontrándose los porcentajes de callogénesis entre 38 y 44% y los de regeneración entre 28 y 40%. Las variedades de mejor respuesta fueron CENTA A-5 y Keybonnet.

Terminados todos estos experimentos, se procedió a realizar un último tratamiento, el cual consistía en provocar un Estrés Hídrico (Deshidratación) al callo. El experimento se llevó a cabo únicamente con la variedad Keybonnet por ser la que mejor respuesta tuvo a lo largo de todos los experimentos.

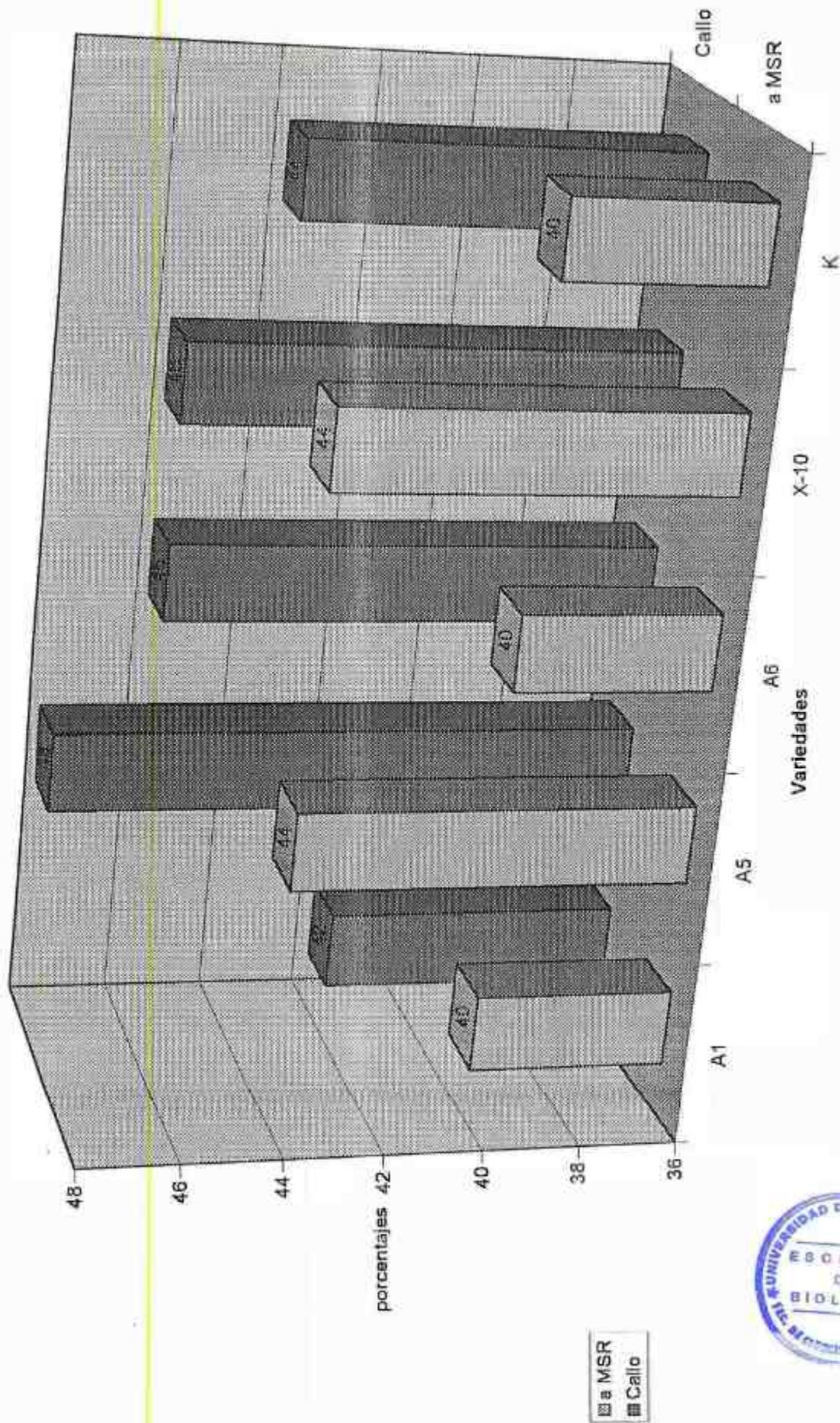


Figura 32. Porcentajes de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 1mg/L 2,4-D + 20,4m/L L-Triptófano + Azúcar Reactivo



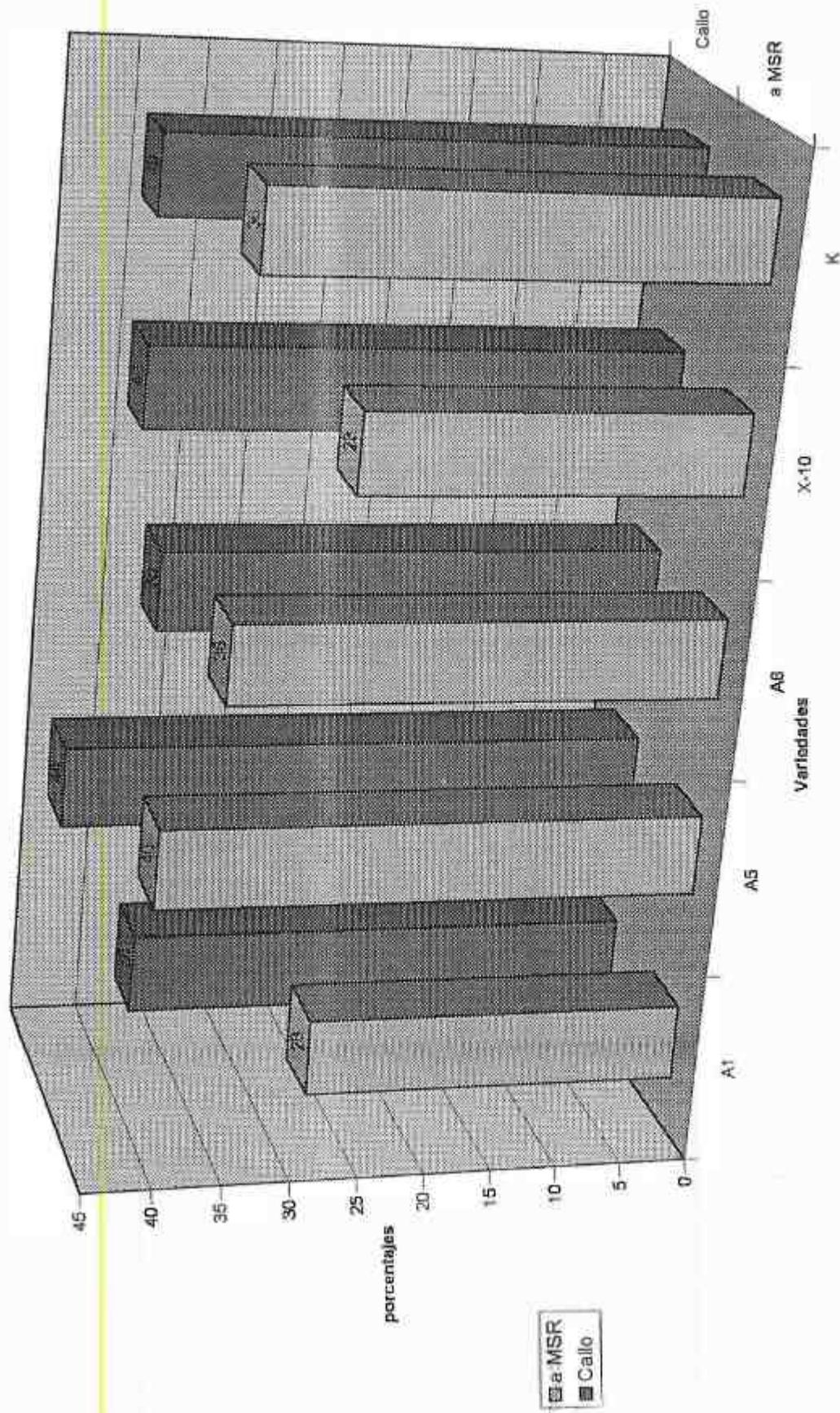


Figura 32. Porcentajes de callogénesis y de callos a medio de regeneración, resultantes del tratamiento 2mg/L 2,4-D + 20 mg/L L-Triptófano + Azúcar Reactivo

Desafortunadamente los callos siguieron un desarrollo anormal, aún cuando su crecimiento fue en aumento, el mismo no era el de un callo morfogénico sino la de un callo hídrico. Su apariencia era granular, de coloración amarillo mostaza , con áreas necrosadas en la periferia. Se subcultivaron nuevamente en un medio de regeneración para aumentar el suministro de nutrientes y pasadas tres semanas los mismos presentaban el mismo crecimiento anormal y no había cambios en su constitución.

DISCUSIÓN

La regeneración de plantas directamente de los explantes, o a partir de callos, por medio de la organogénesis o la embriogénesis somática; se ha utilizado como una alternativa a métodos de propagación, como también a la necesidad de establecer métodos genéticos celulares aplicables en el mejoramiento de las plantas y en la recuperación de variantes somaclonales; en consecuencia, existe un considerable interés en definir las vías de regeneración para plantas de importancia económica, como lo es el arroz.

Como se ha explicado, se define como embriones somáticos, asexuales o adventicios, a los iniciados a partir de células que no son el producto de la fusión de gametos. Son estructuras bipolares con un eje radical-apical, y no poseen conexión vascular con el tejido del endosperma; éstas estructuras pueden ser capaces de formar una planta normal. En ciertos aspectos, los embriones somáticos mantienen una similitud con los embriones cigóticos, sin embargo, tanto *in vivo* como *in vitro* pueden ocurrir algunas anomalías en el desarrollo, por ejemplo, la fasciación y la fusión de cotiledones.



Virtualmente, todos los tejidos vegetales tienen la capacidad para formar callos *in vitro*; sin embargo, relativamente pocos explantes tienen la capacidad para producir callos embriogénicos. Comúnmente se han usado como explantes, partes de plántulas, como cotiledones, hipocótilos y embriones. Los embriones inmaduros se usan generalmente en pastos (Gamborg *et al.* 1976) y en los cereales (Vasil *et al.* 1980). En las gramíneas es importante la posición de los embriones cigóticos en el cultivo; el eje embrionario debe estar en contacto con el medio. Esto es concordante con nuestra investigación, ya que precisamente, los buenos resultados obtenidos se debieron en gran parte a la adecuada ubicación del explante sobre el medio de cultivo.

Además, la respuesta embriogénica del callo depende del genotipo de la planta. Es importante tener en cuenta la variabilidad asociada al genotipo de las plantas, es muy frecuente que en idénticas condiciones de medio y ambiente, la respuesta *in vitro* del cultivo de un determinado explante, difiera con el cultivar empleado; tal como sucedió con las variedades CENTA A-2 Y CENTA A-4, que no respondieron a los tratamientos estudiados. Ligeros cambios en la composición de los medios de cultivo, especialmente en lo que se refiere a los reguladores de crecimiento, pueden ser de utilidad para obviar este efecto del genotipo del material vegetal (Roca y Mroginski 1991).



Callogénesis:

Los callos embriogénicos se han reportado originando a partir del escutelo, ya sea por embriogénesis directa de las células del escutelo o por la subsecuente proliferación de este meristemo causado por la auxina en el medio. En la vía indirecta, callo o suspensión celular, se presenta la formación de un agrupamiento de células denominado el complejo proembrional; del cual uno o varios embriones se desarrollan. Se ha observado que el complejo proembrional surge a partir de una sola célula que pasa por un evento de redeterminación, seguido por varias segmentaciones. Los embriones pueden surgir de tres formas: a) directamente, b) a partir de una sola célula, generalmente periférica, c) a través de un conjunto de células; así como por la conjunción de los mismos (Roca y Mroginski 1991). Al observar detenidamente los callos obtenidos a partir de los diferentes tratamientos, por sus características morfológicas y de formación, es muy probablemente que el callo se origine de la región escutelar, lo cual coincide con lo anteriormente citado (Anexo 9).

Además, la similitud entre los embriones cigóticos y los embriones somáticos es muy grande; en embriones somáticos la auxina juega un papel importante

tanto en la inducción embriogénica, así como en el subsecuente desarrollo morfológico adecuado. Después de la fase de "torpedo", los procesos de embriogénesis cigótica y somática divergen. Los embriones cigóticos pasan a la formación de cotiledones, seguida de la fase de maduración durante la cual se comienzan a almacenar proteínas sintetizadas, terminando en una fase de dormancia, los embriones cigóticos maduros sufren deshidratación, un período de quiescencia y finalmente se desarrollan a una fase de post-germinación (Zimmerman 1993).

En contraste los embriones somáticos crecen y se diferencian continuamente, aparentemente activando los meristemas de la raíz y brote con un no tan obvio estado de quiescencia. Por ésta diferencia en los estadios tardíos entre embriones cigóticos y embriones somáticos, el término de "plántula" es más apropiado para describir a los embriones somáticos totalmente diferenciados (Roca y Mroginski 1991) (Anexo 10).

A pesar de que los embriones somáticos no pasan por fases de deshidratación o estadios de dormancia; si hay síntesis y acumulación de ácido Absícico (ABA), así como expresan, una variedad de genes que son inductores del ABA y que están relacionados con la tolerancia a la desecación; aquellos

complejos pro embrionales que se forman en la periferia del callo, es posible que aparezcan por la interacción de la auxina sintética, 2,4-D, y del ABA, el cual puede ser en esta fase muy determinante para la formación de dichos complejos. Se deduciría, que la señal para entrar en fase de deshidratación es intrínseca y que estos genes se expresan en embriones somáticos que no llevarán acabo esta fase. En contraste, el estado de dormancia no está activado en embriones somáticos aparentemente, sino que aparece de una señal extrínseca probablemente del endosperma (Suzuki *et al.* 1993; Zimmerman 1993).



Importancia de la Auxina en el medio:

Halperin y Wetherell (1964), consideraron que para la inducción callogénica era necesaria la presencia de una auxina para dar inicio a un callo embriogénico. Las auxinas comprenden una gran familia de sustancias que tienen en común la capacidad de producir un alargamiento y agrandamiento celular, sin embargo, se ha encontrado que promueven tanto la división celular como la formación del complejo proembrional. Usualmente se utiliza el 2,4-D; en el caso de las gramíneas es la única auxina utilizada; el cual aparentemente brinda el estímulo o inicia la inducción de la embriogénesis somática en el callo. Esto fue

corroborado, ya que al colocar explantes en un medio de cultivo sin la auxina 2,4-D, no hubo inducción callogénica alguna.

Una vez la embriogénesis ha sido inducida, el papel de la auxina cambia y los embriones comienzan a sintetizar su propia auxina, muchos estudios han demostrado que un transporte polar adecuado de la misma es prerequisite para el desarrollo de una morfogénesis normal a partir del estado globular.

En la práctica el uso de las auxinas es muy importante. No es posible establecer una concentración particular de la auxina que se debe utilizar en un solo caso, de acuerdo con Evans *et al.* (1981), la mayoría de sistemas embriogénicos requieren de altas concentraciones de la misma. El 2,4-D se utiliza en concentraciones que varían de 0.1 a 10mgL⁻¹, con un punto óptimo que frecuentemente se encuentra alrededor de 1 a 5mgL⁻¹ (Roca y Mroginski 1991), que abarca el ámbito utilizado en la investigación que fue de 1 a 3 mgL⁻¹. Siendo las mejores de 1mgL⁻¹ y de 2mgL⁻¹, que proporcionaron buenos resultados en cinco de las siete variedades evaluadas con un 96% de callogénesis general entre las dos concentraciones; la tercera concentración probablemente resultó tóxica para las mismas, y las otras dos variedades pudieran requerir

concentraciones más altas para la inducción de callo, tal como ocurrió con la variedad CENTA A-5, que en concentraciones de 1mgL^{-1} de 2,4-D; no tuvo formación de callos, pero al aumentar la concentración a 2mgL^{-1} se obtuvo un 100% de callogénesis y un 70% de callos a medio de regeneración.

Sin embargo, la maduración de los embriones y la germinación no ocurren en presencia de la auxina; en consecuencia, hay que removerla o usarla en concentraciones más bajas debido a que las citoquininas en muchas ocasiones requieren de la presencia de auxinas para actuar (Roca y Mroginski 1991) , por lo que el medio de regeneración contenía concentraciones de 0.05mgL^{-1} de auxina (ANA).

Adición de L-Triptófano al medio de cultivo:

Tanto la inducción de la embriogénesis somática como el desarrollo de los estados subsiguientes de los embriones dependen también de la presencia de nitrógeno reducido (Halperin y Wetherell, 1964).

El nitrógeno suministrado como nitrato o como ion amonio, es esencial. El nitrógeno orgánico proporcionado por la glutamina , la alanina, la caseína hidrolizada o por el agua de coco; es también beneficioso y puede reemplazar

al nitrógeno inorgánico en el medio. Generalmente se ha reconocido que los aminoácidos suministrados pueden promover el crecimiento de ciertos cultivos, en algunos sistemas de tejidos como el "tabaco", dos constituyentes del medio de cultivo (el ácido aspártico y el ácido glutámico) promueven el crecimiento en la misma forma en que lo hace el complemento aminoácido completo presente en el extracto de levadura (Halperin y Wetherell, 1964).

Otros investigadores han encontrado que algunos aminoácidos en forma individual pueden ser inhibidores mientras que otros no lo son. Se discuten los efectos de varios compuestos nitrogenados en el crecimiento de cultivos. Frecuentemente, los aminoácidos adicionados al medio de cultivo, corresponden a la forma D, la cual ha demostrado ser inhibidora, mientras que la forma L, es benéfica; además hay que considerar que los aminoácidos se esterilizan en el autoclave en contacto con el medio, a menudo los compuestos nitrogenados simples producen muchos otros que pueden ser inhibidores. El papel de los aminoácidos en la nutrición de los tejidos y las células vegetales cultivadas se debe considerar como un problema complejo, ya que, muchos tejidos responden diferente a los suplementos aminoácidos (Steward *et al.* 1958).



En esta investigación se consideró la utilización de L-Triptófano como suministro de nitrógeno al medio; además al ser éste aminoácido precursor de la auxina natural ácido indolacético (AIA), se aumentaba la probabilidad de éxito en la formación de callos y la posterior regeneración a plántulas.

El Triptófano es un aminoácido aromático cuya acción en el proceso de embriogénesis somática ha sido ampliamente estudiada ; los experimentos realizados por Siriwardana y Murray (1993), en cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) demuestran que promueve la formación de callos embriogénicos hasta cuatro veces de mayor diámetro que aquellos formados en ausencia del aminoácido. Es ampliamente conocida la dificultad de obtener una alta frecuencia de producción de callos en cultivos de cereales, ésto generalmente debido a la utilización de un medio que contiene como unico aditivo la auxina (2,4-D), para promover crecimiento y división celular; sin embargo cuando se combina al medio L-Triptófano, se ha comprobado que éste produce un aumento en el tamaño de los callos así como un incremento en la calidad embriogénica de los mismos. El Triptófano al ser precursor de AIA en plantas, ha demostrado que su adición al medio de cultivo incrementa la síntesis de AIA en los tejidos en formación; dichos resultados se mantienen tanto si al medio sólo se le añade

(2,4-D)+20 μ mL⁻¹ (L-Triptófano) presentaban un tamaño mayor, una coloración amarillo-pálido y una textura más compacta que los obtenidos sin la adición del aminoácido. El Triptófano al ser precursor de AIA en plantas, ha demostrado que su adición al medio de cultivo incrementa la síntesis de AIA en los tejidos en formación; dichos resultados se mantienen tanto si al medio sólo se le añade AIA, como su combinación con Triptófano, o únicamente el Triptófano. La explicación del porqué los callos embriogénicos se forman ante la presencia, ya sea de la auxina metabolizada o de su precursor, todavía está bajo investigación (Roca y Mroginski 1991).

El éxito de unas variedades sobre otras, está más relacionado con la genética de cada variedad y con las concentraciones utilizadas, las cuales demostraron ser adecuadas para la mayoría de las variedades en los ámbitos de menor concentración (1mgL⁻¹ de 2,4-D + 20 μ mL⁻¹ L-Triptófano; y 2mgL⁻¹ de 2,4-D + 20 μ mL⁻¹ de L-Triptófano).

Optimización al medio de cultivo:

a) Durante muchos años, los investigadores han ido optimizando las condiciones del cultivo *in vitro*, entre éstos estudios se ha dado gran importancia a la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo. En 1942, van Overbeek, Conklin y Blakaslee , demostraron que los embriones en desarrollo de *Datura*, se podían cultivar *in vitro* hasta su madurez, utilizando el endosperma líquido del coco (*Cocos nucifera*), como suplemento de un medio de cultivo estandar (Roca y Mroginski 1991); rápidamente aparecieron otros usos para el agua de coco (AC). En 1948, Caplin y Steward, reconocieron la acción del agua de coco en la inducción celular en tejidos diferenciados; se sabía que el agua de coco , era sólo uno de los líquidos que, al ser nutritivo para los embriones inmaduros, se podría producir el mismo efecto en tejidos y células explantadas. Un paso importante en el desarrollo de las técnicas actuales para estimular la división celular de explantes fue la observación de que el agua de coco, a niveles relativamente bajos (5%-10%), podía interactuar con las auxinas y promover el crecimiento, en circunstancias en que la auxina por sí sola era ineficiente. El uso del agua de coco + 2,4-D en tubérculos de papa (Steward *et al.* 1958) y de agua de coco + ANA en las monocotiledoneas (Morel y Wetmore 1951), fueron otros descubrimientos importantes.

El agua de coco (AC), es un medio muy complejo, con una amplia gama de componentes orgánicos e inorgánicos; tiene una buena capacidad amortiguadora (buffer), y no es raro encontrar sales en ella. Aunque el agua de coco es muy rica en magnesio y fosfato, no todos los elementos minerales que contiene, son indispensables, y se pueden reemplazar por un medio salino basal. Presenta un contenido de azúcar de 2.5%, adicionalmente se forman aminoácidos. Su uso se justifica no sólo por su capacidad amortiguadora sino también porque sus promotores de crecimiento, frecuentemente son superiores en su totalidad, a las de otros medios conocidos. Además, en aquellas áreas donde crece el coco, es significativamente más barato que compuestos purificados o sintetizados, tales como la zeatina o el inositol (Roca y Mroginski 1991) (Anexo 11).

Estas características fueron tomadas en cuenta en la elaboración del tratamiento con agua de coco; donde se evidenció que los callos producidos en el estudio, tenían una mejor apariencia, así como también que las mejores concentraciones de su combinación con 2,4-D y L-Triptófano eran de 5ml(AC), ya que en concentraciones mayores (10 ml), los callos tenían un menor tamaño, esto debido probablemente a una saturación de nutrientes en el medio de cultivo, lo cual pudo ser tóxico para el tejido en formación.



b) Otra de las optimizaciones realizadas al medio de cultivo, tienen que ver con la fuente de carbono; Wetherell (1984), ha demostrado que es posible aumentar el potencial embriogénico de los callos de zanahoria exponiéndolos a niveles altos de sacarosa o manitol. Los altos niveles de sacarosa parecen tener un efecto comparable al producido por el ácido absísico. Las concentraciones altas de ésta sustancia estimula la formación de los callos embriogénicos (Lu y Vasil 1981), y reduce la frecuencia de anomalías en el desarrollo tales como, la formación de embriones secundarios, la fasciación y la formación de policotiledones; también inhibe la germinación precoz (Ammirato *et al.* 1984).

Se realizó un cambio en la fuente de carbono durante la investigación. En el comienzo se trabajó con azúcar comercial blanca y sin aditivos, la cual se añadió al medio a niveles de 30 gL^{-1} ; de acuerdo a la revisión bibliográfica se modificó y se comenzó a trabajar con Sacarosa Reactivo para evitar las impurezas del azúcar comercial y evaluar su acción en el mejoramiento de la producción de callos embriogénicos. Sin embargo las respuestas obtenidas en las variedades estudiadas, no produjo grandes cambios en el porcentaje de callos producidos, ni en la composición de los mismos. Esto probablemente se deba a que en condiciones naturales el endosperma de arroz contiene en su

mayoría maltosa; por lo que es probable que al agregar este disacárido al medio de cultivo, mejore la calidad de los callos, tal como se demuestra en los estudios realizados por Biswas y Zapata en 1993, al añadir maltosa al cultivo de protoplastos de arroz (*Oryza sativa* L.), reportando que este carbohidrato es superior como fuente de carbono, a la sacarosa, en su capacidad de promover de regeneración plántulas.



Deshidratación:

Ante la falta de respuesta satisfactoria en la regeneración a partir de los callos, ya que sólo se observaban los inicios de actividad fotosintética en las periferias de los callos pero no el surgimiento de brotes, se realizó un tratamiento de deshidratación a la variedad de mayor éxito en el transcurso de toda la investigación. Tsukahara y Hirose (1992), han descrito este procedimiento para callos de arroz (*Oryza sativa* L.), tomando en cuenta que esta especie, y sobre todo en sus variedades indicas, es de un manejo delicado en el laboratorio, y que hay factores que afectan la capacidad de regeneración de los callos, como lo son las concentraciones y tipos de agentes gelificantes, y específicamente las combinaciones en las concentraciones de los reguladores de crecimiento; han reportado que el mantenimiento de la osmolaridad de

ambos medios (callogénesis y regeneración), son determinantes en la obtención y mantenimiento de una alta frecuencia de regeneración en callos de arroz. Aún cuando la literatura afirma que un estrés hídrico en callos de arroz, incrementa su capacidad morfogénica, esto no fue observado en nuestra investigación, probablemente es necesaria más investigación de dicho tratamiento.

Factores Físicos:

Otro de los requisitos importantes para la regeneración es el mantenimiento de las condiciones ambientales del cuarto de crecimiento. Una alteración en los ámbitos de temperatura y calidad de luz, traen como efecto la falta de desarrollo de brotes en los callos y por ende la no formación de callos maduros o "plántulas" (Roca y Mroginski 1991; Vasil y Thorpe 1994) . Esta característica fue la más difícil de controlar debido a que no se cuenta con un adecuado cuarto de crecimiento; por lo que no se pudo mantener constante la temperatura durante el proceso de regeneración, así como las horas de luz y sombra , que en algunos momentos, pasaron días sin poderlos establecer adecuadamente.

CONCLUSIONES

- La presencia del 2,4-D en el medio de cultivo, es importante para la inducción embriogénica en concentraciones de 1mgL^{-1} y 2mgL^{-1} . Arriba de 3mgL^{-1} puede ocasionar Variación Somaclonal o puede tener efectos tóxicos sobre el tejido.
- Las variedades X-10, CENTA A-1, CENTA A-5, CENTA A-6 y Keybonnet; en presencia de 1mgL^{-1} y 2mgL^{-1} 2,4-D, forman callos, siendo la variedad Keybonnet la que presentó los mejores resultados.
- Al combinar las concentraciones de 1mgL^{-1} y 2mgL^{-1} de 2,4-D con 20mgL^{-1} de L-Triptófano, favorecen el crecimiento y desarrollo de callos con características embriogénicas.
- La utilización de agua de coco, como fuente de nitrógeno, en forma de aminoácidos, favorecen enormemente el crecimiento y desarrollo de los callos de arroz.



- El azúcar comercial, como fuente de carbono en los medios de cultivo, produjo en ésta investigación, callos embriogénicos muy similares a los obtenidos utilizando sacarosa reactivo.
- La calidad e intensidad de la luz, así como las variaciones de temperatura son determinantes para el buen crecimiento de los callos y del desarrollo de embriones somáticos.



RECOMENDACIONES

- Se recomienda realizar otros estudios utilizando diferentes ámbitos de 2,4-D para las variedades CENTA A-2 y CENTA A-4, ya que los evaluados en la investigación no desempeñaron la función de inducción calogénica en éstas variedades, conociendo que los obstáculos que presentan algunos genotipos pueden ser obviados con altas concentraciones de los reguladores de crecimiento.
- Se recomienda la creación de un cuarto de crecimiento en la Escuela de Biología de la Universidad Nacional, para poder controlar los factores físicos de luz y temperatura ya que ambos son determinantes para el buen desarrollo y crecimiento, de los callos y los embriones somáticos.
- Se recomienda realizar estudios utilizando maltosa como fuente de carbono, dada su gran capacidad para promover regeneración en callos de arroz.

- Se recomienda que los estudios relacionados con cultivo de tejidos, se acompañen de una investigación histológica que determine el desarrollo y cambios ocurridos a nivel celular.
- Se recomienda incentivar la investigación básica en las diferentes técnicas de cultivo de tejidos, para contar con una base de datos propia de variedades salvadoreñas o de importancia nacional, así como actualizada.



BIBLIOGRAFIA

- ABDELNOUR-ESQUIVEL A. Y J.V. ESCALANT 1994. Conceptos Básicos de Cultivos de Tejidos Vegetales. Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). 38 pp.
- ADKINS S.W., SHIRAIISHI T. Y J.A. McCOMB 1990. Rice Callus Physiology Identification of Volatil Emissions and their Effects on Culture Grow. *Physiology Plantarum* 78:526-531.
- ADKINS, S.W. 1992. Cereal Callus Cultures. Control of Headspace Gases can Optimise the Conditions of Callus Proliferation. *Aust.J. Bot.* 40:434-449.
- AMMIRATO P., Evans D., Sharp W., y Yamada Y. 1984. Handbook of Plant Cell Culture. *Crop Science Vol. 3*, 234-244.
- ARIAS P.S. 1990. Biotecnología. Amenazas y Perspectivas para el Desarrollo de América Central. Editorial Departamento Económico de Investigación (DEI), San José, Costa Rica. 280 pp.
- BISWAS G.C. y ZAPATA F.J. 1993. High Frequency Plant Regeneration from Protoplast of Indica Rice (*Oryza sativa* L.) Using Maltose. *J. Plant Physiol.* Vol. 141 pp. 470-475.

- CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL 1981.
Producción de Arroz en El Salvador. M.A.G. La Libertad, El Salvador, pp
5-6.
- CENTRO NACIONAL DE TECNOLOGIA AGROPECUARIA Y FORESTAL 1995.
Programa de Granos Básicos, Cultivo de Arroz. M.A.G. La Libertad, El
Salvador, pp 1-9, 19.
- CHOWDRY C.N., Tyagi A.K., Maheswari N. Y Maheswari S.C. 1993. Effect of L-
proline and L-triptophan on Somatic Embryogenesis and Plant
Regeneration of Rice (*Oryza sativa*, cv Pulsa 169). *Plant Cell, Tissue and
Organ Culture* 32:357-361.
- DIXON R.A. 1987. *Plant Cell Culture: a Practical Approach*. Irl-Press. Oxford
England, 236 pp.
- EVANS D., Sharp W., Flick C.E. 1981. *Growth and Behavior of Cell Cultures:
Embryogenesis and Organogenesis*. En: Thorpe T. *Plant Tissue Culture*.
Academic Press, New York, pp. 45-114.
- GAUTHERET R.J. 1992. *History of Plant Tissue and Cell Culture a Personal
Account in Cell Genetics of Plants*. Academic Press. France, pp 2-50.
- GAMBORG O., Murashige T., Thorpe T., Vasil I.K. 1976. *Plant Tissue Culture
Media*. *In Vitro* 12:473-478.



- GUPTA H.S. Y A. PATTANAYAK, 1993. Plant Regeneration from Mesophyll Protoplast of Rice (*Oryza sativa* L.). Biotechnology Vol. II January.
- HALPERIN W. y WETHERELL D. 1964. Adventive Embryony in Tissue Culture of Wild Carrot (*Daucus carota*). Am.J.Bot. 512:274-283.
- JONES T.J. Y ROST L. 1989. Bot. Gaz. 150(1):41-49.
- KOHLNBACH H.W. 1978. Comparative Somatic Embryogenesis In: Trevor Thorpe 1978. Frontiers of Plant Tissue Culture. Depto. Of Biology, Calgary University. Canada, pp 59-66
- KUAN Y OSPINA 1990. Introducción a la Técnica de Cultivo de Tejidos. Instituto Nacional de Aprendizaje. San José, Costa Rica, 86 pp.
- KRIKORIAN A.D. 1991. Medios de Cultivo: Generalidades, Composición y Preparación. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, Cap. III, pp 41-76.
- LEE L., Scholl R.E., Grimes H.D. y Hoodges T.K. 1989. Plant Regeneration from Indica Rice (*Oryza sativa* L.). Protoplast. Planta, 178:325-333.
- LINDSEY K. Y M.G.K. JONES 1992. Biotecnología Vegetal Agrícola. Editorial Acribia S.A., España, 276 pp.

- LU C. y VASIL I.K. 1981. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Tissues *Paniculum maximum*. *Jacq.Theor.Appl.Genet.* 59:275-280.
- MENDOZA DE GYVES 1994. Agrobiotecnología. Grupo Editorial Iberoamericana. México, 79 pp.
- MITSUOKA K., Honda H., Xing X.H., Unno H. 1994. Effect of Intracellular 2,4-D Concentration on Plantlet Regeneration of Rice Callus. *Appl. Microbiol.Biothechnol.* 42:364-366.
- MINISTERIO DE AGRICULTURA Y GANADERIA, Octubre 1997. Informe de Coyuntura. Oficina de Análisis de Políticas Agropecuarias. El Salvador C.A., pp. 68-87.
- MONNIER M. 1974. Culture of Zygotic Embryos. In: Trevor Thorpe 1978. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Depto. of Biology. Calgary University. Canada, pp 277-286.
- MOREL G. y WETMORE R.H. 1951. Fren Tissue Culture. *Am.J. Bot.* 38:141-143.
- MURASHIGE T. Y SKOOG F. 1962. A Rivised Medium for Rapid Growth and Bioassays with tobacco Tissue Culture. *Physiol. Plant*, 15:473-497.
- PARSONS D., Berlijn J., Kichner F., Figueroa F. 1982. Arroz, Manual de Educación Agropecuaria. Editorial Trillas, Vol. II, 62 pp.



- PANIAGUA M.A. Y D. PORTILLO 1989. Evaluación de cuatro fechas de siembra en dos variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) por Pregerminación y Trasplante en Las Isletas, jurisdicción de Zacatecoluca. Seminario de Graduación para optar al Título de Ingeniero Agrónomo. Universidad de El Salvador, Departamento de Fitotécnia, 97 pp.
- RAMACHANDRAN C. y RAGHAVAN V. 1989. Changes in Nuclear DNA Content of Endosperm Cells during Grain Development in Rice (*Oryza sativa*). *Annals of Botany*, 64:459-468.
- ROCA W. y MROGINSKI L.A. 1991. Cultivo de Tejidos en la Agricultura, Fundamentos y Aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia, 399pp.
- ROBLE R.S. 1995. Diccionario Genético y Fitogenético. Editorial Trillas. México.197pp.
- RUEB S., Leneman M., Schilperoot R.A., Hensgens L.A., 1994. Efficient Plant Regeneration Through Somatic Embryogenesis From Callus Induced on Mature Rice Embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell* ,36:259-264.
- SIRAWARDANA S. Y N. MURRAY 1993. Tryptophan Enhancement of Somatic Embryogenesis in Rice. *Plant Physiol*, 73:142-146.

- SIVAMANI E., Shen P., Opalka N., Beachy R., Fallquet M., 1996. Selection of Large Quantities of Embryogenic Calli from Indica Rice Seeds for Production of Fertile transgenic Plants Using the Biolistic Method. *Plant Cell Reports*, 15: 322-327.
- SMITH M.K. y A. DREW 1990. *Aust. J. Plant Physiol.* 17:267-289.
- STEWART F.C., MAPES M.O., y SMITH J. 1958. Growth and Organized Development of Cultured Cells. I. Growth and Division of Freely Suspended Cells. *Am.J.Bot.* 45:693-703.
- SUZUKI K., Miyake H., Taniguchi T., Maeda E., 1993. *Japanese Journal of Crop Science*. Vol. LXIL No. 1.
- TSUKAHARA M. y T. HIROSAWA 1992. Simple Dehydration Treatment Promotes Plantlet Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) Callus. *Plant Cell Reports*, 11:550-553.
- VASIL V. y VASIL I.K. 1980. Isolation and Culture of Cereal Protoplast, 2: Embryogenesis and Plantlet Formation from Protoplast of *Pennisetum americanum*. *Theor. Appl. Genet.* 56:97-100.
- VASIL I.K. y T. THORPE 1994. *Plant Cell and Tissue Culture*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands, pp. 293- 313.

- VASIL I.K. y V. VASIL 1990. Embriogenic Callus, Cell Suspension and Protoplast Culture of Cereals. *Plant Tissue Culture Manual*, B1:1-16.
- WANG D., P. MILLER Y M. SONDALH 1989. Plant Regeneration from Protoplast of Indica Types Rice and CMS Rice. *Plant Cell Reports*, 8:329-332.
- WETHERELL D.F. 1984. *Plant Cell Tissue Organ. Cult.* 3:221-227.
- WILLIAMS E.G. y G. MAHESWARAN 1986. Somatic Embriogenesis; Factors Influencing Coordinated Behaviour of Cell as an Embriogenic Group. *Annals of Botany*, 57:443-462.
- YATAZAWA M., K. FUREHASHI., M. SHIMIZO 1967. Growth of Callus Tissue from Rice Root *In Vitro*. *Plant & Cell Physiol.*, 8:363-373.
- YIN Y., Chen Y., Gou H., Tian W., Chen Y., Li L., 1992. Fertile Plants Regeneration from Suspension Culture-Derived Protoplast of an Indica Type Rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 32:61-68.
- ZIMMERMAN J.L. 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, Vol. 5: 1411-1423.





GLOSARIO

ACAME: Caída de las plantas en el campo debida a la debilidad de los tallos; éste es un problema importante para cereales como el arroz y el trigo.

AGAR: Sustancia gelatinosa producida por algunas algas rojas; utilizado como gelificante de medios de cultivo, generalmente para bacterias.

ALEURONA: Material especial que se encuentra en la capa externa del endosperma de la semilla de las gramíneas como el arroz, maíz y trigo; por lo general se trata de un material granuloso compuesto básicamente por proteínas.

AUXINA: Compuesto químico-orgánico hormona que promueve en plantas, entre otros efectos, la elongación o volumen celular. Regulador de crecimiento.

BIOTECNOLOGIA: Manipulación de organismos, tejidos, células o moléculas para aplicaciones específicas en beneficio del hombre.

CALLO: Tejido en forma de tumor que está formado por células de paredes delgadas que se desarrolla sobre las heridas o en respuesta a la aplicación de auxinas y reguladores de crecimiento.

DORMANCIA: Período inactivo en el proceso de germinación de semillas, bulbos y otros órganos de plantas; aún cuando las condiciones ambientales sean favorables.

FASCIACION: Cambio en la morfología normal de algunas estructuras de las plantas como puede ser tallos aplanados, modificación en el número y forma de las hojas, ramas y frutos. En el ajonjolí, es frecuente la fasciación de tipo hereditario y no por mutantes somáticos o por lesiones en el tejido meristemático.

PROTOPLASTO: Sustancia de la célula donde se incluye el citoplasma y el núcleo.

QUIESCENCIA: Período en el cual la semilla u otras partes de la planta, no germina o se desarrolla hasta contar con las condiciones medio ambientales requeridas para su crecimiento.

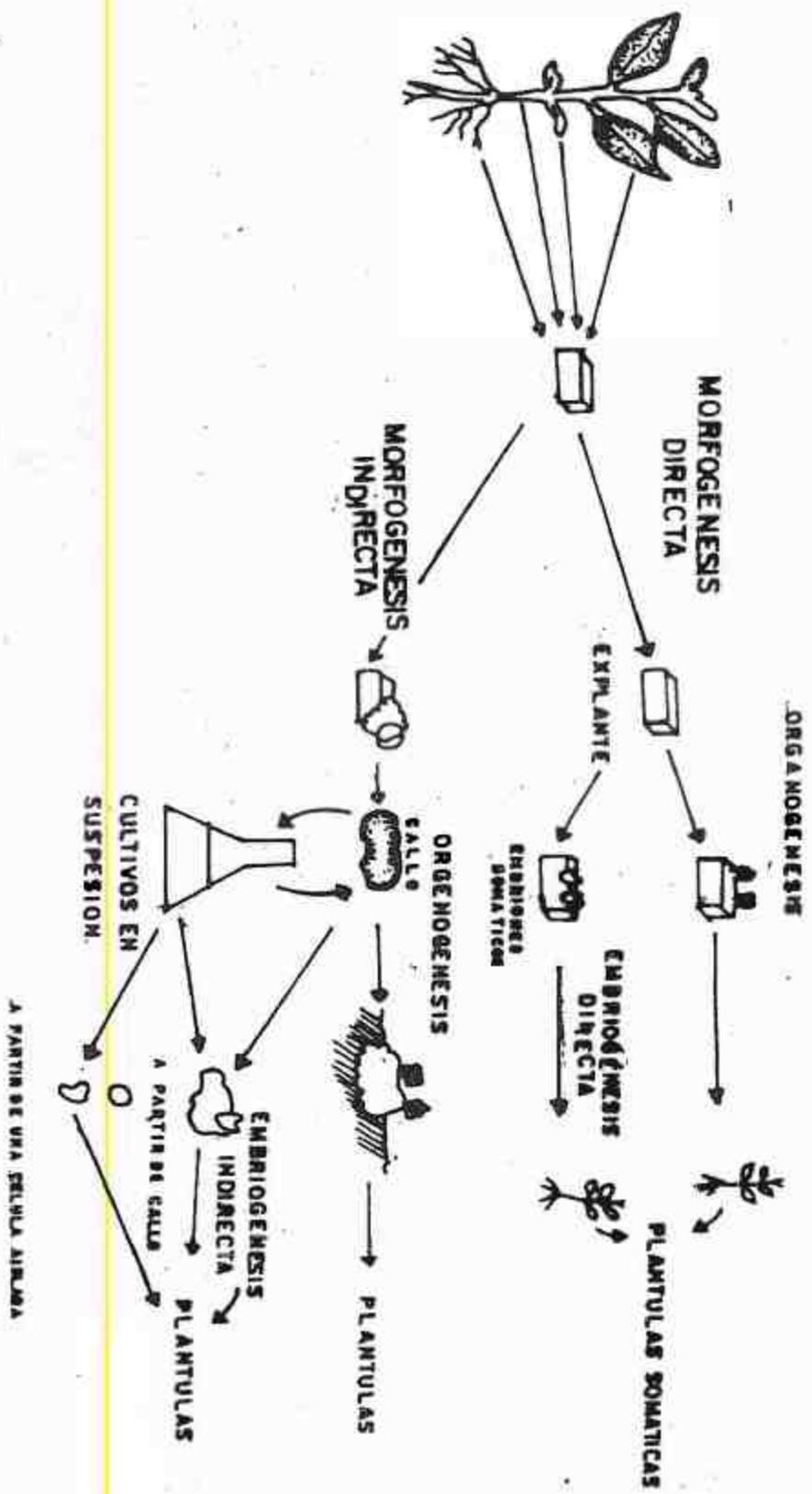
REGULADOR DE CRECIMIENTO: Sustancia activa en el control del crecimiento y desarrollo de las plantas; puede ser un compuesto tanto natural como sintético.

VARIACION SOMACLONAL: Variación inducida, u obtenida en la regeneración de una planta, con el uso de Colchicina, para obtener características hereditarias deseadas.

ANEXOS



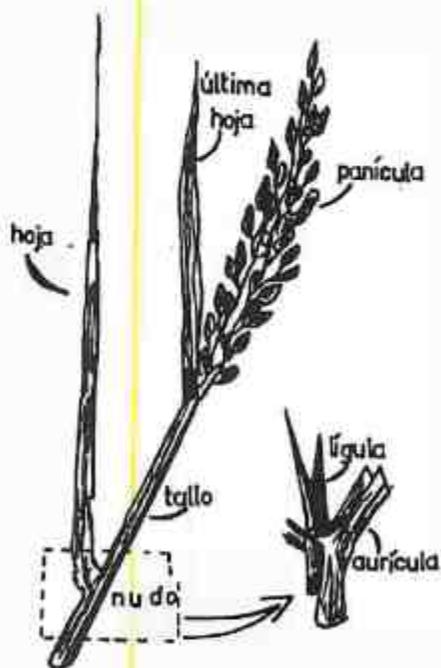
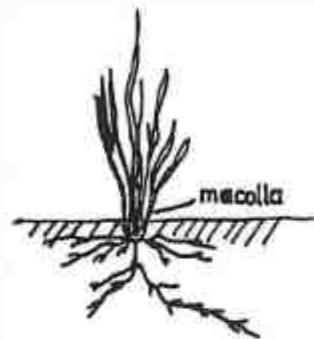
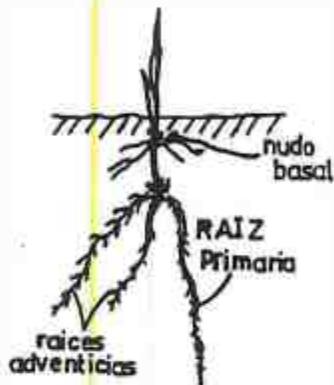
ANEXO I REGENERACION DE PLANTAS



Fuente: Kuan y Ospina 1990.

ANEXO2

DESCRIPCIÓN BOTÁNICA DE LA PLANTA DE ARROZ (*Oryza sativa* L.)



Fuente: Parsons et al. 1991.

ANEXO 3

CARACTERÍSTICAS BÁSICAS DE LAS PRINCIPALES VARIEDADES DE ARROZ RECOMENDADAS EN EL SALVADOR, 1981

Características Básicas / Variedades	Vigor o desarrollo Inicial	Amacollamiento	Acame	Tipo de Grano	Rendimiento qq/ M ₂	Reacción a Pycnularia
X-10	Muy Vigoroso	Abundante	Susceptible	Largo	30 - 100	Susceptible
CICA-4	Intermedio	Abundante	Intermedio	Largo	30 - 100	Susceptible
CICA-6	Lento	Abundante	Resistente	Largo	70 - 80	Tolerante
NILO-1	Muy vigoroso	Intermedio	Susceptible	Extensión Largo	80 - 100	Tolerante
NILO-3	Muy vigoroso	Intermedio	Susceptible	Extensión Largo	80 - 90	Tolerante
MASOL 1	Muy vigoroso	Abundante	Resistente	Extensión Largo	80 - 100	Tolerante
CENTA A-1	Vigoroso	Abundante	Intermedio	Largo	70 - 80	Moderadamente Susceptible

FUENTE: CENTA, 1981.

ANEXO4

CARACTERÍSTICAS AGRONÓMICAS DE LAS VARIETADES DE ARROZ RECOMENDADAS POR CENTA EL SALVADOR 1993.

Características	CENTAA-1	CENTAA-2	CENTAA-4	CENTAA-5	(CENTAA-6)
1- Vigor	B	B	B	MB	MB
2- Macollamiento	B	MB	B	MB	B
3- Días a Flor	95	105	85	104	103
4- Días a Madurez	125	135	120	127	131
5- Altura Planta (cm)	80-100	90-100	80-100	90-100	98
6- Acame	MR	MR	I	R	R
7- Desgrane	MuyR	MS	R	R	R
8- Piricularia hoja	MS	R	R	R	R
9- Piricularia Cuello	MS	R	R	R	R
10- Helminthosporiosis	MR	M	MS	MR	MR
11- Escaldado	MS	MR	MS	MR	R
12- Rendimiento Potencial qq/ M ₂	100	100	100	138	140
CALIDAD DE GRANO					
1- Rend. Molienda (%)	66.40	66.00	69.00	69.36	70.8
2- Grano quebrado (%)	12.61	22.21	11.73	16.64	23.3
3- Grano yesoso (%)	6.70	7.10	7.10	10	3.9
4- Tipo de Grano	Largo	Largo	Largo	60 Ext. Largo	Largo

* Próxima a liberarse

I= intermedio MB= Muy Bueno
 B= Bueno MR= Moderadamente Resistente
 R= Resistente MS= Moderadamente Susceptible

Fuente: CENTA 1995.



ANEXOS

PROTOCOLO PARA LA PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO, MURASHIGE & SKOOG.

A) Solución Stock I (para un litro de solución)

NH ₄ NO ₃ (nitrato de amonio).....	165 g
KNO ₃ (nitrato de potasio).....	190 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O (cloruro de calcio).....	43.98g

B) Solución Stock II (para un litro de solución)

MgSO ₄ ·7H ₂ O (sulfato de magnesio).....	74 g
MnSO ₄ ·2H ₂ O (sulfato de maganeso).....	4.46 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O (sulfato de zinc).....	1.72 g
CuSO ₄ ·5H ₂ O (sulfato de cobre).....	0.05 g en 100ml de agua destilada, para agregar 10 ml de ésta disolución a la Solución Stock II.

C) Solución Stock III (para un litro de solución)

H ₃ BO ₃ (ácido bórico)	1.24 g
KH ₂ PO ₄ (fosfato de potasio).....	34 g
KI (ioduro de potasio).....	0.166 g
NaMoO ₄ ·12 H ₂ O (molibdato de sodio)....	0.05 g
CoCl ₂ ·6H ₂ O (cloruro de cobalto).....	0.05 g en 100ml de agua destilada, para agregar 10ml de ésta disolución a la Solución Stock III

D) Solución Stock IV (para un litro de solución)

FeNa EDTA·3H ₂ O	8.42 g
Pesar 3.73 g de Na EDTA y 2.78 g de FeSO ₄ ·7H ₂ O disueltos en 100 ml de agua destilada y adicionar 10 ml para un litro de medio.	

E) Un litro de medio MS se prepara con 10ml de la Solución Stock I, y 5ml de cada una de las Soluciones Stock II, III y IV.

F) Preparar disoluciones de 100 g / 100 ml; y agregar 2ml de cada uno a la solución madre:

Glicina
Tiamina HCl
Piridoxina HCl
Ácido Nicotínico

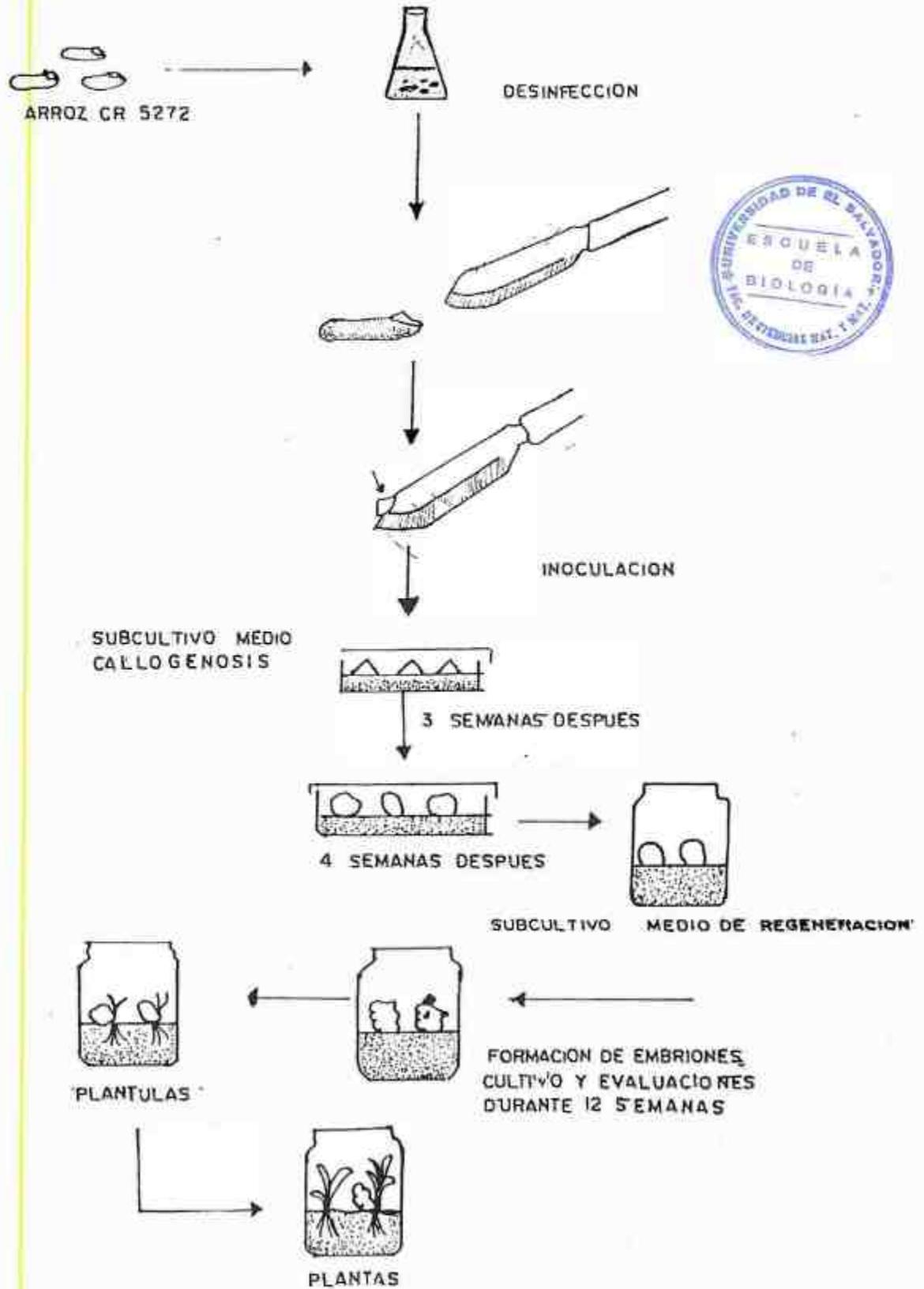


ANEXO 6
HOJA DE EVALUACIÓN

EVALUACIÓN PARA CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN DE ARROZ		S. S. ESC. DE BIOLOGÍA						
FECHA DE EVALUACION: EVALUADOR:		VARIEDAD: EXPLANTE:		FECHA INOCULACIÓN:		MEDIO CALLOGÉNESIS: MEDIO REGENERACION:		
No. Recip.	No. Explan.	No. Callos 1a. Eval.	% Callogén.	No. Contm.	No. Necros.	NO Respn.	No. Callos Transf. MSR 1a. Evalua. 2a. Evalua.	fecha de Transf. A MSR hora día
PROMEDIO:								
DESVIA. ESTAND:								

ANEXO 7

SIEMBRA Y SUBCULTIVO DE MATERIAL EXPLANTE

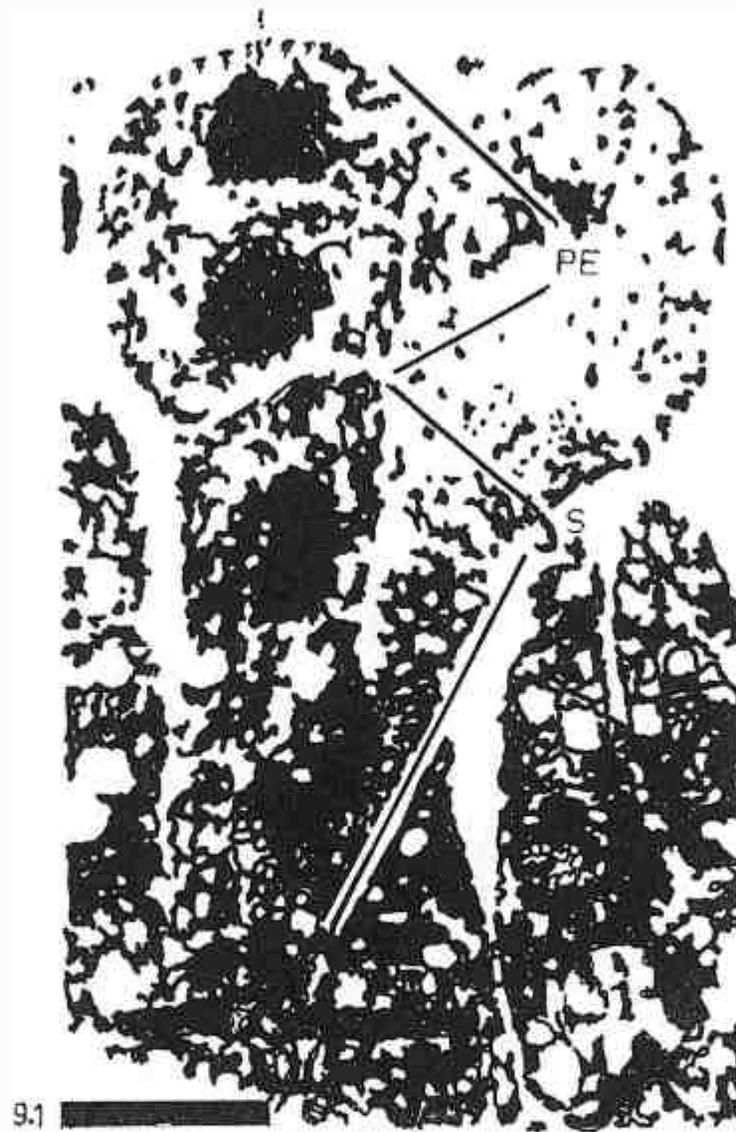


ANEXO8

	A1			A2			A4			A5			A6			X-10			K			Callos %							
	C%	G%	X	E	C%	G%	X	E	C%	G%	X	E	C%	G%	X	E	C%	G%	X	E	C%		G%	X	E				
1 Germinación	100				100				100				100				100				100								
2,4 D																													
1 mg	100	20	5,0	0										100	50	5,0	0							5,0	0	100			
			1,0	0,02										100	40	2,5	0,02							3,0	0,03				
2 2 mg	80	60	3,0	0,01					100	70	5,0	0											5,0	0	92%				
	80		3,0	0,02						3,5	0,02												2,5	0,03	100	68	3,4	0,01	
3 mg	0																												
2,4 D+T																													
1 d 20 T	82	70	4,1	0,02					85	88	9,3	0,3		92	62	4,6	0,02						88	4,6	0,3	96	9	4,5	0,01
			3,5	0,01						4,9	0,4				3,1	0,3							4,4			90	4,8	0,03	
2 d 20T	100	0	5	0					100	32	5	0		100	14	5	0						0	5	0	100	44	5	0,3
			0	0						1,8	0,05				0,7	0,5							0	0	0		2,2	0,2	
1 d 40T	0	0	0	0					74	6	3,7	0,03		100	0	5	0						0	3,6	0,03	4	0	0,2	0,4
			0	0						0,3	0,1				0	0							0	0	0		0	0	0
2 d 40T	100	0	5	0					100	24	5	0		100	18	5	0						6	5	0	100	58	5	0
			0	0						1,2	0,02				0,9	0,4							0	0	0		2,9	0,45	
1 d 60 T	90	0	9,5	0,02					68	56	3,4			52	4	3,1	0,01					6	4	0,02	100	18	5	0	
			0	0						2,8	0,01				0,2	0,03							0	0	0		0,9	0,5	
2 d 60 T	70		3,5	0					44	10	2,2	0,01		72	2	3,6	0,3					0	3,1	0,015	56	5	2,8	0,04	
			0	0,02						0,5	0,03				0,1	0,5							0	0	0		0,03		
2,4 + T + Ac																													
1 d 20T + 5 ml	52	46	2,5	0,021					66	56	3,4	0,05		80	98	3,0	0,01					52	48	2,6	0,03	64	48	3,2	0,01
			2,4	0,02						2,8	0,05				2,9	0,05							2,4	0,2			2,4	0,2	
4 1 d 20T + 10 ml	56	52	2,8	0,021					58	48	2,8	0,01		50	40	2,5	0,02					60	40	3,0	0,15	56	52	2,8	0,04
			2,6	0,02						2,4	0,03				2,0	0,01							2,0	0,1			2,6	0,3	
2 d 20T + 5 ml	56	36	2,8	0,021					64	56	3,2	0,06		56	40	2,5	0,3					60	40	3,0	0,05	56	48	2,2	0,04
			1,8	0,3						2,8	0,01				2,0	0,01							2,0	0,1			2,4	0,02	
2 d 20T + 10 ml	40	32	2	0,3					52	44	2,6	0,3		40	36	2,0	0,01					48	40	2,4	0,02	48	36	2,4	0,01
			1,6	0,01						2,2					1,8	0,06							2,0	0,1			1,8	0,3	
Azucar React.																													
1 d 20T + 30 Sac	42	40	2,1	0,05					48	44	2,4	0,02		46	40	2,3	0,1					46	44	2,3	0,015	44	40	2,2	0,03
			2,0	0,1						2,2	0,01				2,0	0,01							2,2	0,3			2,0	0,2	
2 d 20T + 30 Sac	38	28	1,9	0,03					44	40	2,2	0,01		36	35	1,9	0,1					40	28	2,0	0,01	40	36	2,0	0,01
			2,4	0,01						2,0	0,1				1,8	0,2							2,4	0,02			1,8	0,2	

C% : Porcentajes de Callos
 G% : Porcentaje de Callos a medio de Regeneración
 X : Promedio de Callos por frasco
 E : Desviación Estándar de X

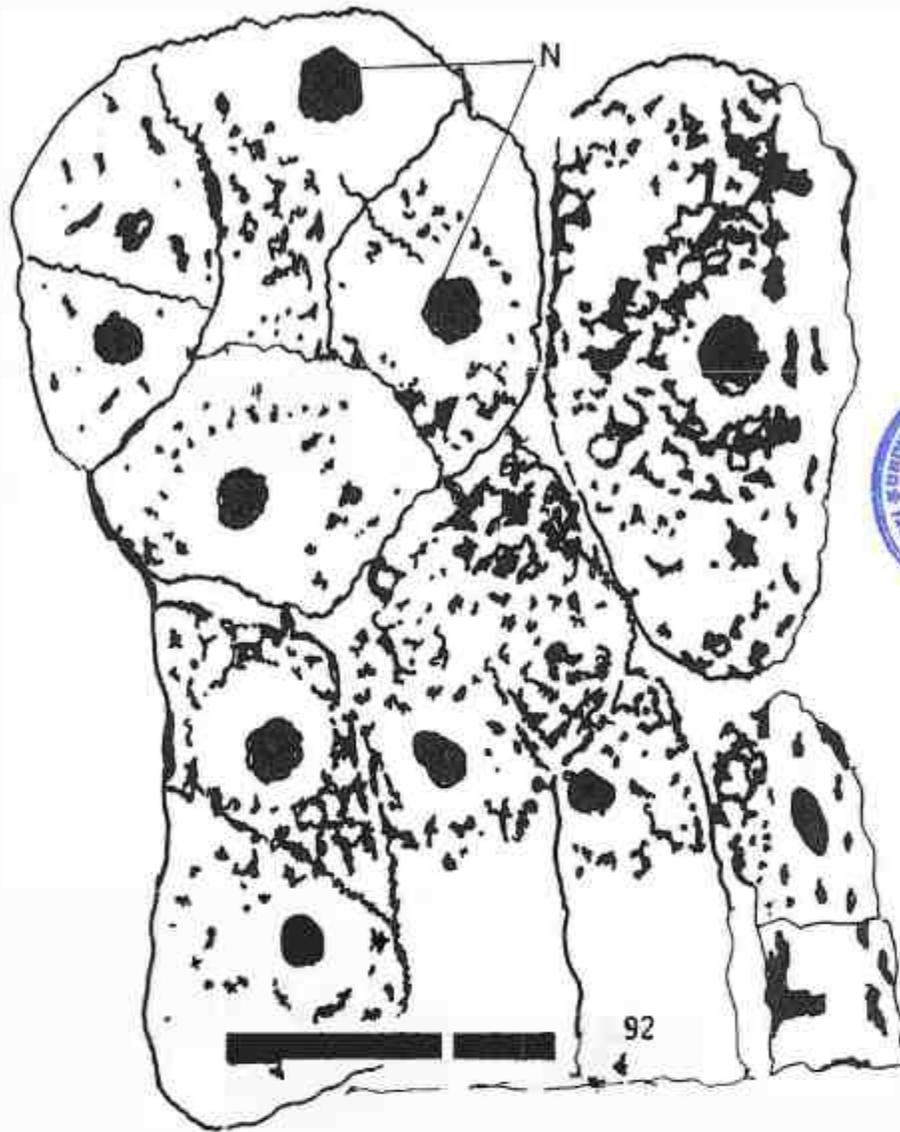
CARACTERÍSTICAS DE LAS CÉLULAS EN EL PROCESO
DE EMBRIOGÉNESIS SOMÁTICA EN ARROZ.



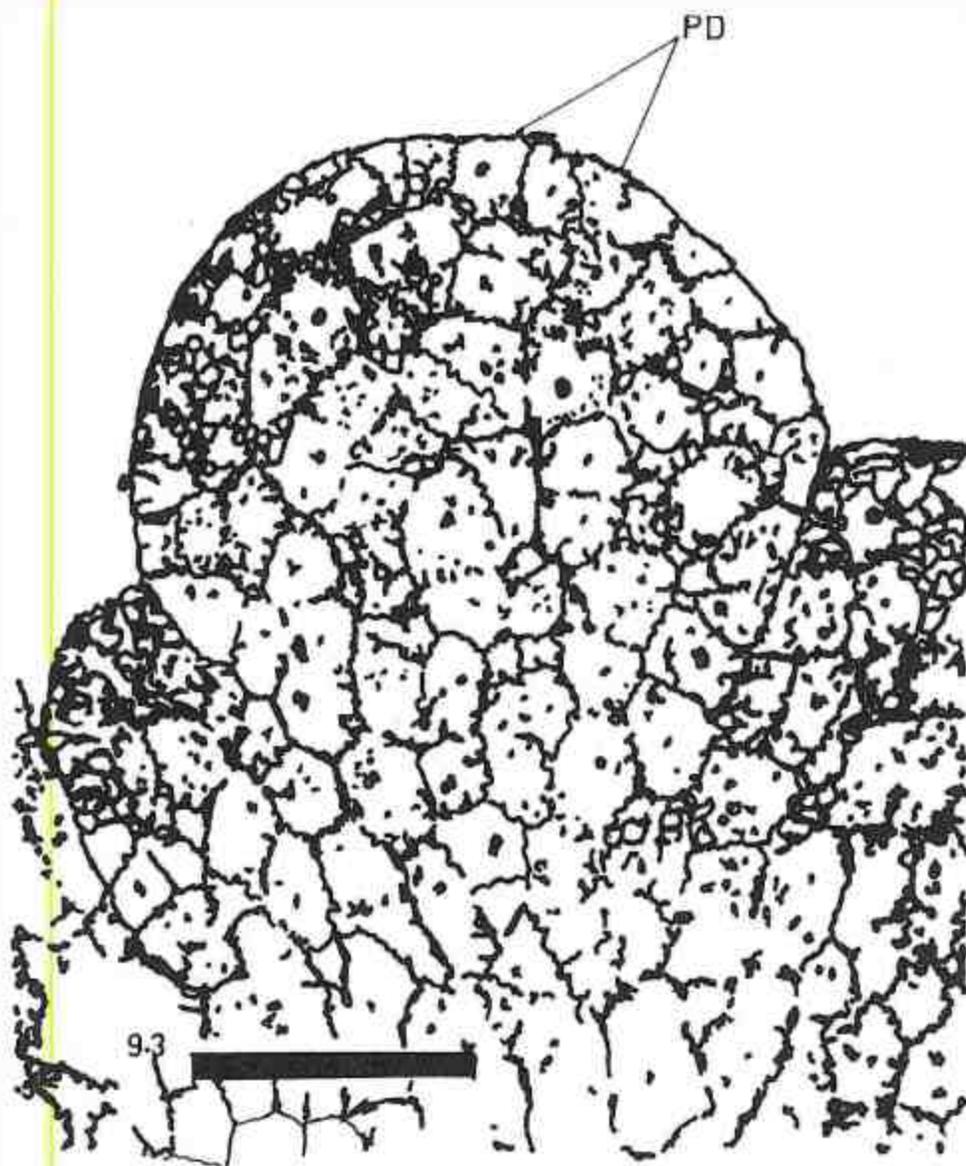
Anexo 9.1 Células epidérmicas después de tres días de cultivo.

Las células basales se han dividido para formar el suspensor(S), y las células terminales forman el pro-embrión. (PE).

Fuente: Jones y Rost 1989.



Anexo 9.2 El embrión somático globular de ocho células. Nótese el prominente núcleo (N).



Anexo 9.3 Embrión globular con protodermis (PD) a los diez días de cultivo.

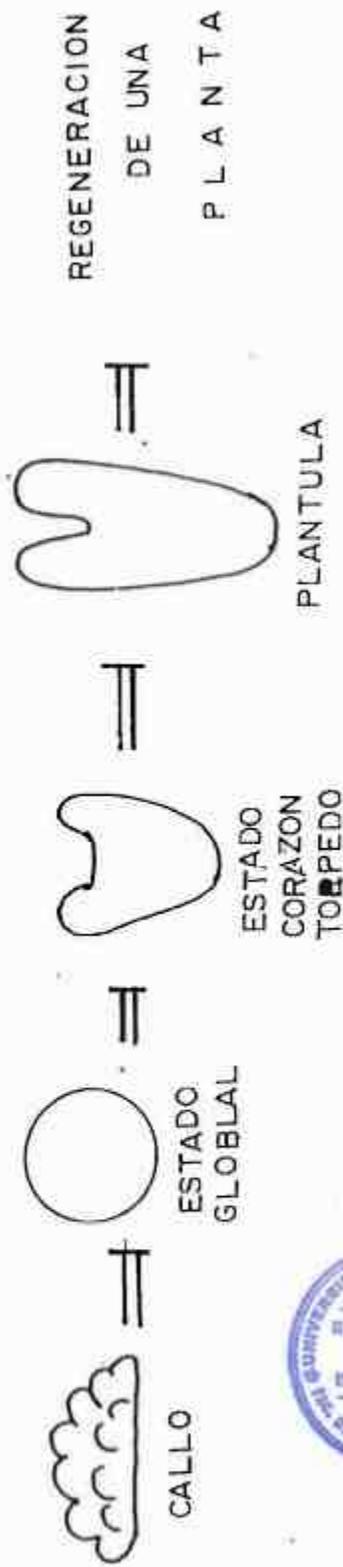


Anexo 9.4 Embrión maduro a los 21 días de cultivo. Nótese la formación del escutelo (Sc).

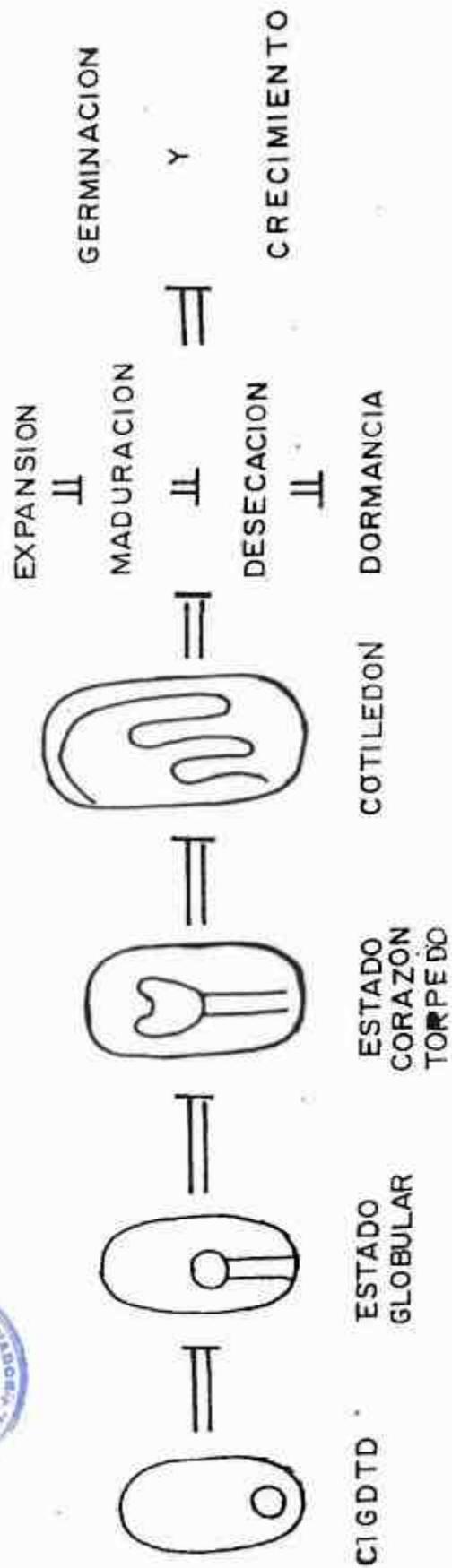
ANEXO 10

DIFERENCIAS ENTRE EMBRIONES SOMÁTICOS Y EMBRIONES CIGÓTICOS.

EMBRIONES SOMÁTICOS



EMBRIONES CIGÓTICOS



ANEXO II

ALGUNOS COMPONENTES ORGÁNICOS DEL AGUA DE COCO (AC).

Aminoácidos:

- Aspártico, glutámico, serina, aminobutírico, aspargina, glicina, β - alanina, treonina, histidina, glutamina, arginina, lisina, valina, metionina, tirosina, prolina, homoserina, fenilalanina, hidroxiprolina.

Otros compuestos nitrogenados:

- Amonio, etanolamina, dihidroxifenilalanina.

Ácidos orgánicos:

- Shikimico, quínico, pirrolidona-carboxílico, succínico, málico, cítrico y desconocidos.

Azúcares:

- Sacarosa, Glucosa, Fructuosa.

Alcoholes de azúcar:

- Sorbitol, m-Inositol, siloinocitol.

Vitaminas:

- Ácido nicotínico, ácido pantoténico, biotina, riboflavina, ácido fólico, tiamina, piridoxina, ácido ascórbico.

Sustancias de crecimiento:

- Auxina, giberelina, 1,3-Difenilurea, zeatina, glucósido de zeatina, ribósido de zeatina.

Otros:

- ANR- polimerasa, uracilo, adenina, leucoantocianinas, fosfatasa ácido, diastasa, deshidrogenasa, peroxidasa, catalasa.