



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

Optimización de un sistema de cultivo *in vitro* y regeneración para variedades colombianas de arroz (*Oryza sativa* ssp. *indica*).

Iván Darío Barbosa Cepeda

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia
2012

Optimización de un sistema de cultivo *in vitro* y regeneración para variedades colombianas de arroz (*Oryza sativa* ssp. *indica*).

Iván Darío Barbosa Cepeda

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título de:

Magíster en Ciencias-Biología

Director (a):

Ph.D., I. A. Alejandro Chaparro Giraldo

Línea de Investigación:

Genética

Grupo de Investigación:

Grupo de Ingeniería Genética de Plantas

Universidad Nacional de Colombia
Facultad de Ciencias, Departamento de Biología
Bogotá, Colombia

2012

“Simplex sigillum veri”

Hermann Boerhaave

A mis padres.

Agradecimientos

Deseo expresar mis más sinceros agradecimientos a las siguientes instituciones y personas:

A la Universidad Nacional de Colombia – Facultad de Ciencias, por la formación recibida en estos años de Maestría, y por el apoyo institucional al desarrollo de la tesis.

Al Departamento Administrativo de Ciencia, Tecnología e Innovación – Colciencias, programa Jóvenes Investigadores e Innovadores “Virginia Gutiérrez de Piñeres”, por la financiación parcial del proyecto.

A la Federación Nacional de Arroceros – Fondo Nacional del Arroz, por el suministro de insumos para el proyecto.

Al profesor Alejandro Chaparro Giraldo, Ph.D., por la dirección del proyecto.

Al profesor Xavier Marquínez, Ph.D., del Departamento de Biología, por su asesoría durante la ejecución del proyecto, particularmente en los trabajos de histología. A la profesora Argenis Bonilla, Ph.D., y a Carolina Becerra, del laboratorio de biología de plantas del Departamento de Biología, por el préstamo del equipo de microfotografía.

A mis compañeras del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, Leidy Yanira Rache Cardenal, MSc., Jennifer Blanco Martínez, (c)MSc, Leidy Andrea Ávila Sánchez, MSc. y Diana Angélica Gómez, (c)MSc., por su colaboración, consejos y compañía durante estos años de formación

Resumen

Con el fin de contribuir a la obtención de plantas transgénicas de arroz por parte del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, se planteó la mejora del protocolo de cultivo *in vitro* y regeneración en uso. Para ello, se modificaron las concentraciones de los reguladores utilizados a lo largo de cada etapa del proceso de cultivo, utilizando dos variedades de importancia comercial. Adicionalmente se evaluaron otros factores como la posición de la semilla y el tiempo de exposición a los reguladores. Como resultado, se encontró que la modificación de las concentraciones de reguladores para las etapas de inducción de callo y cocultivo repercute de forma negativa en la regeneración. Sin embargo, es posible incrementar el porcentaje de formación de callo cambiando la posición de siembra de la semilla. En la etapa de regeneración propiamente dicha, para la variedad FEDEARROZ 2000 se encontró que una combinación de 1,0 mg/L ANA + 4,0 mg/L KIN aumenta el porcentaje de regeneración, sin incrementar la cantidad de brotes anormales y sin disminuir de forma considerable el tamaño de los brotes. Para la variedad FEDEARROZ 50, la mejor combinación de reguladores durante la regeneración es de 0,5 mg/L ANA + 2,0 mg/L KIN. Adicionalmente, se encontró que el tiempo de formación del callo influye negativamente en el potencial de regeneración. Finalmente, se presentan los resultados de un primer estudio histológico de inducción de callo y embriogénesis somática para F2000.

Palabras clave:

Arroz colombiano, embriogénesis somática, reguladores de crecimiento vegetal, biotecnología vegetal.

Abstract

In order to contribute with the production of transgenic rice by the Plant Genetic Engineering Group, the improving of the *in vitro* culture and regeneration protocol currently in use was proposed. In order to do so, the amount of plant growth regulators used in each step of the process was modified, using two commercial rice varieties. Additionally, other factors such as the seed position and time of exposition to growth regulators were tested. It was found that the increase of 2,4-D during callus induction and coculture have a negative impact in regeneration potential. However, the amount of calli produced can be increased by modifying the position in which the seed is placed on the culture medium. During the regeneration stage, for variety FEDEARROZ 2000, a combination of 1,0 mg/L ANA + 4,0 mg/L KIN increases the number of shoots, without raising the amount of abnormal plants formed and without reducing the size of the shoots considerably. For variety FEDEARROZ 50, the best combination of growth regulators during regeneration is 0,5 mg/L ANA + 2,0 mg/L KIN. In addition, it was found that the time of callus formation affects negatively the regeneration potential. Finally, the results of an initial histological study on callus induction and somatic embryogenesis for F2000 are presented.

Keywords: colombian rice, somatic embryogenesis, plant growth regulators, plant biotechnology.

Contenido

Resumen	IX
Abstract.....	X
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tablas	XIV
Lista de Símbolos y abreviaturas.....	XV
Introducción.	1
1. Marco teórico.....	5
1.1 Generalidades sobre el cultivo del arroz.....	5
1.1.1 Origen y clasificación taxonómica.	5
1.1.2 Importancia económica.	6
1.2 Mejoramiento genético vegetal.....	7
1.2.1 Mejoramiento convencional.....	8
1.2.2 Biotecnología.	8
1.2.3 Ingeniería genética.....	10
1.3 Cultivo de tejidos vegetales.....	12
1.3.1 Organogénesis.....	14
1.3.2 Embriogénesis somática.	15
1.4 Mejoramiento genético del arroz.	16
1.4.1 Métodos convencionales.....	16
1.4.2 Métodos biotecnológicos: ingeniería genética y cultivo de tejidos vegetales.	17
1.4.3 Avances en mejoramiento genético del arroz en Colombia.	22
2. Objetivos.....	25
3. Materiales y métodos.	27
3.1 Aspectos generales.	27

3.1.1	Material biológico.....	27
3.1.2	Desinfección superficial y siembra.....	27
3.1.3	Medios de cultivo.....	27
3.1.4	Protocolo de partida.....	28
3.2	Observaciones histológicas sobre el desarrollo del callo.....	28
3.3	Efecto del 2,4-D sobre la formación de callo.....	29
3.4	Efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo. 29	
3.5	Efecto del 2,4-D y la edad del callo sobre el potencial de regeneración.	30
3.6	Efecto del 2,4-D utilizado en el medio de cocultivo en la regeneración.	31
3.7	Efecto de los reguladores sobre el potencial de regeneración del callo.....	32
3.8	Análisis estadístico.....	34
4.	Resultados y discusión.....	35
4.1	Observaciones morfológicas e histológicas sobre desarrollo de callo.	35
4.2	Efecto del 2,4-D sobre la formación de callo.....	41
4.3	Efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo. 43	
4.4	Efecto del 2,4-D y la edad del callo sobre el potencial de regeneración.	44
4.5	Efecto del 2,4-D utilizado en el medio de cocultivo en la regeneración.	47
4.6	Efecto de los reguladores sobre el potencial de regeneración del callo.....	50
5.	Conclusiones y recomendaciones.....	59
A.	Anexo: Protocolos de desinfección e histotecnia.....	61
B.	Anexo: Protocolo de cultivo de tejidos y regeneración de Perafán (2011), modificado a partir de Saharan <i>et al.</i> (2004a).....	65
	Bibliografía.....	67

Lista de figuras

Figura 4-1: Callos de tres semanas de F2000 y F50.....	35.
Figura 4-2: Primeras etapas de la embriogénesis cigótica en maíz. Tomado de Zimmermann & Werr (2005).....	36
Figura 4-3: Iniciación del callo.	37
Figura 4-4: Etapas iniciales de la embriogénesis somática.....	38
Figura 4-5: Diferentes estados de la embriogénesis sobre callos de nueve días.....	39
Figura 4-6: Porcentaje de formación de callos por tratamiento y variedad.....	41
Figura 4-7: Peso seco promedio de callo formado por tratamiento y variedad.....	42
Figura 4-8: Efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo.	43
Figura 4-9: Callos de F2000 y F50, a 3 semanas de regeneración.....	44
Figura 4-10: Porcentaje de regeneración para F2000 por tratamiento y tiempo de formación de callo.	45
Figura 4-11: Porcentaje de regeneración para FEDEARROZ 50 por tratamiento y tiempo de formación de callo.	46
Figura 4-12: Efecto de la concentración de 2,4-D usada durante el cocultivo en la regeneración.	48
Figura 4-13: Porcentajes de regeneración para F2000 y F50 por tratamiento.	51
Figura 4-14: Brotes de F2000 por tipo morfológico. A y B: tipo 1; C: tipo 2; D: tipo 3.....	52
Figura 4-15: Porcentaje de brotes de F2000 por tipo morfológico y tratamiento.	53
Figura 4-16: Brotes de F50 por tipo morfológico. A y B: tipo 1; C: tipo 2; D: tipo 3.....	54
Figura 4-17: Porcentaje de brotes de F50 por tipo morfológico y tratamiento.	54
Figura 4-18: Diagrama de cajas y bigotes de biomasa por tratamiento para F2000.	55
Figura 4-19: Diagrama de cajas y bigotes de biomasa por tratamiento para F50.	56

Lista de tablas

Tabla 3-1: Proporciones y concentraciones de auxina (AUX) / citoquinina (CIT) en mg/L.	33
Tabla 3-2: Tratamientos utilizados durante la regeneración para las variedades F2000 y F50.	34

Lista de Símbolos y abreviaturas

Abreviaturas

Abreviatura	Término
<i>2,4-D</i>	Ácido 2,4-Diclorofenoxiacético.
<i>AIA</i>	Ácido Indolacético.
<i>ANA</i>	Ácido Naftalenacético.
<i>AUX</i>	Auxina.
<i>BAP</i>	6-Bencilaminopurina.
<i>CIT</i>	Citoquinina.
<i>F2000</i>	FEDEARROZ 2000.
<i>F369</i>	FEDEARROZ 369.
<i>F50</i>	FEDEARROZ 50.
<i>KIN</i>	Kinetina.
<i>miRNA</i>	Micro RNA.
<i>MS</i>	Murashige & Skoog

Introducción.

Uno de los mayores retos para la humanidad hacia el futuro, es resolver el problema de la alimentación para una población creciente. El arroz es uno de los cultivos sobre los que se basa el suministro alimenticio de gran parte del planeta (Ramesh *et al.* 2004, Ignacimuthu & Arockiasamy 2006, Sang & Ge 2007, FAO 2012), lo cual resalta la importancia de la investigación encaminada al mejoramiento y sostenibilidad del mismo. Si bien es cierto que el mejoramiento genético convencional, sumado a mejores prácticas agronómicas, ha permitido un incremento sustancial en la producción mundial de arroz, es necesario también reconocer las limitaciones a las que se enfrenta el método clásico (Chrispeels & Sadava 2003, Fernie *et al.* 2006). La biotecnología por sí sola no puede reemplazar al mejoramiento convencional, sin embargo, es una herramienta valiosa que permite abordar problemas que antes no podían ser resueltos mediante los métodos tradicionales (Poehlman & Allen 2005, Sharma *et al.* 2005). En cualquier caso, debe considerarse a la transgénesis como una parte más del proceso de mejoramiento genético, y no como un sistema de mejoramiento en sí mismo.

Colombia no es un gran productor de arroz a nivel mundial. No obstante, este cultivo ocupa un renglón muy importante dentro de la economía agrícola nacional, y aporta riqueza y empleos (Martínez *et al.* 2005, Fedearroz 2008). Gracias a los programas de mejoramiento convencional, ha sido posible incrementar la producción por unidad de área, además de desarrollar variedades de amplia aceptación en el mercado nacional por sus características agronómicas y culinarias (Diago 2003). Sin embargo, éstos programas se enfrentan a los mismos problemas a los que se ven enfrentados los programas de todo el mundo. Además de las limitaciones propias del método, existe el inconveniente de la reducción en la diversidad genética del arroz, asociada a múltiples factores, incluyendo el propio desarrollo del mejoramiento convencional (Chrispeels & Sadava 2003, Able *et al.* 2006, Fernie *et al.* 2006). Hoy se estima que el arroz ha perdido una gran parte de su diversidad genética original como consecuencia del cuello de botella generado tanto durante su domesticación, como por la selección de genotipos por el mejoramiento convencional (Sang & Ge 2007).

Ante este panorama, resulta crucial la adopción de nuevas tecnologías y su incorporación a los programas de mejoramiento de arroz en el país. Pese a que ya se realizan investigaciones de este tipo en instituciones como CIAT y la Universidad Distrital (Lentini *et al.* 2003, Beltrán & Quevedo 2007, Quevedo & Beltrán 2007), es necesario aumentar la participación de la academia en el desarrollo de herramientas biotecnológicas que puedan responder a los retos del sector arrocero colombiano, de cara al escenario planteado no solo por las dinámicas del mercado interno, sino también frente al cambio climático y el Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos.

El desarrollo de protocolos de cultivo de tejidos vegetales es fundamental para la biotecnología agrícola, particularmente para la ingeniería genética (Pérez Molpe Balch *et al.* 1999, García-González *et al.* 2010). Pese a las dificultades iniciales en la obtención de plantas transgénicas de arroz mediante *Agrobacterium tumefaciens*, el desarrollo de nuevos sistemas de cultivo *in vitro*, sumado al mejoramiento de las condiciones de transformación propiamente dichas, han permitido la producción de arroz transgénico con diferentes características introducidas, en muchas partes del mundo (Danilova 2007, Kathuria *et al.* 2007). No obstante, aun existen dificultades relacionadas con la transformación genética de variedades de arroz *indica*, debido a la respuesta que éstas presentan a las condiciones de cultivo *in vitro*. Por tal motivo, es necesario ajustar los protocolos cada vez que se quiere transformar una variedad nueva, pues no ha sido posible hasta el momento obtener un protocolo estándar que funcione para todas, o al menos para la mayoría (Saharan *et al.* 2004a, Amarasinghe *et al.* 2005, Grewal *et al.* 2005, Hoque *et al.* 2007, Kathuria *et al.* 2007).

El Grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional ha venido desarrollando, desde hace algunos años, investigaciones encaminadas a la obtención de plantas transgénicas de arroz colombiano, apoyado por la Federación Nacional de Arroceros – FEDEARROZ. Mediante este trabajo se logró seleccionar un protocolo de regeneración relativamente eficiente para algunos materiales de FEDEARROZ (Perafán 2011), basado fundamentalmente en el de Saharan *et al.* (2004a). Sin embargo, éste presenta inconvenientes debido a que no fue adaptado para condiciones de transformación con *A. tumefaciens* (Saharan *et al.* 2004b). Por tal razón, se vio la necesidad de optimizarlo, teniendo en cuenta las condiciones particulares con las que se desarrolla el proceso de transformación.

Muchos factores influyen en la respuesta de un explante a las condiciones *in vitro*, y naturalmente, en su capacidad de regeneración. Además del genotipo, también deben tenerse

en cuenta la fuente de carbono, los nutrientes minerales, el gelificante, los aditivos del medio (vitaminas, aminoácidos, antioxidantes), temperatura, humedad e incluso el recipiente y la tapa. Sin embargo, muchas veces la respuesta se ve influida fundamentalmente por la interacción entre el genotipo de la planta, los reguladores producidos por ésta y los adicionados al cultivo (Mroginski & Roca 1993, Pérez Molpe Balch *et al.* 1999, Pedroza Manrique 2008). Por tal razón, en la presente investigación se planteó estudiar la respuesta de los explantes a los reguladores artificiales empleados durante el cultivo, con el fin de incrementar la producción de brotes y elevar la eficiencia del protocolo de regeneración. Adicionalmente, se evaluaron otros factores como la posición de la semilla en la siembra y el tiempo de formación de callo. Las modificaciones se realizaron etapa por etapa (inducción de callo, cocultivo y regeneración), teniendo siempre como punto de comparación los resultados obtenidos por el protocolo original de Saharan *et al.* (2004a, 2004b).

Mediante el presente trabajo, se pretende solucionar un problema puntual dentro del proyecto de obtención de plantas transgénicas de arroz por parte del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, usando genotipos de la Federación Nacional de Arroceros como material vegetal. Adicionalmente, se busca realizar una contribución al desarrollo de procesos biotecnológicos encaminados al mejoramiento del cultivo del arroz en Colombia, con el propósito de integrar el trabajo de la academia con los intereses del sector productivo, y hacer más competitivo al gremio productor frente a los retos actuales y futuros.

1. Marco teórico.

1.1 Generalidades sobre el cultivo del arroz.

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un cultivo que fue domesticado aproximadamente hace 10.000 años, y actualmente es uno de los más importantes a nivel mundial. Además de su importancia económica, esta planta es organismo modelo de estudio para todos los cereales, razón por la cual la inversión en investigación ha permitido, entre otros logros, la secuenciación completa de su genoma, un trabajo intenso en cultivo de tejidos vegetales y la producción de varias líneas transgénicas en diferentes países del mundo (Carsono 2007; Vaughan *et al.* 2008).

1.1.1 Origen y clasificación taxonómica.

Oryza sativa pertenece a la familia Poaceae (Monocotyledoneae: Poales) (Judd *et al.* 1999, APG III 2009). Aunque gracias a estudios filogenéticos y moleculares se ha establecido que las dos especies del género *Oryza* más relacionadas con el arroz son *O. rufipogon* y *O. nivara*, no hay consenso sobre cuál de las dos fue la que lo originó (Sang & Ge 2007). Por otra parte, tampoco existe acuerdo sobre si el arroz se formó a partir de un evento único de domesticación, o si hubo varios eventos (Vaughan *et al.* 2008, Izawa *et al.* 2009).

Dentro de la especie, se reconocen dos subespecies principales: *indica* y *japonica*. Ambas cuentan con características fenotípicas y ecológicas divergentes, ya que las áreas de cultivo de *japonica* son más secas y frías que las de *indica*, común de regiones tropicales y más húmedas. Adicionalmente, ambas subespecies están parcialmente aisladas por una barrera post cigótica (Sang & Ge 2007). No obstante, no hay consenso sobre la organización taxonómica a nivel infraespecífico; existen autores que reconocen la existencia de grupos de variedades –caracterizados por aspectos moleculares y fenotípicos– más que subespecies taxonómicas como tal (Vaughan *et al.* 2008, Izawa *et al.* 2009).

1.1.2 Importancia económica.

De la producción mundial anual de cereales, 672 millones de toneladas -el 28%- corresponden a arroz, siendo el segundo cereal más producido a nivel global después del maíz y por encima del trigo. El arroz es de importancia clave para la seguridad alimenticia global, puesto que casi toda la producción se destina directamente al consumo humano. Adicionalmente, en términos de ingesta dietaria, el arroz es el cultivo más importante del mundo, por encima del trigo y el maíz (FAO 2012). Actualmente, éste constituye la principal fuente alimenticia para cerca de la mitad de la población mundial (Ramesh *et al.* 2004, Ignacimuthu & Arockiasamy 2006, Sang & Ge 2007), y el 23% de las calorías consumidas globalmente son proporcionadas por este cultivo (Carsono 2007).

Por países, las áreas de mayor producción global de arroz se concentran en Asia oriental, donde se encuentran los primeros ocho productores mundiales (China, India, Indonesia, Bangladesh, Vietnam, Myanmar, Tailandia y Filipinas), quienes concentran el 82,46% de la producción. Colombia ocupa apenas el puesto 24, con el 0,36% del total global. Sin embargo, en América, tradicionalmente ha ocupado el tercer puesto en producción, después de Brasil y Estados Unidos. No obstante, cabe resaltar que para 2010, nuestro país descendió al cuarto puesto en producción con 2'412.220 t, después de Perú con 2'831.370 t. (FAOSTAT, consultada en mayo 2 de 2012, disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>).

En Colombia, el arroz es el segundo cultivo en valor de producción después de la caña de azúcar, y el quinto producto agropecuario (FAOSTAT, consultada en mayo 2 de 2012, disponible en <http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>). Es un generador importante de empleos directos e indirectos en las zonas rurales. Sin embargo, en años recientes se ha observado una reducción en el número de productores y área sembrada, debido a varios factores como la sobreproducción y descenso de precios en 2004, la negociación del Tratado de Libre Comercio con Estados Unidos, un posible aumento del área sembrada por productor y problemas originados por fenómenos climáticos y surgimiento de plagas y patógenos en las áreas de mayor producción (Martínez *et al.* 2005, Fedearroz 2008).

Pese a la reducción en área sembrada y en número de productores, en los últimos años se ha observado un aumento en los rendimientos por hectárea (Fedearroz 2008, 2010). El incremento de la productividad se explica en buena parte por la introducción de

nuevas variedades, pero este factor se ve limitado por la baja disponibilidad de material genético en el país, por lo que es evidente la necesidad de tener nuevos materiales que permitan el desarrollo de nuevas variedades, y de explorar alternativas de tipo biotecnológico para superar este obstáculo (Miguel Diago, *com. pers.*, 2009).

1.2 Mejoramiento genético vegetal.

El mejoramiento genético vegetal, o fitomejoramiento, puede entenderse como la ciencia encaminada a la alteración de la herencia de las plantas para obtener cultivares –sean éstos variedades o híbridos- con características genéticas mejoradas, adaptados a condiciones específicas, con capacidad de obtener mayores rendimientos y con productos de mejor calidad. Aunque el ser humano ha hecho fitomejoramiento prácticamente desde el comienzo de la agricultura, hace unos 11.000 años, solamente fue hasta 1900 con el redescubrimiento del trabajo de Mendel por De Vries, Correns y von Tschermak, que se estableció un método científico detrás de su práctica (Vallejo & Estrada 2002). En ese sentido, el fitomejoramiento puede entenderse como un arte, en la etapa previa al desarrollo de la genética clásica, y como una ciencia, en la etapa posterior (Poehlman & Allen 2005).

El fitomejoramiento es fundamental en la sostenibilidad del desarrollo humano sobre el planeta. El 99% de la comida consumida en el mundo es producida sobre tierra firme, dejando apenas un 1% a la producción en los mares y ríos. Debido al acelerado crecimiento demográfico experimentado durante el siglo XX, la demanda de alimentos y materias primas de origen vegetal creció 280 veces entre 1900 y 1980. Para suplir este incremento desmesurado, los desarrollos en fitomejoramiento han permitido la producción de variedades e híbridos que producen entre 150% y 500% más que las plantas cultivadas para 1900 (Vallejo & Estrada 2002).

Aunque los logros obtenidos hasta la fecha por mejoramiento tradicional son importantes, los retos hacia el futuro son muy grandes. Se espera un aumento importante en la demanda de alimentos, particularmente por los países en vías de desarrollo. La primera opción para lograr el incremento en producción, es la expansión de la frontera agrícola. Sin embargo, hoy en día, la mayor parte de tierras cultivables ya se encuentran utilizadas y es poco lo que se puede ganar por incremento de superficie cultivada (Izquierdo 2004).

1.2.1 Mejoramiento convencional.

Desde 1900 se han mejorado los cultivos siguiendo cuatro pasos fundamentales: 1) escoger parentales con características individuales de interés, 2) Hibridar dichos parentales, 3) Seguir un esquema apropiado de mejoramiento que incluya la recuperación en la progenie de las características favorables de ambos parentales y 4) Liberar a la mejor parte de la progenie como una variedad. Para los pasos 3) y 4), el esquema apropiado de mejoramiento y el tipo de variedad liberada dependen del método de polinización y reproducción específicos del cultivo (Chrispeels & Sadava 2003).

Probablemente, el máximo logro obtenido por el mejoramiento tradicional hasta la fecha ha sido la llamada “Revolución Verde”. En este período se consiguió un incremento sustancial en la productividad de varios cultivos, particularmente maíz, trigo y arroz, mediante la introducción de características como alta productividad, maduración rápida, hábito de crecimiento semienano, alta resistencia a patógenos y adaptabilidad a condiciones locales. En el caso del arroz, por ejemplo, en India y China se logró pasar de una productividad de 0,9 y 2,0 t/Ha en 1963, a 2,2 y 4,7 t/Ha en 1983 (Chrispeels & Sadava 2003). Adicionalmente, los mejoradores de arroz, trigo, maíz y cebada han logrado sostener tasas de incremento en productividad del 1% anual, aunque en algunas áreas como Asia, dichas tasas han llegado a ser del 3% anual. Sin embargo, el sostenimiento de tales incrementos no es posible a largo plazo sin un cambio en la tecnología utilizada (Able *et al.* 2006).

La hibridación de líneas puras añade un gran número de genes de una línea a su progenie. Sin embargo, en ocasiones el mejorador desea únicamente añadir una sola característica a la variedad, para lo cual se recurre al retrocruzamiento. Mediante este método, se logra llegar al mayor nivel de precisión en cuanto a selección de genes para mejoramiento. No obstante, es evidente que incluso con este procedimiento, se manipulan de manera no intencional muchos genes al mismo tiempo (Chrispeels & Sadava 2003).

1.2.2 Biotecnología.

Una limitante fundamental en el incremento de la diversidad genética de los cultivos a partir del material existente, es la presión de selección que ha sido impuesta por la

domesticación y los programas de mejoramiento, la cual ha llevado al abandono y pérdida de materiales silvestres (Able *et al.* 2006, Fernie *et al.* 2006). Los procesos modernos de mejoramiento vegetal restringen aun más el tipo de materiales y las variedades utilizadas, y conllevan al abandono de razas locales que pueden ser más resistentes a plagas, patógenos y estrés abiótico. En conjunto, estos procesos se conocen como erosión genética. Ésta ha ocurrido desde el inicio de la agricultura, pero actualmente, el ritmo de pérdida de diversidad se ha acelerado como consecuencia directa del crecimiento poblacional, el cuál ha incrementado la demanda por cultivos de mayor rendimiento, lo que a su vez ha provocado una reducción de la cantidad de materiales cultivados, y consecuentemente, ha desplazado a las variedades locales. (Chrispeels & Sadava 2003, Kirakosyan *et al.* 2009).

Existen muchos casos que dan cuenta de la pérdida de diversidad en los cultivos y sus consecuencias. Por ejemplo, mientras que los materiales silvestres de frijol en Mesoamérica poseen un índice de diversidad genética de 0,2, las razas locales cultivadas apenas llegan a 0,15 y los cultivares ni siquiera alcanzan 0,1 (Somante *et al.* 1994, en Chrispeels & Sadava 2003). La hambruna de 1845-1847 en Irlanda, que causó la muerte de un millón de personas y provocó la emigración de casi otro millón a Estados Unidos, fue provocada por una epidemia de *Phytophthora infestans*. La dispersión de la enfermedad se vio facilitada por el hecho de que la papa cultivada en Irlanda en aquél tiempo era genéticamente muy uniforme (Chrispeels & Sadava 2003). En el caso particular del arroz, se estima que hoy apenas conserva un 25% de su diversidad genética inicial (Sang & Ge 2007).

Actualmente hay un gran interés en el incremento de la diversidad genética de los cultivos a partir de materiales silvestres. Ésta aproximación tiene limitaciones que incluyen incompatibilidad cruzada entre especies silvestres y cultivos, esterilidad de híbridos en la F1, infertilidad de las generaciones segregantes, recombinación reducida entre los cromosomas de las dos especies y ligamiento fuerte entre genes de efectos negativos y características de interés (Fernie *et al.* 2006). La biotecnología vegetal es una alternativa para superar las limitaciones ligadas al mejoramiento convencional y a la disponibilidad actual de material genético en las especies de plantas cultivadas. Dentro de las herramientas biotecnológicas para el mejoramiento de cultivos se cuentan: cultivo de células, embriones y tejidos vegetales, propagación clonal de plantas, identificación asistida por marcadores de QTLs con características multigénicas importantes, inducción

de variación genética por somaclones o agentes mutagénicos, aislamiento e identificación de genes, e ingeniería genética para múltiples propósitos (Vallejo & Estrada 2002, Chrispeels & Sadava 2003, Singh 2003, Poehlman & Allen 2005, Fernie *et al.* 2006).

En cualquier caso, es necesario tener en cuenta que la biotecnología no reemplaza a los métodos de mejoramiento convencional, ya que necesariamente requiere de éstos en algún punto para poder liberar una nueva variedad. En lugar de ello, debe entenderse a la biotecnología como una herramienta que permite optimizar los métodos de mejoramiento convencional existentes (Poehlmann & Allen 2005, Sharma *et al.* 2005).

1.2.3 Ingeniería genética.

La utilización de herramientas biotecnológicas, como la inducción de mutaciones por agentes químicos y radiación, puede ayudar a incrementar la variabilidad genética dentro de un cultivo. No obstante, la mutagénesis también puede provocar el surgimiento de características indeseadas en un genotipo particular, y el método por sí mismo no permite producir mutaciones en la dirección que el mejorador desea (Chrispeels & Sadava 2003). Por otra parte, muchas de las mutaciones producidas en cultivos somaclonales de plantas no son hereditarias, y consecuentemente, tienen poca utilidad en fitomejoramiento (Poehlman & Allen 2005). La llegada de la ingeniería genética ha abierto la posibilidad de transferir genes de un organismo a otro, ignorando las barreras reproductivas, y permitiendo un mejoramiento potencialmente más rápido y mucho más específico (Sharma *et al.* 2005, Shrawat & Lörz 2006).

El proceso de transformación genética de plantas puede dividirse en tres grandes etapas: 1) introducción del DNA foráneo al genoma vegetal, 2) regeneración del explante transformado en una planta normal, y 3) selección de las plantas regeneradas y confirmación de su carácter transgénico (Danilova 2007).

En términos generales, es posible clasificar las técnicas de transformación genética en dos grupos: directas e indirectas. Las técnicas de transformación directa, como su nombre lo indica, implican la transferencia del DNA foráneo al genoma vegetal sin el uso de un intermediario, mediante la utilización de diferentes métodos físicos. Entre ellos se pueden mencionar: transformación de protoplastos con polietilenglicol, electroporación,

perforación por fibras de silicio, microinyección y biobalística (Potrykus 1991, Sharma *et al.* 2005, Danilova 2007).

La ventaja principal de los métodos directos es la posibilidad de transformar prácticamente cualquier tipo de célula vegetal, independientemente de su genotipo. Sin embargo, este tipo de métodos se enfrenta a numerosos problemas. Aquellos que requieren la utilización de protoplastos tienen una eficiencia que normalmente se encuentra por debajo del 1%, debido a que el proceso de regeneración en estos casos es complicado y su éxito está sujeto a factores que no se encuentran bajo el control del investigador (Singh 2003, Sharma *et al.* 2005). La biobalística por su parte, es más eficiente puesto que no requiere el uso de protoplastos sino de explantes como callos o fragmentos vegetales, particularmente segmentos foliares. No obstante, debido a la naturaleza misma del método, es imposible controlar el número de copias de DNA foráneo insertadas en un mismo genoma. Un número muy elevado de copias provoca el silenciamiento del gen de interés (Danilova 2007). Por otra parte, es común que el fragmento de DNA se inserte de forma incompleta o en rearrreglos indeseados, como copias invertidas, lo cual limita las posibilidades de expresión en la planta regenerada (Danilova 2007, Kathuria *et al.* 2007). Adicionalmente, el proceso de regeneración puede verse afectado por el bombardeo, ya que éste destruye en gran parte la capacidad regenerativa del explante, y puede provocar la formación de plantas con anomalías fenotípicas como baja producción de semillas, senescencia prematura, desarrollo reproductivo reducido y crecimiento atrofiado (Sharma *et al.* 2005). Como consecuencia, la biobalística tiene una eficiencia de 1-3%, aunque hay reportes de hasta 18,1% (Danilova 2007). Pese a lo anterior, ésta se mantiene como el método de transformación directa más utilizado, ya que en muchas ocasiones es la única alternativa viable debido a la incompatibilidad genotípica, que se presenta entre los agentes biológicos de transformación y las plantas que se desean transformar (Potrykus 1991, Kathuria *et al.* 2007).

La transformación de plantas por vía indirecta se logra mediante la utilización de *Agrobacterium tumefaciens* y su capacidad natural para transferir segmentos de DNA al genoma de una célula vegetal (Tzfira & Citovsky 2006). Básicamente, el mecanismo molecular de transformación se fundamenta en el procesamiento de un fragmento de DNA del plásmido Ti, y su posterior transferencia a la célula que infecta (Hiei *et al.* 1997, Gelvin 2010). Como resultado, se produce el crecimiento neoplásico de la zona atacada

por *A. tumefaciens* y la producción de opinas como fuente de nitrógeno para la bacteria (Tzfira & Citovsky 2006). Inicialmente, la utilización de *A. tumefaciens* en ingeniería genética implicaba la eliminación de los oncogenes y genes de catabolismo de opinas del T-DNA, y su reemplazo por genes de interés del investigador. Todo ello se hacía en el mismo plásmido Ti (inductor de tumores) de la bacteria, sin embargo, esto implicaba la utilización de técnicas microbiológicas y moleculares costosas, complejas y no siempre exitosas. Por tal razón, hoy en día es más común la utilización del sistema de vectores binarios, en el que uno (el vector residente) contiene los genes *vir* encargados del proceso de transferencia del T-DNA, y otro (el vector binario) contiene los genes de interés (Gelvin 2003, Lee & Gelvin 2008).

Una de las ventajas más obvias de este sistema de transformación es que el mecanismo de transferencia de DNA es de origen completamente natural, de modo que el riesgo de destrucción de la célula vegetal por daño físico es menor. Además, el T-DNA es transferido directamente al núcleo, por lo que la probabilidad de inserción exitosa, con bajo número de copias y sin rearrreglos indeseados es mucho mayor (Danilova 2007). Sin embargo, el método también tiene sus limitaciones, puesto que es necesario tener en cuenta varios factores para lograr una transformación exitosa. En primer lugar, la eficiencia depende del genotipo tanto de la planta como de la cepa bacteriana. Aunque inicialmente se pensaba que la inserción del T-DNA era dependiente de la existencia de sitios de incorporación específicos en el genoma vegetal, actualmente se sabe que la inserción no es homóloga, y depende no solamente de las proteínas *vir* de *A. tumefaciens*, sino también de diversas proteínas producidas por la célula hospedera, así como de compuestos fenólicos que orientan a la bacteria (Danilova 2007, Gelvin 2010). Por otra parte, también debe tenerse en cuenta el tipo de explante a utilizar en la transformación, las condiciones de cultivo de éstos antes y durante el contacto con la bacteria, los tipos de medios utilizados, etc. (Kathuria *et al.* 2007). Debido a lo anterior, la transformación genética mediante *A. tumefaciens* es un método que debe evaluarse cada vez que se quiera transformar un genotipo vegetal nuevo (Danilova 2007).

1.3 Cultivo de tejidos vegetales.

De manera general, puede decirse que los componentes fundamentales de todo sistema de transformación genética de plantas son: 1) un sistema de cultivo de tejidos y

regeneración confiable y eficiente, 2) la preparación de constructos génicos y transformación con vectores adecuados, 3) la utilización de una técnica de transformación efectiva, 4) la recuperación y multiplicación de las plantas potencialmente transgénicas, 5) la caracterización molecular y genética de las plantas transformadas para establecer la expresión estable del transgén, 6) la transferencia del transgén a cultivares élite mediante métodos convencionales si se necesita, y 7) la evaluación de la efectividad en campo de las plantas transgénicas. Entre los componentes antes mencionados, el desarrollo de un sistema eficiente de cultivo de tejidos y regeneración es crucial, puesto que una transformación exitosa carecerá de valor práctico si no es posible obtener plantas completas a partir de los explantes transformados (Sharma *et al.* 2005).

El cultivo de tejidos vegetales puede definirse como un grupo de técnicas de diverso tipo, mediante las cuales una parte separada de una planta (denominada “explante”) o un grupo de células se cultiva en un medio aséptico con una composición química particular y bajo condiciones ambientales controladas (Mroginski & Roca 1993, Nill 2002, García-González *et al.* 2010, Mroginski *et al.* 2010).

Han pasado menos de treinta años desde que se obtuvo la primera planta transgénica mediante *A. tumefaciens* (Herrera-Estrella *et al.* 1983). Sin embargo, el cultivo de tejidos es una práctica mucho más antigua. Ya desde inicios del siglo XX se ha estado trabajando en diferentes sistemas de cultivo *in vitro* para muchas especies vegetales, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas e incluso criptógamas. Los trabajos en cultivo de tejidos vegetales pueden rastrearse desde Haberlandt en 1902, y posteriormente, en 1927 gracias a Rehwald y sus experimentos en zanahoria (Neumann *et al.* 2009, García-González *et al.* 2010). No obstante, el cultivo de tejidos vegetales tomó un mayor impulso justamente gracias a que sin su contribución, la transformación genética de plantas habría sido virtualmente imposible (Pérez Molpe Balch *et al.*, 1999; García-González *et al.* 2010). De hecho, uno de los elementos fundamentales de la ingeniería genética es precisamente el desarrollo de sistemas confiables y eficientes de regeneración de plantas a partir de cultivo de tejidos. La transformación genética es un evento a nivel celular, en otras palabras, no es posible transformar organismos multicelulares completos (Tzfira & Citovsky, 2006).

Pese al prolongado tiempo de trabajo en cultivo de tejidos vegetales, aun es mucho lo que se desconoce sobre la respuesta de las plantas a las condiciones *in vitro*. Ésta es

resultado de la interacción entre los reguladores de crecimiento producidos por la planta y los aplicados al cultivo, aunque además, intervienen muchos otros factores como el tipo y edad de explante utilizado, la composición de macro y micronutrientes del medio, la fuente de carbono utilizada, temperatura y humedad relativa durante el cultivo, entre otros (Mroginski & Roca 1993, Pérez Molpe Balch *et al.* 1999, Pedroza Manrique 2008). Adicionalmente, la respuesta está influenciada por el genotipo de la planta con la que se trabaja, y este factor constituye muchas veces una limitación para el desarrollo de sistemas de regeneración *in vitro* eficientes (Mroginski & Roca, 1993). La obtención de plantas monocotiledóneas transgénicas ha sido difícil en comparación con las dicotiledóneas. Por esta razón, la transformación genética de cereales solo se ha logrado de forma relativamente reciente, y de hecho varios cultivos de este grupo aun se consideran recalcitrantes a la transformación (Sharma *et al.*, 2005).

Los procesos de regeneración en plantas pueden dividirse en dos clases de acuerdo al tipo de respuesta morfogénica del explante: organogénesis y embriogénesis somática (García-González *et al.* 2010, Radice 2010). Pese a que la naturaleza de estas respuestas es diferente, ambas comparten la gran dependencia que tienen del genotipo de la planta con la que se trabaja. El genotipo influye de manera decisiva en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en un sistema *in vitro*, hasta la diferenciación y crecimiento de órganos o embriones somáticos. Por tal razón, es imposible generalizar un mismo protocolo de trabajo para diferentes especies –o incluso, diferentes genotipos de una misma especie; es necesario seleccionar condiciones y metodologías de trabajo específicas para cada situación particular (Radice 2010).

1.3.1 Organogénesis.

La organogénesis consiste en el desarrollo de órganos vegetales a partir de los explantes o de callos obtenidos de dichos explantes (Litz & Jarret 1993, García-González *et al.* 2010, Radice 2010). En términos generales, la organogénesis puede producirse de manera directa o indirecta, dependiendo de si la formación de estructuras se da sobre el explante o sobre un callo generado a partir de éste. En ambos casos, la capacidad morfogénica depende en primer lugar del explante utilizado. Teóricamente, cualquier tipo de explante es capaz de presentar una respuesta organogénica; sin embargo, la edad del

explante influye de manera decisiva en este proceso, puesto que tejidos más jóvenes tienen una mayor actividad meristemática y más plasticidad *in vitro*. Adicionalmente, es necesario tener en cuenta el estado de la planta madre, así como el tamaño del explante utilizado. En segundo lugar, el medio de cultivo también influye en la respuesta morfogénica, pues la concentración y tipo de fuente de carbono, las sales utilizadas y los reguladores de crecimiento entre otros, determinan la posibilidad de que se formen estructuras. Los reguladores desempeñan un papel particularmente importante en este caso; dependiendo de la proporción entre auxinas y citoquininas en el medio de cultivo, es posible variar la respuesta entre formación de callos, brotes o raíces (Litz & Jarret 1993).

1.3.2 Embriogénesis somática.

La embriogénesis somática consiste en la formación de embriones que no son el producto de la fusión de gametos. Los embriones somáticos son en general, muy similares a los cigóticos y pueden desarrollarse hasta formar plantas completas, aunque se diferencian anatómicamente de éstos en que no están conectados vascularmente con la planta madre (Litz & Jarret 1993, Neumann *et al.* 2009, Radice 2010).

La embriogénesis somática, al igual que la organogénesis, puede lograrse por vía directa o indirecta (Radice 2010). En ambos casos, es necesario tener en cuenta el tipo de explante a utilizar para la iniciación del cultivo. Al igual que la organogénesis, la embriogénesis somática depende de muchos factores (Litz & Jarret 1993, Grewal *et al.* 2005). En principio, los tres requisitos fundamentales para la inducción de embriogénesis somática son: 1) células competentes, 2) un ambiente adecuado, y 3) un estímulo para la formación de embriones (Neumann *et al.* 2009). Para el caso particular de la embriogénesis somática indirecta, debe considerarse el hecho de que es posible obtener callos a partir de casi cualquier explante, pero muy pocos tienen capacidad embriogénica (Litz & Jarret 1993). Por otra parte, el medio de cultivo también resulta importante en éste tipo de respuesta. Aunque las sales y complementos del medio son factores que influyen de manera determinante en la formación de embriones somáticos, es bien sabido que los reguladores de crecimiento pueden inducir tanto la proliferación del callo como la producción de embriones, aun si las sales del medio no son suficientes (Litz & Jarret 1993). La formación de callos embriogénicos y embriones somáticos se logra mediante la aplicación de una auxina al medio, usualmente 2,4-D (Meneses *et al.* 2005). Sin

embargo, la maduración y germinación de los embriones requiere la eliminación de la auxina (Jones & Rost 1989, Litz & Jarret 1993, Neumann *et al.* 2009).

Finalmente, es necesario mencionar que en el caso de la embriogénesis somática indirecta, la capacidad embriogénica y regenerativa de un callo dependen de la edad del mismo; a mayor tiempo, la posibilidad de producir embriones que puedan madurar y formar plantas completas disminuye (Litz & Jarret 1993). Es posible observar una rápida declinación en la eficiencia de regeneración de los callos embriogénicos cuando se realizan varios subcultivos (Amarasinghe & Yang 2005, Abdul Rahman *et al.* 2010).

1.4 Mejoramiento genético del arroz.

El arroz es un cultivo de gran importancia económica, especialmente en países de ingreso bajo y medio en el Tercer Mundo. Adicionalmente, en términos de consumo humano directo, es el más importante del mundo, por encima del maíz y trigo, en los que una parte importante de la producción se utiliza como alimento para ganado (Dawe *et al.* 2010). Es necesario incrementar la producción arroceras mundial para suplir la demanda originada por el aumento poblacional. La opción de lograr lo anterior mediante la expansión del área cultivada no es viable, por la poca disponibilidad de tierras aptas para el cultivo del arroz, y por la presión provocada por la urbanización de tierras arables en el Tercer Mundo (Tariq *et al.* 2008). Por tal razón, el incremento en producción necesariamente tendrá que estar impulsado por un aumento de la productividad por unidad de área (Sharma *et al.* 2005, Kathuria *et al.* 2007).

1.4.1 Métodos convencionales.

El arroz se produce en cuatro clases de cultivo: irrigado o inundado, de tierras bajas o alimentado por lluvia, flotante o de aguas profundas y de tierras elevadas o secano. Mundialmente, el arroz irrigado es el método de producción más importante. (Poehlman 2005).

El arroz pertenece a la familia de las gramíneas, y posee una inflorescencia en panícula terminal que lleva espiguillas formadas por una sola flor. Sin embargo, ésta difiere de las de otros cereales en que tiene seis estambres en lugar de tres. La flor está envuelta por una lema y una pálea, las cuales forman la cáscara que rodea al grano sin descascarar.

La floración del arroz varía con el genotipo y es afectada por factores ambientales como la humedad y la temperatura. Es necesario que el fitomejorador conozca los patrones de floración particulares de los materiales con los que trabaja, para poder programar los momentos adecuados de cruzamiento. La preparación de las flores para el cruzamiento comienza con la emasculación mediante la eliminación del ápice del flósculo y la remoción de las anteras. Después de este procedimiento, las flores se cubren para impedir la polinización cruzada natural, hasta que se abran y estén en condiciones de ser polinizadas. Las panículas se polinizan a la mañana siguiente a la emasculación. Una vez polinizadas, las panículas se cubren para protegerlas del polen perdido (Poehlman 2005).

Dentro de los objetivos fundamentales de los programas de mejoramiento se encuentran el aumento de la productividad, la resistencia a enfermedades e insectos, la calidad del grano, la tolerancia al estrés abiótico, entre otros (Poehlman 2005). Indudablemente, gracias al mejoramiento convencional se han obtenido logros importantes en este sentido. La introducción de variedades de alto rendimiento, junto con la realización de mejores prácticas agrícolas han permitido, por ejemplo, doblar la producción de arroz en Asia entre 1970 y 2000 (Mohanty *et al.* 2010). Sin embargo, mediante esta aproximación se necesitan por lo menos dos años para que una nueva variedad pueda ser liberada en el mercado (Panjaitan *et al.* 2009). Adicionalmente, las limitaciones propias del mejoramiento convencional, unidas a la reducción en la disponibilidad de materiales para cruzamientos, han impulsado el interés en la utilización de herramientas biotecnológicas para la obtención de nuevas variedades (Fernie *et al.* 2006).

1.4.2 Métodos biotecnológicos: ingeniería genética y cultivo de tejidos vegetales.

Hoy en día, el mercado de cultivos transgénicos constituye un segmento importante de la producción agrícola a nivel mundial. Para el año 2011, este tipo de cultivos ocupaban 160 millones de hectáreas en 29 países (James 2011). Pese a que desde 1996 hay cultivos transgénicos liberados en el mercado, aun hoy éste se encuentra dominado fundamentalmente por cuatro plantas: soya, maíz, algodón y canola (Brookes & Barfoot 2008, 2009).

Aunque el arroz transgénico aun no está al nivel de los cuatro cultivos mencionados anteriormente, alrededor del mundo hay un gran interés en el desarrollo y liberación al mercado de variedades transgénicas de arroz. El caso más famoso es el del “arroz dorado”, llamado así por el color del endospermo del grano. La importancia de este proyecto radica en su utilidad para atender las deficiencias nutricionales en regiones pobres de Asia donde el arroz es casi el único alimento disponible; debido a esto, las poblaciones humanas enfrentan problemas de bajo consumo de nutrientes como la provitamina A. La “biofortificación”, o el proceso de lograr la mejora en calidad nutricional de un cultivo, es algo que no puede ser logrado únicamente mediante mejoramiento convencional, especialmente si se habla de un cambio tan radical como incrementar sustancialmente la cantidad de provitamina A en el endospermo del arroz (Beyer 2010). El IRRI (International Rice Research Institute, Filipinas) actualmente tiene variedades asiáticas de arroz, a las cuales se les ha introducido por cruzamiento las características del arroz dorado. Se espera que para 2013 o 2014, las primeras variedades de arroz dorado sean liberadas comercialmente en Filipinas (James 2011). Además de la mejora nutricional, en arroz existen otros problemas que pueden ser abordados de manera eficiente mediante el uso de la tecnología transgénica. Entre ellos, se pueden mencionar tolerancia a estrés abiótico, resistencia a diferentes tipos de plagas y enfermedades, tolerancia a herbicidas, alteración del contenido de almidón del grano, incremento de los volúmenes de producción y alteración de los patrones de desarrollo de la planta (Shrawat & Lörz 2006, Kathuria *et al.* 2007).

Aunque la transformación por biobalística es el más eficiente de los métodos directos, y a pesar de la ventaja que implica su independencia del genotipo de la planta a transformar, existen problemas ligados a su uso que deben ser tenidos en cuenta. Éste método tiene como desventaja principal la alta probabilidad de inserción de múltiples copias del transgén en el genoma vegetal, lo cual puede llevar a su silenciamiento debido a la activación de los mecanismos de defensa de la planta (Danilova 2007, Kathuria *et al.* 2007). Adicionalmente, es posible que se presenten rearrreglos indeseados del transgén, y el bombardeo como tal puede provocar la producción de plantas deformes (Sharma *et al.* 2005).

La transformación por *A. tumefaciens* tiene también desventajas, como la eliminación de la bacteria de los explantes, la posibilidad de una sobreinfección que los destruya, y la

necesidad de tener en cuenta tanto el genotipo de la cepa bacteriana como el de la planta que se quiere transformar (Sharma *et al.* 2005). Sin embargo, en materia de costos e infraestructura, es un método menos exigente que la biobalística, y por tal razón, asequible para laboratorios que no cuentan con financiación elevada (Danilova 2007).

Inicialmente se consideró que la transformación de cereales por *A. tumefaciens* no era posible, debido a la ausencia de sitios específicos de incorporación en el genoma de las monocotiledóneas. No obstante, hoy se sabe que la inserción del T-DNA depende de las proteínas *vir* de la bacteria, de algunas proteínas vegetales y de compuestos fenólicos liberados por la planta que atraen a la bacteria hacia las heridas (Gelvin 2003, Danilova 2007, Gelvin 2010). Desde inicios de la década de los 90, se sospechaba que el poco éxito en la obtención de cereales transgénicos utilizando *A. tumefaciens*, se debía fundamentalmente al tipo de respuesta que tienen algunas monocotiledóneas a las heridas –principalmente los cereales. La respuesta de las dicotiledóneas en general, es la desdiferenciación de las células adyacentes al corte, y la producción de células competentes. En el caso de los cereales, la herida es seguida por la acumulación de fenólicos en la zona de corte, o la lignificación o esclerificación sin división celular. En ese sentido, el problema clave en la transformación de cereales con *A. tumefaciens*, no radica ni en la bacteria ni en su rango de hospederos, sino en la posibilidad de obtener células competentes para ser transformadas, es decir, en el cultivo de tejidos vegetales (Potrykus 1991, Hiei *et al.* 1997). No fue sino hasta 1994, que se publicaron resultados en los que se demostraba de manera inequívoca la transformación de arroz mediante *A. tumefaciens* (Hiei *et al.* 1994). A partir de esa fecha, se han obtenido múltiples eventos transgénicos en arroz, con diferentes características introducidas (Kathuria *et al.* 2007).

▪ Transformación con *A. tumefaciens*.

De forma general, el procedimiento de transformación de arroz mediante *A. tumefaciens* puede resumirse en cuatro grandes etapas: 1) obtención de los explantes e inducción de callos, 2) cocultivo de los explantes con la bacteria, 3) selección y regeneración de brotes y 4) enraizamiento y transferencia a suelo (Kathuria *et al.* 2007).

En cultivo de tejidos de arroz, se han empleado varios tipos de explante con diferentes grados de éxito en la regeneración, como ápices de raíz (Yookongkaew *et al.* 2007), embriones inmaduros (Aldemita & Hodges 1996, Hiei *et al.*, 1994) y células en

suspensión (Hiei *et al.* 1994), entre otros tipos de explantes (Jones & Rost 1989, Vega *et al.* 2009). Sin embargo, en la gran mayoría de trabajos se han utilizado callos derivados del escutelo de embriones maduros, pues se ha observado que presentan múltiples ventajas en comparación con otros tipos de explantes (Hoque *et al.* 2007). Los callos embriogénicos escutelares son excelentes fuentes de células competentes para transformación. (Hiei *et al.* 1997, Shrawat & Lörz 2006).

La producción de los callos inicia con la siembra de la semilla en un medio de inducción. Existen multitud de tipos de medios, con diferentes formulaciones de sales, vitaminas y complementos para lograr la formación de callos embriogénicos. Sin embargo, casi todos tienen en común la utilización del 2,4-D como regulador para la inducción de la formación de callos (Litz & Jarret 1993). Aunque la manipulación de los otros componentes del medio puede mejorar la producción, el regulador es el generador del estímulo para la formación del callo (Jones & Rost 1989, Litz & Jarret 1993, Neumann *et al.* 2009, Rahman *et al.* 2010). Éstos se producen normalmente en condiciones de oscuridad, para evitar su oxidación (García-González *et al.* 2010), y el período de incubación suele estar entre 2 y 4 semanas (Saharan *et al.* 2004a, Parkhi *et al.* 2005, Hoque *et al.* 2007)

El período de desarrollo de los callos es una variable importante que debe tenerse en cuenta para las etapas posteriores del cultivo. De manera general, se sabe que los explantes pierden potencial de regeneración con el tiempo (Litz & Jarret 1993). Un mayor período de incubación de los callos puede provocar la acumulación de aberraciones cromosómicas como aneuploidías o la formación de poliploides, lo cual lleva a la pérdida del balance cromosómico en las células (Singh 2003). Recientemente, se ha sugerido a través de nueva evidencia molecular, que también hay una desregulación de los microRNAs presentes en las células vegetales, ocasionada por las condiciones del cultivo *in vitro*, y ésta también contribuye a la generación de rearrreglos a nivel genómico y cromosómico, así como a cambios de tipo epigenético (Rodríguez-Enríquez *et al.* 2011). En ambos casos, se considera que los reguladores utilizados para inducir la formación del callo son fundamentales en la producción de estos desórdenes.

La etapa de cocultivo se realiza en dos fases: un cocultivo líquido en el que se inocula el explante con la bacteria, y un cocultivo sólido, que es el período donde ocurre la transformación (Hiei *et al.* 1997, Sharma *et al.* 2005). Aunque la duración del cocultivo

líquido puede variar entre 1,5 y 30 minutos, normalmente la duración del cocultivo sólido es de 3 días. (Saharan *et al.* 2004a, Toki *et al.* 2006, Hoque *et al.* 2007, Danilova 2007). La composición del medio de cocultivo es generalmente similar a la del medio de inducción de callo, excepto por la adición de glucosa y acetosiringona, los cuales en conjunto funcionan como activadores de los genes *vir* de *A. tumefaciens* (Shimoda *et al.* 1990, Gelvin 2003, Shrawat & Lörz 2006). Por tal razón, es posible considerar que el cocultivo sólido es similar –aunque no igual- a un subcultivo de los callos.

Finalmente, la etapa de regeneración implica cambios en la composición del medio de cultivo, con respecto a las etapas anteriores. En primer lugar, se retira el 2,4-D con el fin de permitir la maduración de los embriones somáticos hasta la formación de plantas (Jones & Rost 1989, Litz & Jarret 1993, Neumann *et al.* 2009). Adicionalmente, se hacen cambios en la concentración del gelificante para favorecer el proceso regenerativo (Sharma *et al.* 2004, García-González *et al.* 2010, Radice 2010). No obstante, el mayor cambio es la adición de nuevos reguladores para estimular la formación y elongación de brotes. Generalmente, se añade una auxina (ANA) y una citoquinina (Kinetina o BAP), y se manipulan sus concentraciones hasta encontrar una óptima, para permitir la elongación y reducir al máximo la formación de brotes anormales (Krikorian 1993, Litz & Jarret 1993, Saharan *et al.* 2004a, Parkhi *et al.* 2005, Hoque *et al.* 2007).

Tradicionalmente, se ha asignado a las auxinas añadidas al medio el papel de promover el agrandamiento y la división celular, mientras que las citoquininas estimulan la división celular y la diferenciación de tejidos y órganos (Mroginski & Roca 1993). No obstante, la realidad demuestra que tanto auxinas como citoquininas pueden estimular una amplia gama de respuestas en las plantas, pudiendo ser tanto inhibidoras como promotoras del crecimiento, división y diferenciación celulares (Acosta *et al.* 2000, Segura 2000, Naqvi 2002). El tipo de respuesta que se obtenga depende tanto del genotipo de la planta, como del tipo de explante con que se trabaja y de la competencia de las células para responder al estímulo (Mroginski & Roca 1993, Radice 2010).

- Limitaciones genotípicas para el cultivo de tejidos de arroz.

Como es bien sabido, el genotipo de la planta con la que se trabaja es un factor fundamental, no solo en el cultivo de tejidos vegetales sino también en la transformación

genética con *A. tumefaciens* (Sharma *et al.* 2005, Danilova 2007, Radice 2010). Esta situación es particularmente importante en el cultivo *in vitro* de arroz.

El primer reporte de transformación exitosa de arroz con *A. tumefaciens* fue en 1994 (Hiei *et al.* 1994), sobre una variedad *japonica*. Desde entonces, se ha logrado la transformación exitosa de nuevas variedades *japonica*, dada la relativa facilidad de trabajo en condiciones *in vitro*. Sin embargo, actualmente existe un consenso sobre los problemas asociados con la transformación de variedades *indica*, cuya respuesta *in vitro* varía mucho más de genotipo a genotipo. Como consecuencia, la transformación de variedades *indica* es más difícil que la de variedades *japonica*, debido a que es necesario ajustar los protocolos de cultivo de tejidos y regeneración para cada genotipo que se quiera transformar (Saharan *et al.* 2004a, Amarasinghe *et al.* 2005, Grewal *et al.* 2005, Hoque *et al.* 2007, Kathuria *et al.* 2007).

1.4.3 Avances en mejoramiento genético del arroz en Colombia.

En Colombia, los programas de mejoramiento genético de arroz han estado orientados tradicionalmente hacia la obtención de variedades con características culinarias e industriales óptimas (Diago 2003). Sin embargo, en años recientes se ha visto que los métodos convencionales están llegando a su límite máximo en cuanto a la obtención de nuevas variedades, ya que se ha alcanzado el tope de cruzamientos posibles a partir del germoplasma nacional de arroz. Por esta razón, se considera que es poco lo que se puede hacer mediante métodos convencionales para mejorar los resultados obtenidos hasta hoy (Diago 2005), al menos utilizando genotipos colombianos como parentales.

Las variedades de arroz para siembra y consumo en el mercado interno colombiano son todas de la subespecie *indica*. Uno de los principales agentes de investigación en mejoramiento genético a la fecha, ha sido la Federación Nacional de Arroceros, FEDEARROZ. El programa de mejoramiento de ésta organización ha entregado al sector arrocero colombiano varios materiales de interés agrícola para Colombia y la región andina. Entre ellos, F50 se caracteriza por ser la variedad élite del programa de mejoramiento. Pese a tener algunos problemas de rendimiento bajo condiciones ambientales desfavorables, es utilizada en varios países y es un parental importante dentro de los programas de mejoramiento. Por su parte, F2000 presenta un alto potencial

agronómico y una buena aceptación en el mercado nacional, aunque tiene problemas de producción en algunas zonas del país y es susceptible a varias enfermedades propias del cultivo (Perafán 2011).

En Colombia, los reportes publicados en literatura sobre protocolos de cultivo de tejidos y transformación de variedades colombianas de arroz son escasos. Por supuesto, esto no quiere decir que no se trabaje en biotecnología del arroz en el país. El Centro Internacional de Agricultura Tropical –CIAT, cuenta con un programa de mejoramiento de arroz que incluye transformación genética mediada por *A. tumefaciens*, aunque los resultados hasta ahora publicados se refieren fundamentalmente a trabajos realizados con la variedad Cica-8 en transformación con biobalística, y no con variedades comerciales de FEDEARROZ (Lentini *et al.* 2003). Hay algunos reportes de trabajos con éstas variedades en condiciones *in vitro* (Beltrán & Quevedo 2007, Quevedo & Beltrán 2007), pero éstos están orientados fundamentalmente a la producción de mutantes por irradiación con rayos gamma, por cuanto no pueden usarse completamente para el desarrollo de un sistema de regeneración que funcione bajo condiciones de transformación mediada por *A. tumefaciens*. Finalmente, de manera reciente se ha publicado un trabajo del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas de la Universidad Nacional, en el que se selecciona el protocolo de regeneración de Saharan *et al.* (2004a) para las variedades F2000, F50 y F369 (Perafán 2011). Sin embargo, este protocolo presenta problemas debido a que fue diseñado únicamente como un sistema de obtención de callos y regeneración, optimizado con una fase de desecación entre las anteriores etapas. Cuando se emplea para transformación, añadiéndole la etapa de cocultivo, la obtención de regenerantes se dificulta (Saharan *et al.* 2004b), por lo que es necesario optimizarlo, ajustándolo a tales condiciones.

2. Objetivos.

Objetivo general.

Optimizar las condiciones de cultivo *in vitro* y regeneración para ensayos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens*, para las variedades colombianas de arroz FEDEARROZ 50 y FEDEARROZ 2000, mediante la utilización de diferentes reguladores de crecimiento vegetal.

Objetivos específicos.

- Determinar la concentración adecuada de reguladores de crecimiento vegetal en el medio de inducción para maximizar la producción de callos a partir de semilla madura.
- Establecer la concentración adecuada de reguladores de crecimiento vegetal en las etapas de cocultivo.
- Determinar la concentración adecuada de reguladores de crecimiento vegetal en la etapa de regeneración para optimizar la obtención de brotes a partir de callos.

3. Materiales y métodos.

3.1 Aspectos generales.

3.1.1 Material biológico.

Como material biológico se emplearon semillas maduras de las variedades de arroz *indica* FEDEARROZ 2000 y FEDEARROZ 50, facilitadas por la Federación Nacional de Arroceros. Las semillas se conservaron en laboratorio, en frasco de vidrio y oscuridad, a temperatura ambiente (ca. 20 °C).

3.1.2 Desinfección superficial y siembra.

En todos los experimentos, las semillas fueron descascaradas manualmente y desinfectadas según el protocolo previamente establecido por el Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, con algunas modificaciones puntuales (ver Anexo A).

3.1.3 Medios de cultivo.

Medio de inducción de callo (IC).

El medio de inducción de callo estuvo compuesto por medio basal MS (Murashige & Skoog 1962), sacarosa (30 g/L), prolina (0,5 g/L), ácidos casamínos (0,5 g/L) y gelrite (2,5 g/L). El pH fue ajustado a 5,8 utilizando NaOH 1N y HCl 1N. El medio fue autoclavado a 121 °C por 20 minutos.

Medios de cocultivo líquido (CCL) y sólido (CCS).

El medio de cocultivo líquido estuvo compuesto por medio basal MS (Murashige & Skoog 1962), sacarosa (68,5 g/L), glucosa (35 g/L), prolina (0,5 g/L), ácidos casamínos (0,5 g/L) y acetosiringona (200 µM). El pH fue ajustado a 5,2 utilizando NaOH 1N y HCl 1N. Por su parte, el medio de cocultivo sólido estuvo compuesto por medio basal MS (Murashige

& Skoog 1962), sacarosa (30 g/L), glucosa (10 g/L), prolina (0,5 g/L), ácidos casamínos (0,5 g/L), acetosiringona (200 μ M) y gelrite (2,5 g/L). El pH fue ajustado a 5,8 utilizando NaOH 1N y HCl 1N. Los medios fueron autoclavados a 121 °C por 20 minutos.

Medio de regeneración (MR).

El medio de regeneración estuvo compuesto por medio basal MS (Murashige & Skoog 1962), sacarosa (30 g/L), prolina (0,5 g/L), ácidos casamínos (0,5 g/L) y gelrite (6 g/L). El pH fue ajustado a 5,8 utilizando NaOH 1N y HCl 1N.

3.1.4 Protocolo de partida.

El protocolo de partida del presente trabajo fue el desarrollado por Saharan et al. (2004a), y seleccionado en la tesis de maestría de Perafán (2011) para trabajar en las variedades colombianas de arroz FEDEARROZ 2000, FEDEARROZ 50 y FEDEARROZ 369 (Ver Anexo B). Es necesario señalar que el protocolo inicialmente utilizado por Perafán (2011) no incluía la etapa de cocultivo, la cual le fue añadida posteriormente a partir de Saharan *et al.* (2004b), cuando comenzaron a realizarse los ensayos de transformación de arroz para las variedades anteriormente mencionadas.

3.2 Observaciones histológicas sobre el desarrollo del callo.

Para realizar las observaciones histológicas sobre formación de callo, se desinfectaron superficialmente y sembraron semillas de las variedades F2000 y F50 en medio de inducción de callo, suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D. Las semillas se dejaron en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total. Desde el momento de la siembra, se tomaron muestras cada tres días por tres semanas, y el material fue conservado en F.A.A. hasta el momento de la preparación. Todas las muestras recogidas fueron imbibidas en parafina histológica y cortadas en micrótomos (cortes de 5 – 9 μ m de grosor). Posteriormente, los cortes fueron teñidos mediante la técnica de doble tinción azul de astra – fucsina básica, y observados bajo microscopio óptico para su estudio (ver Anexo A).

3.3 Efecto del 2,4-D sobre la formación de callo.

Para evaluar el efecto del 2,4-D sobre la formación de callo, se desinfectaron superficialmente y sembraron semillas de las variedades F2000 y F50 en medio de inducción de callo, suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (T0 = 0 mg/L; T1 = 2,5 mg/L; T2 = 3,0 mg/L; T3 = 3,5 mg/L; T4 = 4,0 mg/L; T5 = 4,5 mg/L; T6 = 5,0 mg/L). Para cada tratamiento se sembraron 50 semillas en 5 cajas, 10 semillas por caja, inclinadas a 60° sobre el medio. Las semillas se dejaron en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, durante tres semanas. Posteriormente, se calculó el porcentaje de formación de callo como: $PFC = (N^{\circ} \text{ de callos formados} / N^{\circ} \text{ de semillas sembradas}) * 100\%$ y se determinó el peso seco de los callos en cada tratamiento.

3.4 Efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo.

Para establecer cuál es el efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo, se desinfectaron superficialmente y sembraron semillas de las variedades F2000 y F50 en medio de inducción de callo, suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D, en cajas de Petri plásticas. En un tratamiento (T1), las semillas fueron colocadas en posición inclinada sobre el medio, a un ángulo de aproximadamente 60°, con el endospermo parcialmente inmerso y el embrión sobresaliendo. En el otro tratamiento (T2), se colocaron horizontalmente sobre el medio, estando tanto el endospermo como el embrión en contacto directo con éste, pero sin inmersión. En total, se sembraron 10 semillas por caja, y se usaron 10 cajas por tratamiento, para un total de 100 semillas por tratamiento y variedad. A las tres semanas, se contabilizó el número de callos obtenidos, y se estableció el porcentaje de formación de callo como $PFC = (N^{\circ} \text{ de callos formados} / N^{\circ} \text{ de semillas sembradas}) * 100$.

3.5 Efecto del 2,4-D y la edad del callo sobre el potencial de regeneración.

Para evaluar el efecto que tienen el 2,4-D y la edad sobre el potencial de regeneración del callo, se desinfectaron superficialmente y sembraron semillas de las variedades F2000 y F50 en medio de inducción de callo, suplementado con diferentes concentraciones de 2,4-D (T1 y T2), y se incluyó como control la concentración de 2,5 mg/L utilizada en el protocolo original de Saharan *et al.* (2004a). Las concentraciones fueron seleccionadas con base en los resultados del experimento anterior, por lo tanto, éstas fueron diferentes para cada variedad. Las semillas se dejaron en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total. Cada semana, durante tres semanas, se seleccionaron 150 callos de cada variedad, con los cuales se simuló el cocultivo de acuerdo a Saharan *et al.* (2004b), pero sin utilizar bacteria. A los callos seleccionados se les retiró el brote y fueron colocados en medio de cocultivo líquido, suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D, durante 30 minutos. Posteriormente, los callos fueron secados sobre papel absorbente y transferidos a medio de cocultivo sólido, suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D. Las cajas de cocultivo sólido tenían una hoja de papel Whatman N°1 sobre el medio. Los callos fueron dejados en cámara de crecimiento a 25 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, por tres días. Posteriormente, los callos fueron desecados parcialmente colocándolos en cajas de Petri de vidrio con una hoja de papel Whatman N°1, y dejándolos en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, por 48 horas. Después de la desecación parcial, los callos fueron transferidos a medio de regeneración suplementado con 0,5 mg/L de ANA y 2,0 mg/L de KIN. La transferencia se hizo inicialmente a cajas de Petri plásticas (para cada variedad 10 callos por caja, 5 cajas por tratamiento). A las 3 semanas, los callos fueron transferidos a frascos de vidrio de 100 mL (para cada variedad 5 callos por frasco, 10 frascos por tratamiento), durante tres semanas más. Los callos se dejaron en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70 % de humedad relativa, en fotoperíodo 16 h luz / 8 horas oscuridad. Al final de este período, se contó el número de brotes formados para cada tratamiento, teniendo en cuenta únicamente aquellos de longitud igual o mayor a 5 mm. El porcentaje de regeneración se estableció como $PR = (N^{\circ} \text{ de brotes formados} / N^{\circ} \text{ de callos en regeneración}) * 100\%$.

3.6 Efecto del 2,4-D utilizado en el mediodo cocultivo en la regeneración.

Para establecer el efecto del 2,4-D empleado en la etapa de cocultivo sobre la regeneración de los callos, se desinfectaron superficialmente y sembraron semillas de las variedades F2000 y F50 en medio de inducción suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D. Las semillas se dejaron en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total. Para F2000, el período de incubación fue de dos semanas, mientras que para F50, el período de incubación fue de una semana. Adicionalmente, se utilizaron semillas de F2000 y F50 para obtener callos de tres semanas, que serían usados como control dentro del experimento.

Transcurrido el período de formación de callos, se realizó el procedimiento de simulación del cocultivo, sin usar bacteria. Para ello, se establecieron tres concentraciones de 2,4-D para los medios de cocultivo líquido y sólido (T1 = 2,5 mg/L, T2 = 1,25 mg/L y T3 = 0 mg/L), más un control con callos de tres semanas (Co = 2,5 mg/L). Para cada tratamiento se utilizaron 50 callos de cada variedad. A los callos se les removieron los brotes y fueron colocados en medio de cocultivo líquido, suplementado con la cantidad de 2,4-D correspondiente al tratamiento o control, por 30 minutos. Posteriormente, los callos fueron secados sobre papel absorbente y transferidos a medio de cocultivo sólido en cajas de Petri, suplementado con la cantidad de 2,4-D correspondiente al tratamiento o control, cada caja con una hoja de papel Whatman N°1 sobre el medio (10 callos por caja). Los callos se dejaron en cámara de crecimiento a 25 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, durante 3 días. Luego de este período, los callos fueron desecados parcialmente, colocándolos en cajas de Petri de vidrio con una hoja de papel Whatman N°1, y dejándolos en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, durante 48 horas (50 callos por caja). Finalmente, los callos fueron transferidos a medio de regeneración en frascos de vidrio de 100 mL (10 frascos por tratamiento, 5 callos por frasco), y dejados en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, bajo fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, durante tres semanas (5 callos por frasco, 10 frascos por tratamiento). Pasadas las tres semanas se realizó cambio de medio y se dejaron tres semanas más en frascos de 200 mL. Al final de este período, se contó el número de brotes formados para cada tratamiento, teniendo en cuenta únicamente aquellos de longitud igual o mayor a 5 mm. El porcentaje de

regeneración se estableció como $PR = (\text{N}^{\circ} \text{ de brotes formados} / \text{N}^{\circ} \text{ de callos en regeneración}) * 100\%$.

3.7 Efecto de los reguladores sobre el potencial de regeneración del callo.

Para evaluar el efecto de diferentes reguladores sobre el potencial de regeneración del callo, se desinfectaron superficialmente y sembraron semillas de F2000 y F50 en medio de inducción de callo suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D. Las semillas se dejaron en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total. Para F2000, el período de incubación fue de dos semanas, mientras que para F50 fue de una semana. Adicionalmente, se utilizaron semillas de F2000 y F50 para obtener callos de tres semanas, que serían usados como control dentro del experimento.

Transcurrido el período de incubación, se realizó el proceso de simulación de cocultivo, sin usar bacteria. A los callos se les removieron los brotes y fueron colocados en medio de cocultivo líquido, suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D, por 30 minutos. Posteriormente, los callos fueron secados sobre papel absorbente y transferidos a medio de cocultivo sólido en cajas de Petri, suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D. Cada caja tenía una hoja de papel Whatman N°1 sobre el medio (10 callos por caja). Los callos se dejaron en cámara de crecimiento a 25 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, durante 3 días. Luego de este período, los callos fueron desecados parcialmente, colocándolos en cajas de Petri de vidrio con una hoja de papel Whatman N°1, y dejándolos en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, en oscuridad total, durante 48 horas (50 callos por caja). Finalmente, los callos fueron transferidos a medio de regeneración en frascos de vidrio de 100 mL, y dejados en cuarto de crecimiento a 28 °C y 70% de humedad relativa, bajo fotoperíodo de 16 h luz / 8 h oscuridad, durante tres semanas (5 callos por frasco, 6 frascos por tratamiento). Pasadas las tres semanas se realizó cambio de medio y se dejaron tres semanas más en las mismas condiciones, en frascos de 200 mL. Al final de este período, se contó el número de brotes formados para cada tratamiento, se estableció la biomasa por brote y se clasificaron los brotes de acuerdo a su morfología, según la propuesta de Pérez Bernal *et al.* (2007):

- Tipo 1: Brotes de morfología normal, con estructura bipolar típica, de ápice y raíz con longitudes proporcionales.
- Tipo 2: Brotes de raíz pequeña respecto al ápice, o sin raíz.
- Tipo 3: Brotes con alteraciones fenotípicas visibles, como albinismo, hojas muy anchas, enrolladas, o con deformaciones en el eje de crecimiento.

Se tuvieron en cuenta únicamente los brotes de longitud igual o mayor a 5 mm. El porcentaje de regeneración se estableció como $PR = (N^{\circ} \text{ de brotes formados} / N^{\circ} \text{ de callos en regeneración}) * 100 \%$.

Para establecer los tratamientos a utilizar durante la etapa de regeneración, se partió de la concentración inicial utilizada en el protocolo de Saharan et al (2004a) de 0,5 mg/L de ANA y 2,0 mg/L de KIN. La proporción entre auxina y citoquinina en este caso es de $\frac{1}{4}$, de manera que se establecieron los tratamientos modificándola a $\frac{1}{2}$ o $\frac{1}{8}$. Esto se puede lograr de dos maneras: dejando fija la cantidad de auxina y modificando la cantidad de citoquinina, o dejando fija la cantidad de citoquinina y aumentando la auxina. Como se muestra en la tabla 3-1, en el primer caso, las nuevas concentraciones serían 0,5 mg/L de auxina + 1,0 mg/L de citoquinina ($\frac{1}{2}$), y 0,5 mg/L de auxina + 4,0 mg/L de citoquinina ($\frac{1}{8}$). En el segundo caso, las nuevas concentraciones serían 1,0 mg/L de auxina + 2,0 mg/L de citoquinina ($\frac{1}{2}$), y 0,25 mg/L de auxina + 2,0 mg/L de citoquinina ($\frac{1}{4}$). Los tratamientos establecidos se encuentran detallados en la tabla 3-2.

Tabla 3-1: Proporciones y concentraciones de auxina (AUX) / citoquinina (CIT) en mg/L.

En negrilla se resalta la concentración usada en el artículo de Saharan et al. (2004a).

$\frac{1}{2}$; 0,5 AUX / 1,0 CIT	$\frac{1}{4}$; 0,5 AUX / 2,0 CIT	$\frac{1}{8}$; 0,5 AUX / 4,0 CIT
$\frac{1}{2}$; 1,0 AUX / 2,0 CIT	$\frac{1}{4}$; 1,0 AUX / 4,0 CIT	$\frac{1}{8}$; 0,25 AUX / 2,0 CIT

Tabla3-2: Tratamientos utilizados durante la regeneración para las variedades F2000 y F50.

Concentración de reguladores en mg/L. * Co: callos de 3 semanas para ambas variedades.

Tratamiento	ANA	KIN	BAP
Co*	0,5	2,0	-
T0	0,5	2,0	-
T1	0,25	2,0	-
T2	1,0	2,0	-
T3	1,0	4,0	-
T4	0,5	4,0	-
T5	0,5	1,0	-
T6	0,5	-	2,0
T7	0,25	-	2,0
T8	1,0	-	2,0
T9	1,0	-	4,0
T10	0,5	-	4,0
T11	0,5	-	1,0
T12	-	-	-

3.8 Análisis estadístico.

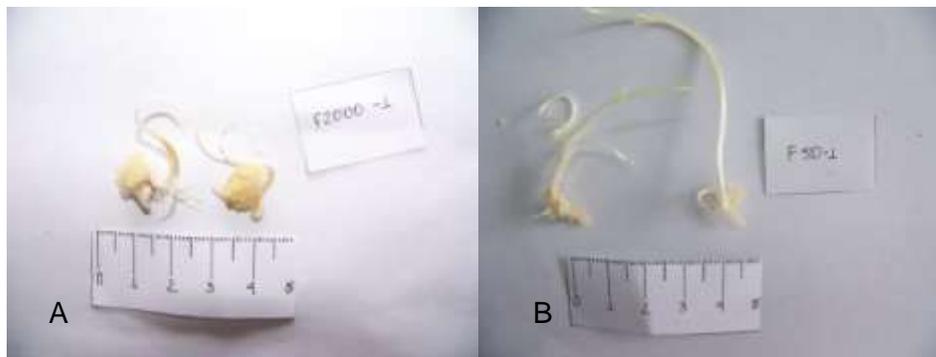
Para el análisis estadístico se utilizó el programa Minitab® 16 para Windows™. En todos los casos se realizaron pruebas de normalidad (Anderson-Darling y Ryan-Joiner). Dado que los datos de ningún experimento se ajustaban a la distribución normal, se intentaron normalizar. Sin embargo, los datos no son normalizables, por lo tanto, se optó por utilizar métodos no paramétricos en todos los experimentos. Para el efecto de 2,4-D y edad sobre potencial de regeneración de callo se utilizó la prueba no paramétrica de Friedman. Para todos los demás los experimentos, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis.

4. Resultados y discusión.

4.1 Observaciones morfológicas e histológicas sobre desarrollo de callo.

Morfológicamente se observaron algunas diferencias en la respuesta de formación de callo de las semillas de ambas variedades (Figura 4-1).

Figura4-1: Callos de tres semanas de F2000 (A) y F50 (B).

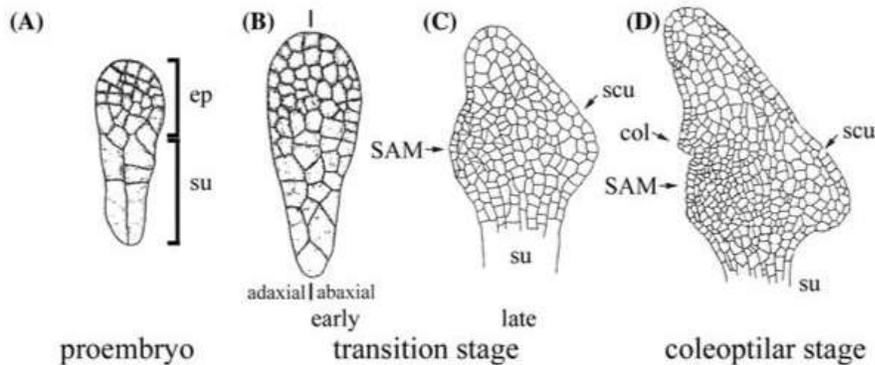


De las semillas se forman callos y brotes, claramente distinguibles como tal si se abre el coleóptilo que los envuelve, puesto que quedan al descubierto las hojas. No es cierto que la estructura desarrollada corresponda a una raíz, como afirma Perafán (2011). En general, los callos de F2000 fueron de mayor tamaño que los de F50. Estos eran de color amarillo crema a amarillo, presentaban textura granulosa en su superficie y tendían a deshacerse con facilidad. Los callos de F50 por su parte, tendían a ser de color blanco, amarillo a ocre, con textura superficial de granulosa a lisa, podían ser de blandos a compactos, y frecuentemente desarrollaban estructuras similares a raíces sobre su superficie y en la zona de unión con el brote. Los brotes de F2000 generalmente eran pequeños y albinos, mientras que los de F50 eran alargados, y podían llegar a tornarse verde-pálidos y a desarrollar raíces. Las diferencias en la respuesta a condiciones *in*

vitro de ambas variedades son esperables, de acuerdo a lo reportado por muchos autores para los materiales de arroz *indica*, debido a que la respuesta está influida por el genotipo (Saharan *et al.* 2004a, Amarasinghe *et al.* 2005, Grewal *et al.* 2005, Hoque *et al.* 2007, Kathuria *et al.* 2007).

Figura4-2: Primeras etapas de la embriogénesis cigótica en maíz. Tomado de Zimmermann & Werr (2005).

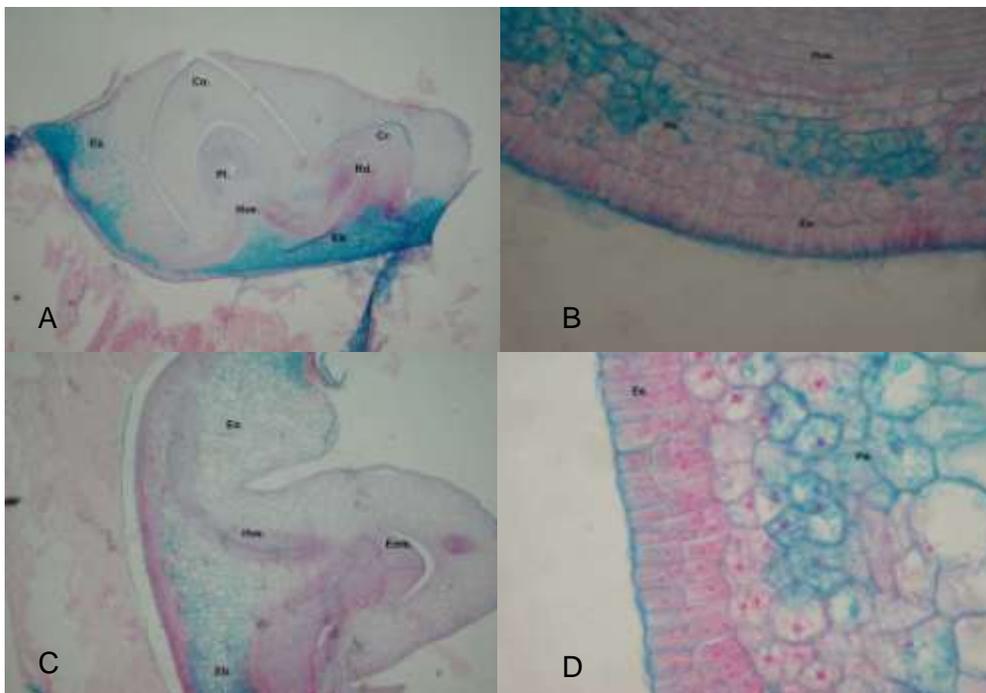
A) Proembrión; B) y C) etapa transicional; D) etapa coleoptilar. ep: embrión propiamente dicho; su: suspensor; SAM: meristema apical del tallo; scu: escutelo; col: coleóptilo.



Histológicamente, los callos de F2000 y F50 no presentaron grandes diferencias salvo por su tamaño. Con base en los mejores preparados obtenidos, en el presente trabajo solamente se mostrarán los cortes de F2000. En la figura 4-2 se ilustran las primeras etapas de la embriogénesis cigótica en maíz – una monocotiledónea típica. Según Jones & Rost (1989), la formación del callo inicia con la división de las células del epitelio escutelar, que normalmente se encuentran en una fila (Figura 4-3 A, B), pero a los tres días de iniciado el cultivo ya presentan divisiones periclinales, que indican un proceso activo de división celular (Figura 4-3 C, D), y corresponden al momento en el que inicia la formación del callo. También puede verse un agrandamiento de las células del parénquima escutelar. La intensidad de la tinción de los núcleos y contenido de las células del epitelio escutelar, indican una fuerte actividad meristemática en este tejido.

Figura4-3: Iniciación del callo.

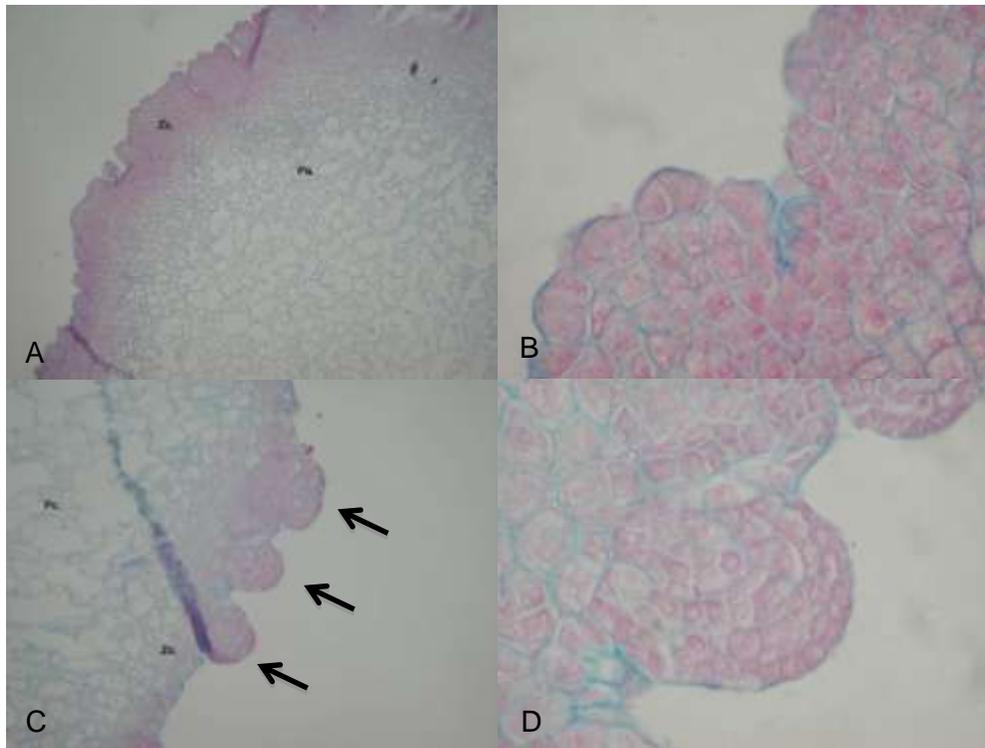
A: embrión maduro, 4X. B: detalle del epitelio escutelar, 40X. C: embrión a 3 días de siembra, 4X. D: detalle a 40X. Co: coleóptilo; Cr: coleorriza; Ea: Escutelo apical; Eb: escutelo basal; Ee: epitelio escutelar; Emb: embrión; Hve: haz vascular embrional.; Pe: parénquima escutelar; Pl.: plúmula; Rd.: radícula.



En el mismo período de tres días también pueden encontrarse callos completamente formados (figura 4-4). Esto contradice lo establecido por Perafán (2011), en donde se afirma que para las mismas variedades, solamente se observan callos a partir de la segunda semana.

Figura 4-4: Etapas iniciales de la embriogénesis somática.

A: callo de 3 días a 4X. B: detalle de protuberancias superficiales a 40X. C Callo de 6 días, con tres masas proembrionales en su superficie, a 10X. D. Detalle de una masa proembrional a 40X. Pc: parénquima central; Pe: parénquima escutelar; Zc: zona cortical.

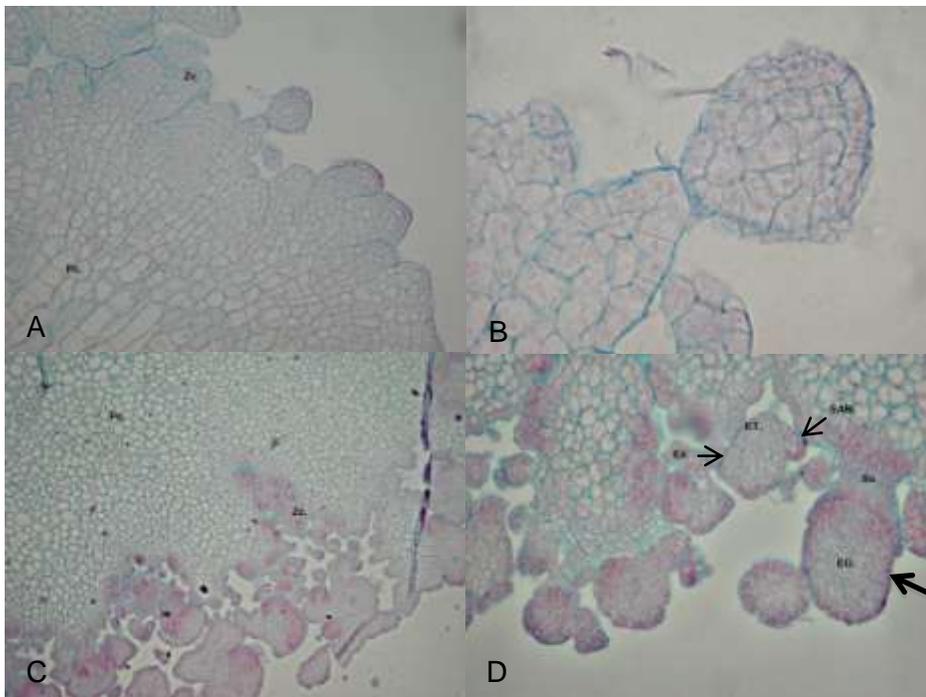


En los callos de tres días se pueden distinguir claramente dos zonas (Figura 4-4 A): hacia la superficie (zona cortical) se ubican células pequeñas que tiñen fuertemente con fucsina, mientras que hacia el interior del callo (parénquima central) se encuentran células más grandes, de paredes gruesas y con contenido celular escaso o ausente. La idea normalmente establecida de un callo como una masa amorfa de tejido parenquimatoso y sin ningún tipo de organización (Beltrán & Quevedo 2007), al menos en este caso, no sería cierta. Es claro que la región del callo que importa en términos de la capacidad de regeneración es la zona cortical, dada la intensidad de la tinción con fucsina. El parénquima central no tiene actividad meristemática; de hecho, en callos de

más de dos semanas es posible observar que la zona central se oscurece y oxida, o puede incluso tener espacios abiertos (imágenes no mostradas). Resultados similares fueron reportados por Narciso & Hattori (2010) para variedades *indica*.

Figura4-5: Diferentes estados de la embriogénesis sobre callos de nueve días.

A: callo de 9 días a 10X. B: detalle de embrión globular, a 40X. C: Masas embrionales en diferentes estados de desarrollo sobre callo de 9 días. D: Detalle a 40X. EG: embrión en etapa globular temprana; Es: escutelo; ET: Embrión en etapa globular tardía; Pc: Parénquima central; SAM: meristemo apical del tallo; Su: suspensor; Zc: zona cortical.



Sobre la superficie del callo, pueden distinguirse protuberancias que corresponden a masas proembrionales, precursoras de embriones somáticos (Figura 4-4: B). Aunque Jones & Rost (1989) reportaron que los embriones se forman a partir de una sola célula durante la primera división periclinal del epitelio escutelar, los resultados obtenidos en este trabajo sugieren que los embriones se forman a partir de las células más externas del callo, tal como lo reportan Vega *et al.* (2009) y Narciso & Hattori (2010). Según Meneses *et al.* (2009), los embriones somáticos se pueden formar a partir de una sola

célula, o a partir de un grupo de ellas. En este caso, no es posible hacer afirmaciones en un sentido o el otro. En callos de seis días, puede observarse la formación de masas proembrionales que se asocian con los primeros estados de desarrollo de un embrión (ver figura 4-2, proembriones). En la figura 4-4 D puede verse la diferenciación entre las células del callo y las del proembrión; hacia la cara externa de éste último, se aprecia una protodermis más o menos definida (compárese 4-4 D con 4-2). Por otra parte, a nivel anatómico puede observarse una reducción del tamaño de la zona cortical del callo, que podría estar relacionada con la pérdida de la capacidad de proliferación y del potencial embriogénico de los callos en medio de inducción a medida que pasa el tiempo (Litz& Jarret 1993, Rodríguez-Enríquez *et al.* 2011).

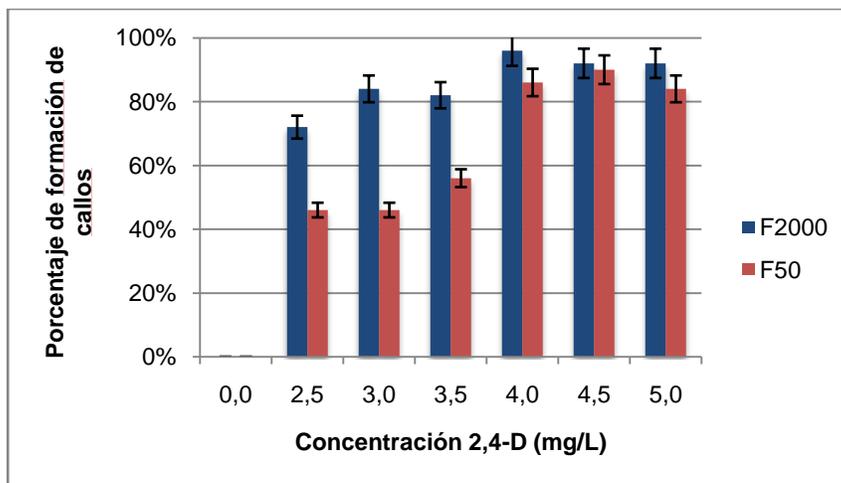
A los nueve días ya es posible observar embriones somáticos inmaduros sobre la superficie del callo, totalmente reconocibles (figura 4-5, comparar con figura 4-2). La zona cortical se mantiene reducida con respecto a lo visto en callos de tres días (figura 4-5: A y C). Sobre el callo se puede observar una masa que semeja a un proembrión (figura 4-5: B). Las masas redondas que se ven en la figura 4-5 C, corresponden a diferentes estados de desarrollo de los embriones en etapa transicional o globular. La figura 4-5 D muestra el detalle de dos de estas estructuras. Señalado con una flecha gruesa, se encuentra un embrión en etapa globular temprana (EG), con una estructura similar a un suspensor en la parte inferior (Su). Este tipo de estructuras han sido reportadas previamente por Vega *et al.* (2009) en arroz *indica* costarricense. Por el tamaño cabe pensar que no corresponde al embrión globular típico de la embriogénesis cigótica en monocotiledóneas; sin embargo, en la embriogénesis somática es común encontrar todo tipo de alteraciones en el desarrollo morfológico de los embriones, por cuanto no sería de extrañar la presencia de un embrión globular tan grande (Neumann *et al.* 2009, Vega *et al.* 2009). Por otra parte, sobre la misma figura se observa un embrión en etapa globular tardía. Es posible distinguir una protodermis más o menos diferenciada, junto a una estructura que asemeja el meristemo apical del tallo en un lado, y opuesto a éste, otra que podría corresponder al escutelo en su etapa más temprana de desarrollo. Dada la presencia de embriones inmaduros reconocibles como tales, en callos de tan solo seis días, no sería necesario esperar tres semanas o más para utilizar los callos en transformación, como se plantea en los trabajos de Saharan *et al.* (2004a,b) y Perafán

(2011), puesto que desde etapas tempranas presentan competencia para la regeneración.

4.2 Efecto del 2,4-D sobre la formación de callo.

Como se observa en la figura 4-6, se presentaron diferencias en cuanto al porcentaje de callos formados para cada tratamiento y entre las diferentes variedades.

Figura4-6: Porcentaje de formación de callos por tratamiento y variedad.

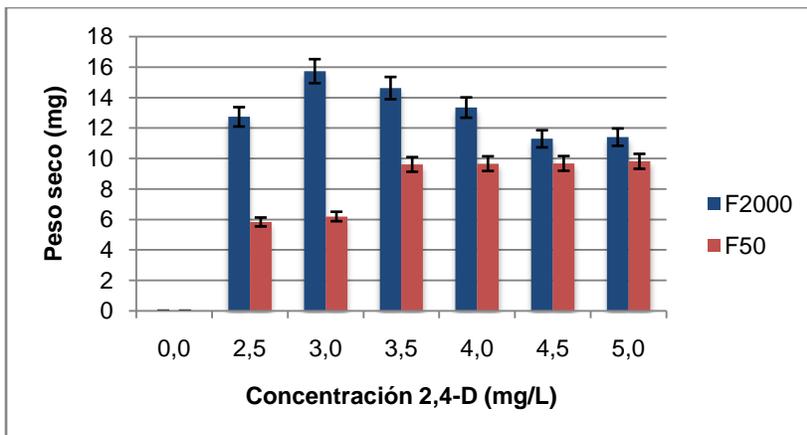


El tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el número de callos formados para ambas variedades (F2000: $p < 0,001$; F50: $p < 0,001$). Es evidente, por los resultados obtenidos en el tratamiento sin 2,4-D, que este regulador es el factor fundamental en el estímulo para la producción de callos, pese a que otros factores como los componentes del medio y las condiciones ambientales, puedan influir en la respuesta morfogénica (Litz & Jarret 1993, Mroginski & Roca 1993, Pérez Molpe Balch *et al.* 1999, Pedroza Manrique 2008). Para todos los tratamientos, F2000 presentó porcentajes de formación de callo superiores a los de F50. Para ambas variedades, se observa una tendencia al incremento en el número de callos con una mayor concentración de 2,4-D. Sin embargo, puede apreciarse una ligera disminución en el número de callos formados a partir de 4,5 mg/L de regulador para F2000, y de 5,0 mg/L para F50, por lo que podría pensarse que

el óptimo para inducción de callos por caja se encuentra entre 4,0 y 4,5 mg/L de 2,4-D. Esto coincide con lo reportado por Machakova *et al.* (2008), donde se indica que altas concentraciones de auxina en el medio tienen un efecto tóxico, y pueden actuar como inhibidoras de la respuesta morfogénica.

El tamaño de los callos formados se estimó determinando el peso seco de cada uno de ellos. Nuevamente, el tratamiento tuvo un efecto significativo sobre el tamaño de callo formado (F2000: $p < 0,05$; F50: $p < 0,001$), siendo los de F2000 más grandes que los de F50 en todos los tratamientos (Figura 4-7). Sin embargo, existe una diferencia frente a la tendencia presentada en número de callos formados, ya que el tamaño óptimo de callo se alcanza con 3,0 mg/L, no así con el número de callos formados (Figura 3-5). Obsérvese que a partir de ésta concentración, se presenta una reducción en el peso seco. Podría pensarse que debido al aumento del número de callos formados, la disponibilidad de recursos al interior de cada caja disminuye por un incremento de la demanda, y por tanto, el callo se reduce. Para F50, el peso promedio de callo alcanza un óptimo a partir de 3,5 mg/L de 2,4-D, y se mantiene estable hasta los 5,0 mg/L. De nuevo, se observa el mismo fenómeno que se presenta en F2000, puesto que el tratamiento óptimo en número de callos no coincide con el tratamiento óptimo en tamaño de callo. Es posible considerar la misma razón que en el caso anterior.

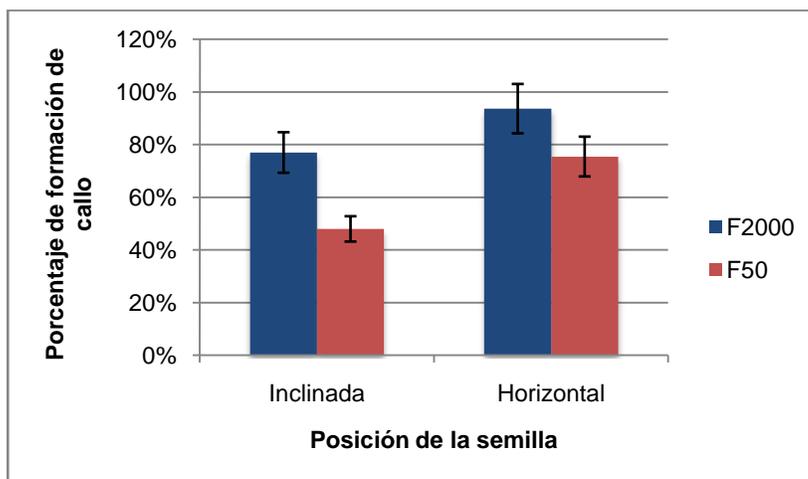
Figura4-7: Peso seco promedio de callo formado por tratamiento y variedad.



4.3 Efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo.

La prueba de Kruskal-Wallis encontró efectos significativos de la posición de siembra de la semilla sobre el porcentaje de formación de callo para ambas variedades (F2000: $p = 0,001$; F50: $p \ll 0,001$). En la figura 4-8 puede verse que hay un aumento importante en el número de callos formados. En F2000 se pasa de un porcentaje de formación de 77% a 94%, y en F50 se pasa de 48% a 75%. Originalmente, de acuerdo al protocolo establecido en el Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, la semilla se sembraba en posición inclinada con respecto al plano formado por el medio de cultivo, en un ángulo de 60°. Sin embargo, el cambio en la posición de semilla tiene un efecto positivo sobre la inducción de callo. Esta situación probablemente esté relacionada con la función del escutelo dentro de la semilla. Éste tejido, y particularmente las células del epitelio, se encargan de la absorción de azúcares y reguladores de crecimiento vegetal, necesarios para el desarrollo normal del embrión (Vega *et al.* 2009). En este caso, es posible considerar que colocando a la semilla en posición horizontal sobre el medio, el epitelio escutelar se encuentra en contacto directo o mucho más cercano a éste. De ese modo, la absorción del 2,4-D hacia las células del epitelio es más rápida, y esto a su vez, favorecería la respuesta de formación de callo.

Figura4-8: Efecto de la posición de siembra de la semilla sobre la formación de callo.

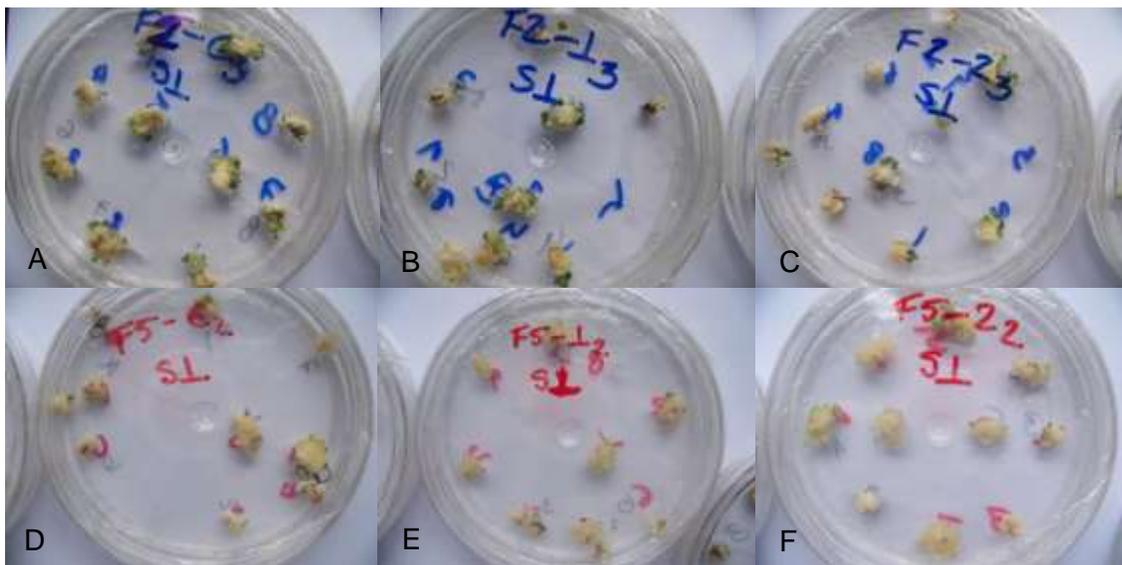


4.4 Efecto del 2,4-D y la edad del callo sobre el potencial de regeneración.

Para establecer el efecto del 2,4-D sobre la regeneración, se seleccionaron dos concentraciones para cada variedad, de acuerdo a los resultados de los experimentos anteriores. Para F2000 fueron T1 = 3,0 mg/L y T2 = 4,0 mg/L. Para F50 fueron T1 = 3,5 mg/L y T2 = 4,5 mg/L. Dichas concentraciones fueron seleccionadas debido a que una cantidad de 2,4-D apropiada para maximizar el número de callos formados, no corresponde a la cantidad adecuada para maximizar el tamaño del callo. Escogiendo dos concentraciones en lugar de una sola, se intentó balancear ambas variables de respuesta. Adicionalmente, se utilizó un control (Co) con la misma concentración de 2,4-D utilizada en el protocolo de Saharan *et al.* (2004a). De acuerdo con el método empleado por Perafán (2011), los callos se dejan en cajas de Petri plásticas por tres semanas, cuando pasan a regeneración. No obstante, pasado este tiempo, la mayoría de callos apenas estaban formando puntos verdes y estructuras similares a embriones maduros sobre su superficie, con muy pocos brotes elongados (Figura 4-9). Por tal razón, los callos fueron transferidos al mismo medio en frascos de vidrio de 100 mL y tapados con vinilpel, y se dejaron en las mismas condiciones de regeneración por tres semanas más.

Figura 4-9: Callos de F2000 (A, B y C) y F50 (D, E y F), a 3 semanas de regeneración.

A y D: controles; B y E: T1; C y F: T2.



Transcurridas las tres semanas adicionales, se contó el número de brotes para cada tratamiento. En ambos casos, la prueba de Friedman detectó diferencias significativas por tratamiento y tiempo de formación del callo (F2000: $p = 0,05$; F50: $p = 0,05$). Dado que el valor de p para las dos variedades se situó sobre el umbral de rechazo, este resultado debe tomarse con cautela. Sin embargo, cuando se comparan los porcentajes de regeneración, agrupados por tratamiento y de acuerdo al tiempo de inducción del callo, se observa una tendencia. En la figura 4-10 puede verse que el incremento en la concentración de 2,4-D para F2000, durante la producción de callos, tuvo un efecto negativo sobre la regeneración. Mientras que para 2,5 mg/L, los porcentajes oscilaron entre 46% y 70%, para 3,0 mg/L se redujeron a 26% – 54%, y para 4,0 mg/L descendieron a 12% – 44%. Por otra parte, la edad del callo también tuvo un efecto sobre el potencial de regeneración, pues a mayor tiempo de formación de callo, menor cantidad de brotes formados. La única excepción a esta tendencia se presentó en los callos inducidos con 2,5 mg/L de 2,4-D, que lograron mantener una regeneración del 70% hasta una edad de 2 semanas. F50 por su parte, presentó porcentajes de regeneración menores que F2000, aunque la concentración de 2,4-D durante la etapa de inducción de callo y la edad del explante influyeron de forma similar en la capacidad regenerativa (Figura 4-11). Se observa que la regeneración más elevada se registró en callos incubados con 2,5 mg/L de 2,4-D, durante una semana. Callos incubados a concentraciones mayores de 2,4-D o de mayor tiempo de desarrollo presentaron porcentajes de regeneración menores.

Figura4-10: Porcentaje de regeneración para F2000 por tratamiento y tiempo de formación de callo.

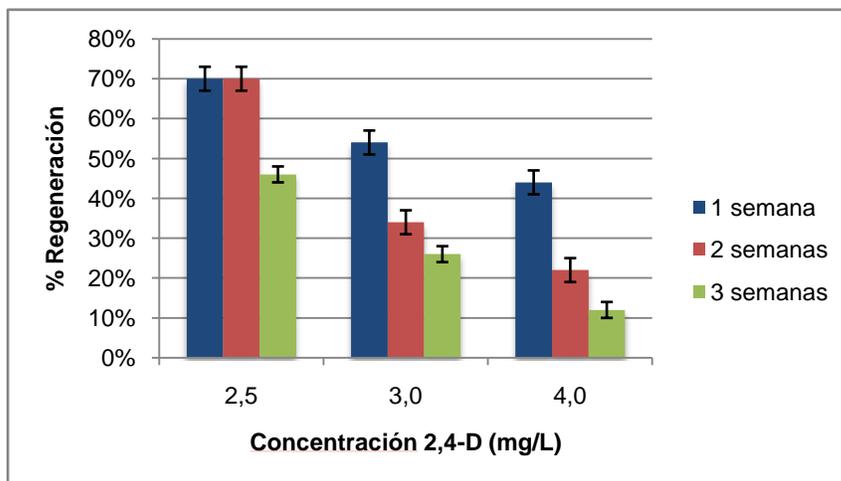
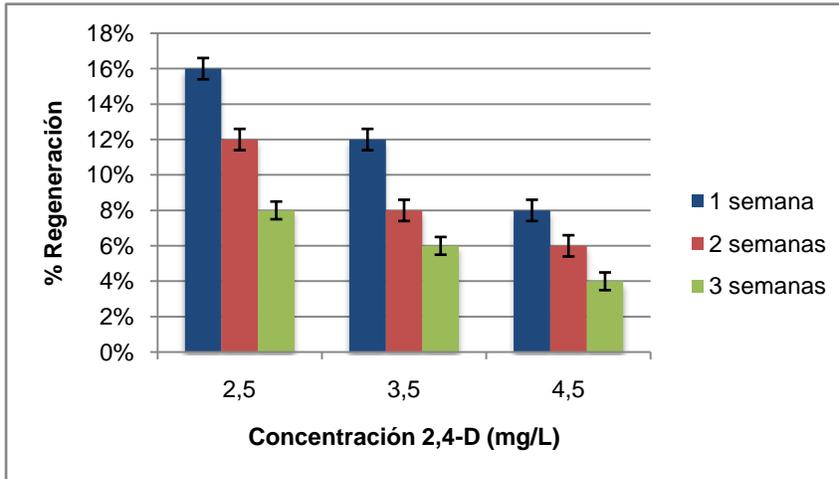


Figura4-11: Porcentaje de regeneración para FEDEARROZ 50 por tratamiento y tiempo de formación de callo.



Aunque la respuesta de las dos variedades es diferente, puesto que los porcentajes de regeneración de F2000 son mayores que los de F50, es claro que el efecto de la concentración del 2,4-D y el tiempo de inducción sobre la capacidad de regeneración de los callos es más o menos similar para ambas variedades. En general, un tiempo prolongado de incubación de un explante puede provocar la pérdida de su capacidad de respuesta; en cultivo *in vitro*, es preferible utilizar tejidos o explantes jóvenes, que pueden responder mejor a las condiciones de incubación (Litz & Jarret 1993). En la embriogénesis somática indirecta, una de las causas que subyacen detrás de este fenómeno es la acumulación de aberraciones cromosómicas en las células. De hecho, existen varios reportes que señalan a las auxinas como el 2,4-D, como inductores de aneuploidías (Singh 2003). Evidencia molecular reciente sugiere que las elevadas concentraciones de reguladores en medios de cultivo *in vitro* pueden provocar la alteración de la expresión de ciertos miRNAs en los callos. Esta alteración a su vez, sería la responsable de los numerosos cambios asociados a tiempos prolongados de inducción, incluyendo la pérdida del potencial embriogénico (Rodríguez-Enríquez *et al.* 2011).

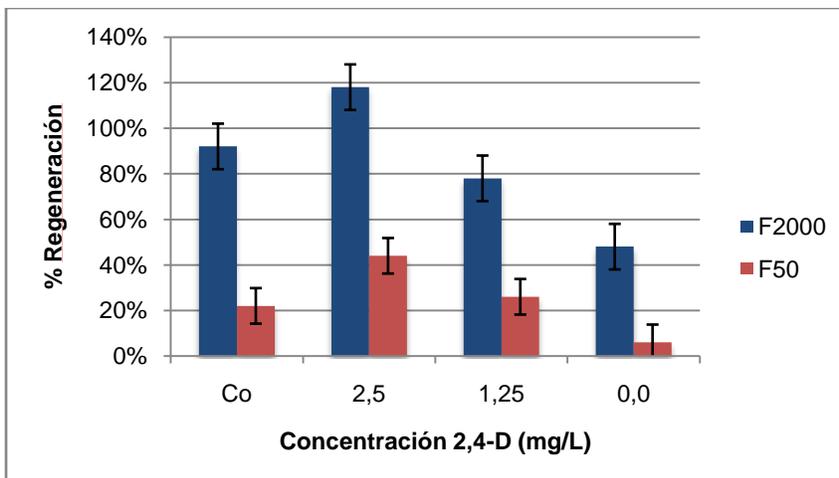
Adicionalmente, se debe tener en cuenta que el 2,4-D actúa no solamente como inductor de la formación del callo, sino que también promueve la formación de embriones somáticos. No obstante, este mismo regulador impide que los embriones maduren, y éstos solamente pueden producir plantas completas si son transferidos a un medio libre de 2,4-D (Jones & Rost 1989, Raghavan 2004, Neumann *et al.* 2009). Altas concentraciones de 2,4-D pueden favorecer la inducción de callos, pero al mismo tiempo, pueden causar problemas durante la regeneración ya que quedan residuos al interior de las células, y éstos retrasan la maduración de los embriones (Meneses *et al.* 2005). Además, se sabe que concentraciones elevadas de 2,4-D estimulan la producción de etileno por los explantes, el cual actúa como inhibidor de crecimiento y desarrollo en cultivos *in vitro* (Machakova *et al.* 2008). Podría considerarse, para experimentos futuros, la utilización de una menor cantidad de 2,4-D durante la etapa de inducción de callo (por ejemplo, 2,0 mg/L o menos), combinándolo con una cierta cantidad de ANA. Esto podría permitir la formación de callos embriogénicos, y al mismo tiempo, reducir la exposición de los mismos al 2,4-D, por lo que, consecuentemente, podría elevarse el potencial de regeneración.

4.5 Efecto del 2,4-D utilizado en el medio de cocultivo en la regeneración.

El 2,4-D es el regulador encargado de estimular el crecimiento del escutelo para formar el callo, y de provocar la formación de embriones somáticos a partir de éste (Jones & Rost 1989, Litz & Jarret 1993). Sin embargo, tiene un efecto negativo sobre el potencial de regeneración, pues provoca la aparición de aberraciones cromosómicas, la alteración de los mecanismos de regulación de expresión génica, e impide la maduración de los embriones formados durante la etapa de inducción (Jones & Rost 1989, Singh 2003, Meneses *et al.* 2005, Rodríguez-Enríquez *et al.* 2011). Debido a que el medio de cocultivo esencialmente es el mismo de inducción de callo, salvo por la adición de glucosa y AS (Saharan *et al.* 2004b), se planteó la posibilidad de que una reducción del 2,4-D en esta etapa tuviera un efecto positivo sobre la formación de brotes en la regeneración.

La prueba de Kruskal-Wallis no encontró diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos para ninguna variedad (F2000: $p = 0,405$; F50 $p = 0,430$). Sin embargo, la figura 4-12 muestra una tendencia en los porcentajes de regeneración. Tanto para F2000 como para F50, se observa que se obtuvieron más brotes en T1, que corresponde a la misma concentración de 2,4-D utilizada por el protocolo de Saharan *et al.* (2004b), pero con callos de dos semanas para F2000 (118%) y una semana para F50 (44%). El control con callos de tres semanas tuvo porcentajes inferiores para las dos variedades (F2000 = 92%, F50 = 22%). Es interesante observar que, comparativamente y para las mismas condiciones, en este experimento se obtuvieron porcentajes de regeneración mayores que los alcanzados en el experimento sobre el efecto del 2,4-D y edad del callo en el potencial de regeneración (ver 4.4). Para callos de tres semanas, la regeneración en F2000 fue de 46%, y para callos de dos semanas fue de 70%. Por su parte, en F50, para callos de tres semanas la regeneración fue de 8%, y para callos de una semana fue de 16%. Si bien los resultados no son en principio comparables, puesto que ambos experimentos se realizaron en momentos diferentes, llama la atención el que se presenten diferencias relativamente grandes entre los porcentajes de regeneración.

Figura4-12: Efecto de la concentración de 2,4-D usada durante el cocultivo en la regeneración.



Revisando el protocolo experimental para cada caso, se observa que la única diferencia entre uno y otro es la utilización de frascos durante todo el tiempo de regeneración en el experimento de cocultivo, mientras que en el de inducción de callo, se usaron cajas de Petri durante las primeras tres semanas y luego se hizo transferencia a frascos por otras tres semanas. Podría pensarse que el tipo de recipiente utilizado influyó en el incremento observado en regeneración. La producción y acumulación de compuestos volátiles en los recipientes es uno de los problemas que ocurren en el cultivo *in vitro*. Entre ellos, el etileno desempeña un papel importante, puesto que actúa como inhibidor del crecimiento vegetal, reduce la disponibilidad de oxígeno dentro del recipiente, e indirectamente, puede provocar la aparición de malformaciones en las plantas producidas (Hazarika 2006). Una de las soluciones a este problema es justamente, la utilización de recipientes grandes como frascos en lugar de cajas de Petri, que ayudan a disminuir la concentración de etileno en la atmósfera (Jackson *et al.* 1991).

En contra de lo que se esperaba, reducir la concentración de 2,4-D usada durante el cocultivo, afecta de manera negativa al potencial de regeneración de los callos. Para F2000, los porcentajes caen a 78% con 1,25 mg/L y a 48% con 0 mg/L, mientras que para F50 disminuyen a 26% y 6% respectivamente. Cabe señalar que visualmente, los niveles de oxidación de callos fueron mayores cuando se disminuyó la cantidad de 2,4-D, por lo que podría considerarse que este regulador tiene, de alguna manera, un efecto protector sobre los explantes. Generalmente, se ha asociado el uso de 2,4-D con el incremento en la oxidación de diferentes tipos de explante en cultivos *in vitro*, pues se considera que estimula la liberación de compuestos fenólicos al medio (Azofeifa 2009). Sin embargo, se ha reportado que la eliminación del 2,4-D de un medio de inducción puede asociarse con oxidación, muerte celular y acidificación extracelular en cultivos *in vitro* de picea noruega (Bozhkov *et al.* 2002, citado en Machakova *et al.* 2008). Dada la naturaleza auxínica de este regulador (Litz & Jarret 1993), podría especularse que cuando el estímulo de multiplicación celular desaparece del medio, se podrían activar procesos al interior de las células del explante que las llevan a su oxidación y muerte.

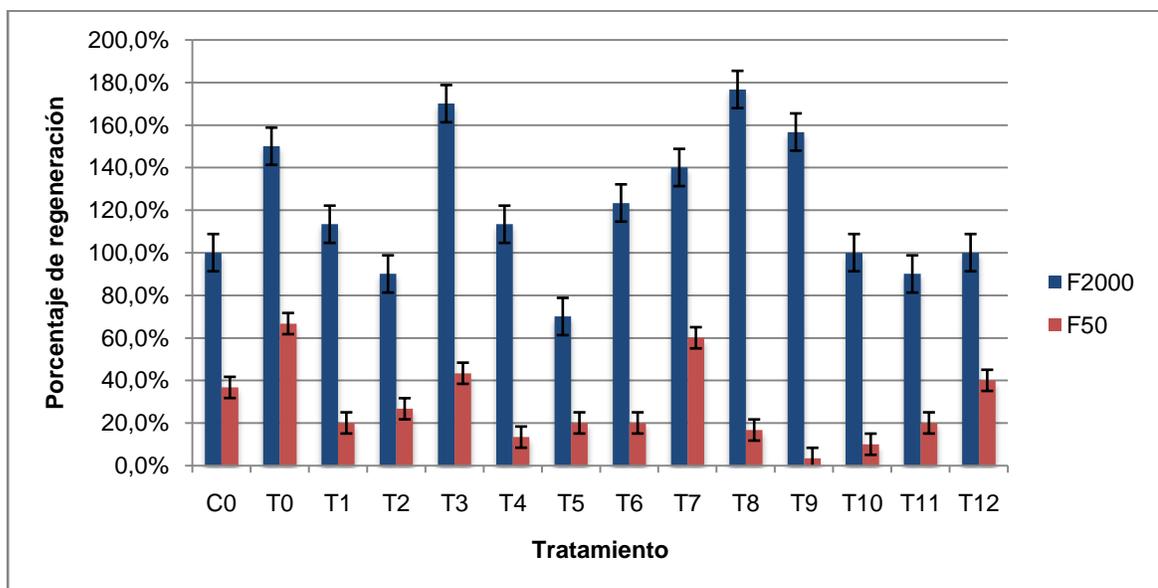
4.6 Efecto de los reguladores sobre el potencial de regeneración del callo.

La figura 4-12 muestra los porcentajes de regeneración por tratamiento, para ambas variedades. En ambos casos, la prueba de Kruskal-Wallis no detectó diferencias estadísticamente significativas (F2000: $p = 0,670$; F50: $p = 0,680$). Sin embargo, sobre la gráfica pueden observarse diferencias en los valores obtenidos para los diferentes tratamientos. Nótese en primer lugar, que la ausencia de reguladores en el medio de regeneración no impidió la formación de una cantidad importante de brotes en ambas variedades (T12: F2000 = 100%; F50 = 40%). Los porcentajes de regeneración en este caso fueron similares a los obtenidos con callos de tres semanas y usando la concentración de ANA y KIN establecida en el protocolo de Saharan et al. (2004a) (Co: F2000 = 100%; F50 = 36,7%). No siempre es necesaria la adición de reguladores a un cultivo para obtener una respuesta morfogénica (Mroginski & Roca 1993). En principio, la condición fundamental para permitir la maduración de los embriones somáticos producidos durante la etapa de formación de callo, es retirar el 2,4-D del medio (Jones & Rost 1989, Litz & Jarret 1993, Neumann *et al.* 2009). En tal caso, los reguladores utilizados durante la etapa de regeneración, actúan como coadyuvantes en la respuesta de maduración de embriones y elongación de brotes, pero no son indispensables para la misma. Además, el que los embriones sean capaces de madurar sin la necesidad de adicionar reguladores al medio, implica necesariamente que éstos producen sus propias fitohormonas.

Por otra parte, puede verse que la respuesta de las variedades a los tratamientos no fue la misma. Debe tenerse en cuenta que no todas las citoquininas actúan de la misma forma, y que, diferentes tipos de explantes y genotipos requieren de diferentes tipos de citoquininas para presentar una respuesta morfogénica óptima (Van Staden *et al.* 2008). Por tal razón, es de esperarse que el BAP y la KIN no tengan el mismo efecto sobre los callos. F2000 presentó en general, los valores más altos de regeneración en los tratamientos en los que se empleó BAP como auxina (Figura 4-13, tratamientos 6-11). El porcentaje de regeneración fue siempre mayor a 100% excepto en T11, donde fue de 90%. T8 presentó el porcentaje más elevado, con 176,7%. En cuanto a los tratamientos con KIN, los porcentajes variaron entre 70% y 170%, siendo el más alto T3 (Figura 4-13, tratamientos 0-5). En todo caso, dos tratamientos (T2 y T5) no superan el 100% de

regeneración. Para F50 por el contrario, los valores más altos de regeneración se presentaron en los tratamientos con KIN, donde variaron entre 13,3% y 66% (Figura 4-13, tratamientos 0-5). Los tratamientos con BAP tuvieron porcentajes de regeneración entre 3,3% y 60% (Figura 4-13, tratamientos 6-11). Resulta claro que la respuesta de los explantes a la citoquinina cambia de acuerdo al genotipo de la variedad con que se trabaja.

Figura 4-13: Porcentajes de regeneración para F2000 y F50 por tratamiento.



Como era de esperarse, no todos los brotes obtenidos resultaron morfológicamente iguales. En la figura 4-14 pueden verse algunos ejemplos de cada tipo de brote producido en el experimento. Por su parte, la figura 4-15 muestra que F2000 produjo brotes con algún tipo de malformación, y que la cantidad de brotes malformados varió de acuerdo al tratamiento empleado. Solamente el tratamiento 5 presentó un 100% de brotes desarrollados normalmente. No obstante, de manera general puede verse que los tratamientos con KIN presentaron una mayor proporción de brotes normales que los tratamientos con BAP. En éstos últimos se presentaron porcentajes relativamente altos de brotes con algún tipo de anomalía. Obsérvese que el único tratamiento con BAP, para el cual la proporción de brotes normales es superior al 80%, es T11. En éste,

únicamente se utiliza 1,0 mg/L de regulador, por lo que es posible suponer que el BAP en cantidades elevadas provoca la formación de brotes anormales. En tal caso, si bien el uso de este regulador estimula la regeneración, y permite alcanzar porcentajes superiores a los obtenidos con KIN, el incremento aparente en brotes formados resulta en la disminución del porcentaje de brotes normales. Para T8, si bien el porcentaje de regeneración fue de 176,7% (Figura 4-13), apenas la mitad de los brotes formados eran morfológicamente normales. Debe considerarse la alta proporción de brotes tipo 3 (28,3%) en comparación con T3 (11,8%). En principio, podría considerarse que este problema puede resolverse si los brotes son transferidos a un medio de enraizamiento adecuado. Sin embargo, ese paso no fue contemplado en este trabajo, por lo que su efectividad como solución a la pobre formación de raíces en los tratamientos con BAP sería inicialmente especulativa, y debería confirmarse experimentalmente. Por las anteriores razones, no es recomendable la utilización de BAP para F2000, pese al mayor porcentaje de regeneración obtenido, y sería más adecuado continuar usando KIN como citoquinina en el medio, en las proporciones usadas en T3.

Figura4-14: Brotes de F2000 por tipo morfológico. A y B: tipo 1; C: tipo 2; D: tipo 3.

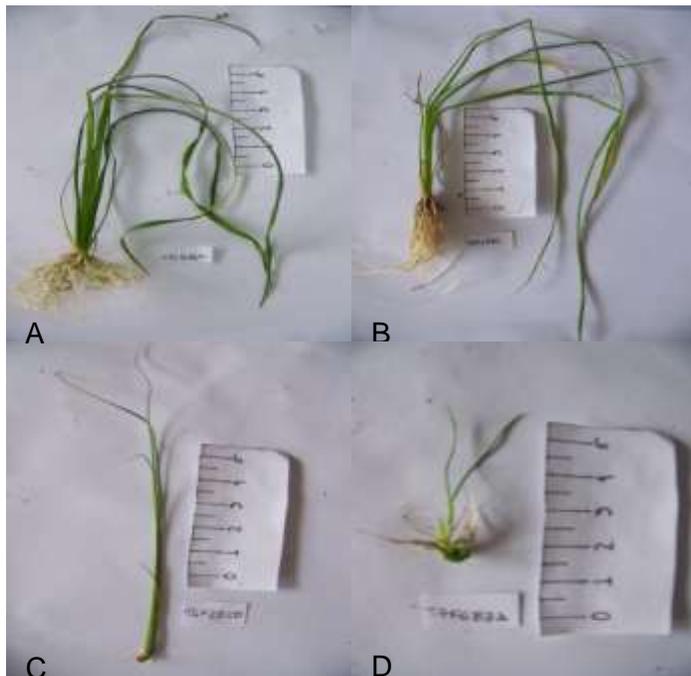
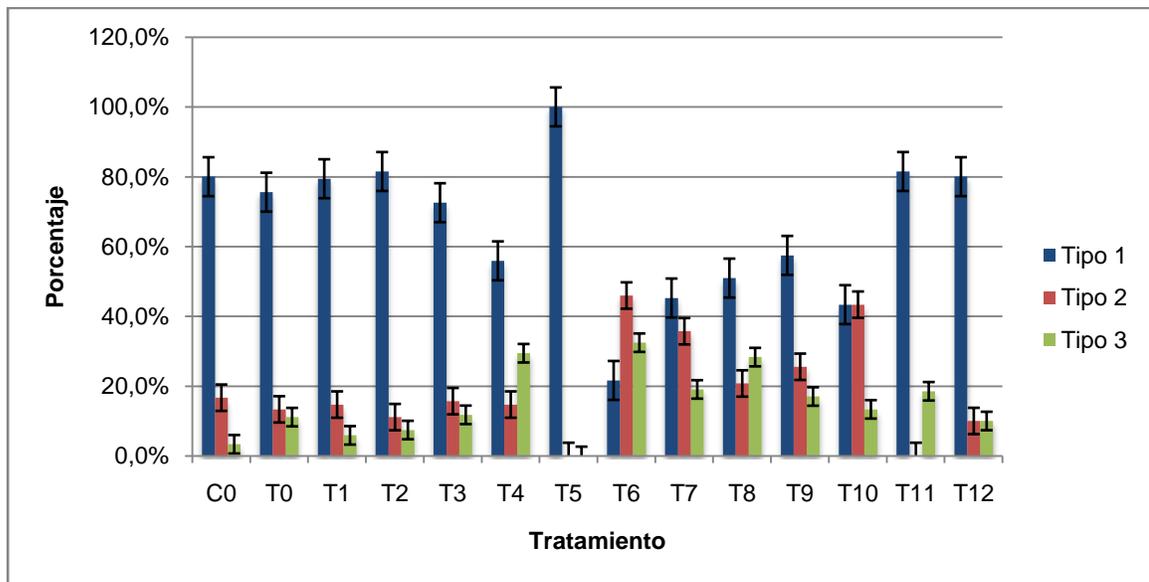


Figura 4-15: Porcentaje de brotes de F2000 por tipo morfológico y tratamiento.

La figura 4-16 muestra algunos brotes obtenidos para F50. En esta variedad, se observa un contraste mayor entre las proporciones obtenidas para los diferentes tipos de brotes formados (Figura 4-17). Para los tratamientos 0 al 5, en los que se usa KIN, el porcentaje de brotes tipo 1 varió entre 75% y 100%. Por el contrario, los brotes obtenidos utilizando BAP fueron en su mayoría anormales. Únicamente en T11 se presentó un 100% de brotes de morfología normal; debe tenerse en cuenta que para este tratamiento, el porcentaje de regeneración fue apenas de 20%. En los demás tratamientos, solamente T7, T8 y T10 produjeron brotes normales, aunque apenas entre un 20% y un 38,9%. T6, T8 y T9 no tuvieron ningún brote de tipo 1. La alta proporción de brotes anormales producidos en los tratamientos con BAP, muestran que este regulador tiene un impacto aun más nocivo sobre el desarrollo de los brotes de F50 que sobre los de F2000. Adicionalmente, si se tiene en cuenta que los porcentajes de regeneración obtenidos con BAP fueron inferiores a los obtenidos con KIN, puede descartarse por completo su uso para ésta variedad.

Figura4-16: Brotes de F50 por tipo morfológico. A y B: tipo 1; C: tipo 2; D: tipo 3.

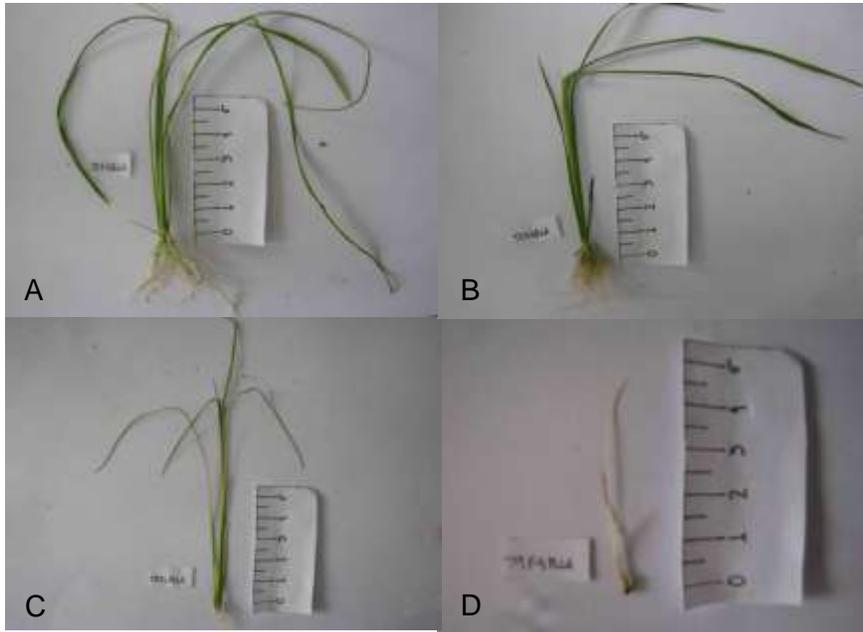


Figura4-17: Porcentaje de brotes de F50 por tipo morfológico y tratamiento.

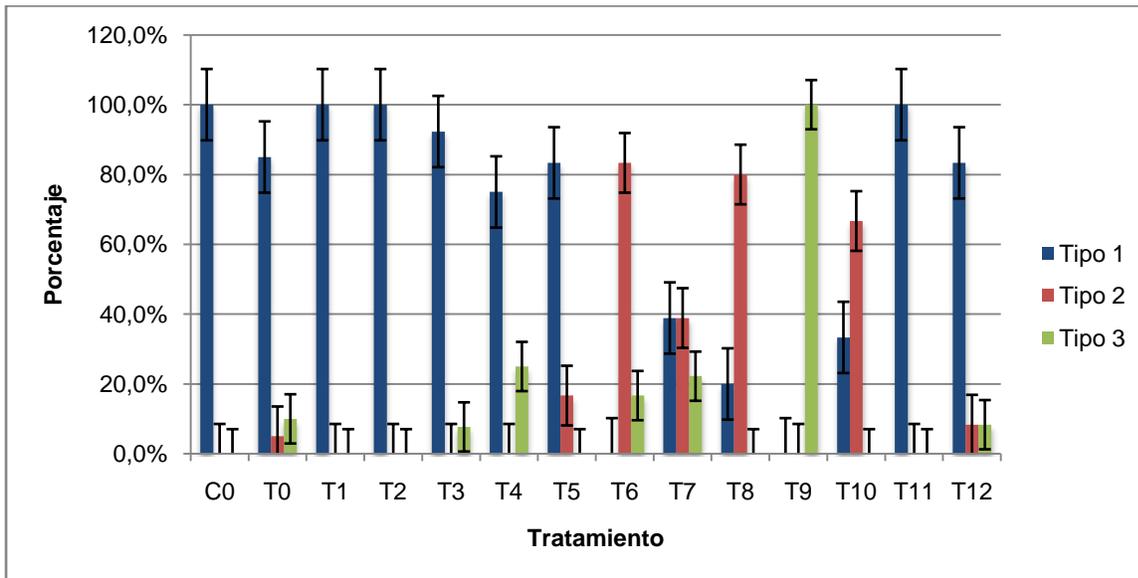
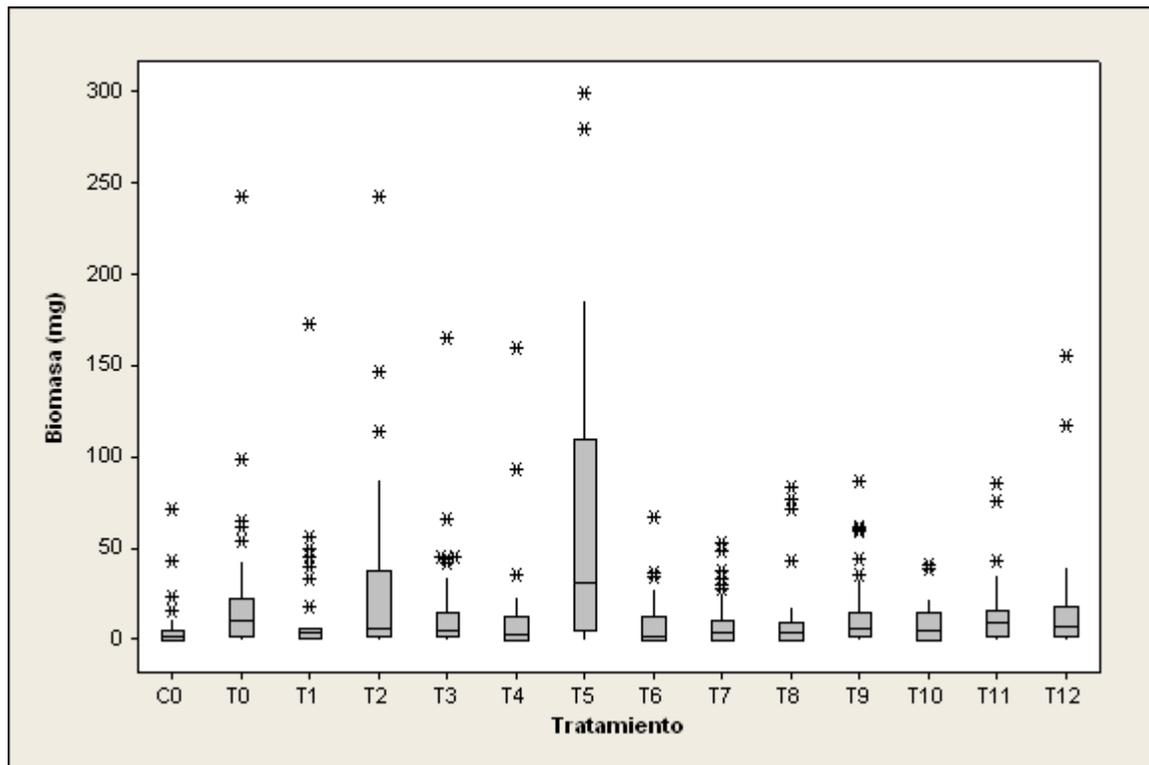
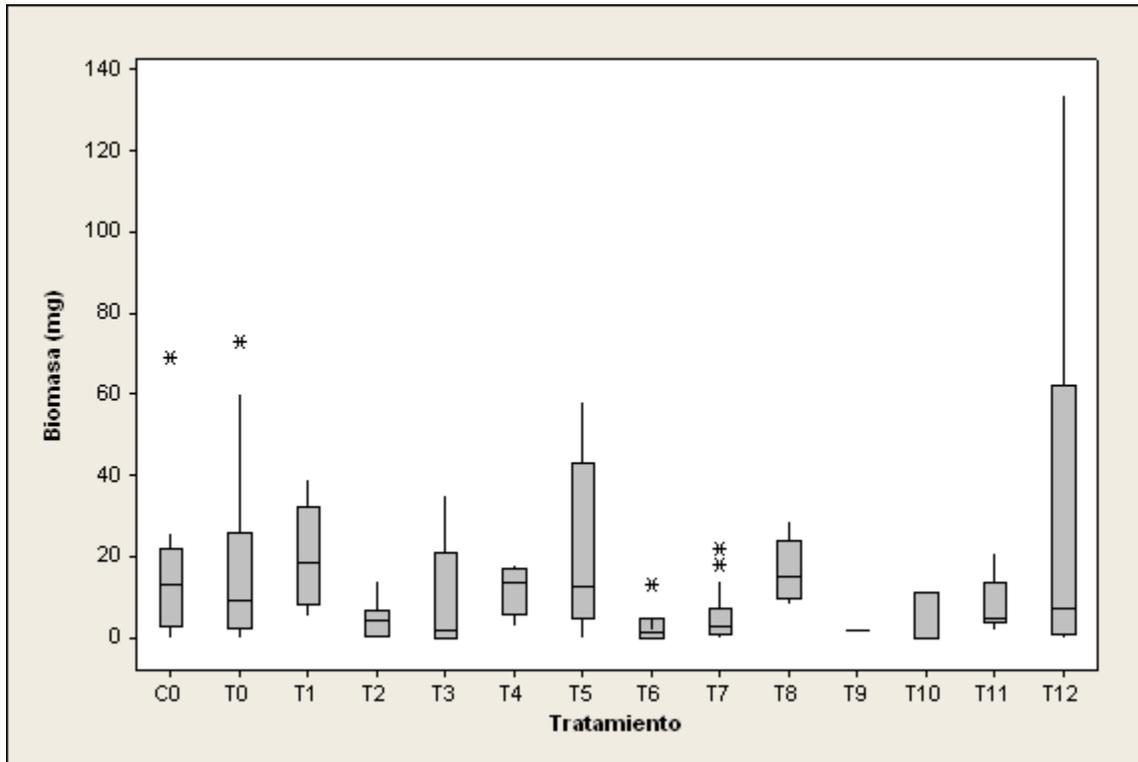


Figura4-18: Diagrama de cajas y bigotes de biomasa por tratamiento para F2000.

En cuanto a la biomasa de los brotes como estimativo de su tamaño, la prueba de Kruskal-Wallis encontró diferencias significativas entre los tratamientos (F2000: $p = 0,032$; F50: $p = 0,001$). Como se observa en la figura 4-18, en general hubo una dispersión muy grande en los datos obtenidos de biomasa por brote, para cada tratamiento, en F2000. Sin embargo, por el tamaño de las cajas y la posición de las medianas, puede verse que en la mayoría de casos, los brotes producidos fueron de tamaño pequeño. De acuerdo a la posición de las cajas y de los valores extremos, se observa una tendencia de producción de brotes más grandes en los tratamientos con KIN (T0-T5), que puede estar relacionada con el desarrollo de un mejor sistema radicular, y la consecuente formación de plantas normales. De éstos, el tratamiento que produjo los brotes más grandes fue T5. Podría pensarse que esto se relaciona con el hecho de que éste tratamiento también produjo la mayor proporción de brotes normales, en comparación con los demás tratamientos. Sin embargo, la ventaja de la calidad de los brotes obtenidos se ve contrarrestada por la baja producción de brotes (ver Figura 4-13). Por otra parte, T3, donde se obtuvo el mayor porcentaje de regeneración, presentó

brotos más pequeños que en T5, e incluso que en T0. Aun así, el alto porcentaje de regeneración lleva a considerar que pese al tamaño de los brotes, la utilización de éste tratamiento sobre los callos conlleva ventajas frente al uso de la concentración AUX/KIN usada por Saharan *et al.* (2004a). En contraste con respecto a los tratamientos con KIN, puede verse que las cajas y valores extremos de los tratamientos con BAP (T6-T11) se encuentran desplazados hacia abajo. Esto indica que los brotes obtenidos tuvieron una biomasa menor y por tanto, fueron más pequeños. De ese modo, se confirma el efecto negativo que tuvo el BAP sobre la regeneración de los callos.

Figura4-19:Diagrama de cajas y bigotes de biomasa por tratamiento para F50.



Los datos de biomasa de brotes obtenidos con callos de F50 no presentaron una dispersión tan grande como en F2000 (Figura 4-19). Sin embargo, globalmente puede verse nuevamente un desplazamiento hacia abajo de las cajas de los tratamientos con BAP (T6-T11) con respecto a los tratamientos con KIN (T0-T5). Esto sumado a los

porcentajes de regeneración obtenidos para esta variedad con dicho regulador (ver Figura 4-13), y la alta proporción de brotes anormales obtenidos (ver Figura 5-3), lleva a concluir de manera contundente que el BAP tiene un efecto negativo sobre la regeneración en F50.

5. Conclusiones y recomendaciones.

Con el presente estudio, se pudieron cambiar algunos parámetros dentro del sistema de cultivo de tejidos y regeneración seleccionado en el trabajo de Perafán (2011), que corresponde al protocolo utilizado por Saharan *et al.* (2004a, 2004b), para inducción de callo, transformación y regeneración de variedades *indica* de arroz. En general, la respuesta morfogénica a cada etapa del proceso de cultivo *in vitro* difiere para cada una de las variedades utilizadas, siendo la respuesta de F2000 superior a la de F50 en todos los casos.

A nivel histológico, se evidenció la producción de embriones somáticos a partir de callos en F2000, mucho antes de cumplirse el período de tres semanas utilizado para incubación en la mayoría de reportes de cultivo *in vitro* de arroz. La cantidad de 2,4-D utilizada durante la etapa de inducción de callo influye en la formación de callos y en su tamaño. Un incremento en la concentración de regulador puede aumentar el número de callos formados y su tamaño, pero también afecta de forma negativa al potencial de regeneración, por lo que se desaconseja exceder la cantidad utilizada por Saharan *et al.* (2004a, 2004b) y Perafán (2011). Sin embargo, puede mejorarse la cantidad de callos formados, sin incrementar la cantidad de 2,4-D, sembrando la semilla en posición horizontal sobre el medio. Por otra parte, reducir el tiempo de formación de callos incrementa el porcentaje de regeneración. Para F2000, se pueden usar callos de hasta dos semanas, mientras que para F50 los callos no deben exceder una semana de formación. Debe considerarse, para ensayos posteriores, la utilización de concentraciones inferiores de 2,4-D en la inducción de callo, o su combinación con otras auxinas como ANA, para evaluar si esto permite elevar aun más el potencial de regeneración (por una menor exposición al 2,4-D).

Es recomendable utilizar frascos en lugar de cajas de Petri durante todo el proceso de regeneración, ya que el recipiente puede tener un efecto en la capacidad de formación de brotes de los callos.

La reducción de la concentración de 2,4-D durante la etapa de cocultivo tiene un impacto negativo sobre la regeneración para ambas variedades, puesto que visualmente se observa un aumento de la oxidación de los callos una vez se realiza el cambio de medio. Por tal motivo, debe utilizarse la misma concentración sugerida por Saharan *et al.* (2004b).

El uso de BAP como citoquinina en combinación con ANA durante la etapa de regeneración tiene efectos negativos sobre la formación de brotes. Si bien para F2000 se puede incrementar el porcentaje de brotes formados, en ambas variedades se observó un aumento en la proporción de brotes con anomalías morfológicas. Para F2000, la utilización de 0,5 mg/L ANA + 4,0 mg/L KIN en el medio de regeneración, incrementó el porcentaje de regeneración con respecto al tratamiento usado por Saharan (2004a) y Perafán (2011). Sin embargo, para F50, ningún tratamiento arrojó un mejor resultado que la concentración que ya se venía utilizando, por lo que debe conservarse igual (0,5 mg/L ANA + 2,0 mg/L KIN).

Finalmente, los callos de ambas variedades presentan respuesta de regeneración sin necesidad de adicionar reguladores al medio, por lo que puede asumirse que otros componentes en el medio pueden estar influyendo en la formación y elongación de brotes. En tal caso, si se desea incrementar los porcentajes de regeneración para ambas variedades, es necesario determinar el efecto de tales componentes en ensayos posteriores.

A. Anexo: Protocolos de desinfección e histotecnia.

PROTOCOLO DE DESINFECCIÓN DE SEMILLAS

Todos los lavados deben realizarse con agitación.

1. Remover manualmente la cáscara de las semillas y colocar máximo 200 semillas en un tubo plástico de 50 mL.
2. Lavar en 40 mL de agua destilada estéril durante un minuto.
3. Remover el agua y lavar en 40 mL de etanol al 70% durante 45 segundos.
4. Remover el etanol y lavar en 40 mL de agua destilada estéril durante tres minutos.
5. Remover el agua y lavar en 40 mL de NaClO 3% + dos gotas de Tween-20 durante quince minutos.
6. Descartar el NaClO y cambiar las semillas a un nuevo tubo de 50 mL.
7. Lavar 3-5 veces con agua destilada estéril por un minuto cada lavado, hasta remover la espuma.
8. Lavar en 40 mL de NaClO 3% durante quince minutos.
9. Descartar el NaClO y lavar 3-5 veces con agua destilada estéril hasta remover la espuma.
10. Colocar las semillas sobre papel absorbente estéril, secar y sembrar.

PREPARACIÓN DE CORTES EN PARAFINA UTILIZANDO HISTOCHOICE CLEARING AGENT.

1. Fijar en F.A.A. (90 Etanol 70%: 5 Ácido acético glacial: 5 Formaldehído) mínimo por 48 horas.
2. 70 % Etanol 24 horas.
3. 90 % Etanol 4 horas.

4. (95%) 96% Etanol 4 horas.
5. 100% Etanol 4 horas.
6. 100% Etanol 4 horas.
7. 90 Etanol: 10 Histochoice, 4 horas.
8. 70 Etanol: 30 Histochoice, 4 horas.
9. 50 Etanol: 50 Histochoice, 4 horas.
10. 30 Etanol: 70 Histochoice, 4 horas.
11. 10 Etanol: 90 histochoice, 4 horas.
12. Histochoice 100%, 2 cambios por 12 horas.
- 12a. eliminar 1/2 del Histochoice y remplazar por parafina a 60°, mezclar rápidamente, colocar en horno a 60°.
13. Cambios de parafina (x3, 12 horas).
14. Montar bloques.
15. Cortar en micrótopo y montar cortes en laminas con adhesivo de Mayer (1. mezclar 50 cc de clara de huevo y 50 cc de glicerol. 2. añadir 1 g de salicilato de sodio. 3. agitar y filtrar con algodón). Secar en horno por 3-4 días.

DOBLE TINCIÓN AZUL DE ASTRA – FUCSINA BÁSICA.

1. Xilol 3 minutos.
2. Xilol 3 minutos.
3. 50 Xilol :50 Etanol absoluto, 3 minutos.
4. 50 Xilol :50 Etanol absoluto, 3 minutos.
5. Etanol 100%, 2 minutos.
6. Etanol 95%, 2 minutos.
7. Etanol 70%, 2 minutos.
8. Etanol 50%, 2 minutos.
9. Agua destilada, 2 minutos.
10. 1% azul de astra acidificado (1g / 100 ml de 2% ácido tartárico), 20 minutos.
11. Lavado en agua destilada, 2 minutos.
12. 0.1% fucsina básica etanólica (0.1g/ 100 ml de Etanol 50%), 30 minutos.
- 12a. Lavado en agua destilada, 15 segundos).
13. Etanol 50%, 1 minuto.
14. Etanol 70%, 1 minuto.

15. Etanol 95%, 1 minuto.
16. Etanol 100%, 1 minuto.
17. Etanol 100%, 1 minuto.
18. 70 Etanol: 30 Xilol, 2 minutos.
19. 50 Etanol 50:50 Xilol, 2 minutos.
20. Xilol 100% 3 mins.
21. Xilol 100% 3 mins o hasta montaje (no más de 4 horas)
22. Colocación de citoresina y laminillas. Secar a T^o ambiente por una semana.

B. Anexo: Protocolo de cultivo de tejidos y regeneración de Perafán (2011), modificado a partir de Saharan *et al.* (2004a).

El protocolo de cultivo de tejidos presentado a continuación, es el utilizado en la tesis de Perafán (2011) y seleccionado como protocolo de partida para los trabajos en ingeniería genética de arroz, del Grupo de Ingeniería Genética de Plantas. Como tal, el protocolo original de Saharan (2004a), corresponde únicamente a un sistema de cultivo de tejidos y regeneración que no incluye la etapa de cocultivo, y así fue utilizado en la tesis de Perafán (2011). Posteriormente, para poder utilizarlo en ensayos de transformación genética de arroz, se le añadió la etapa de cocultivo líquido y sólido, tomada a partir de Saharan *et al.* (2004b).

1. Desinfectar superficialmente y sembrar semillas de arroz a 60 °C de inclinación sobre el medio, en medio de inducción de callo (MS básico + 30 g/L de sacarosa + 0,5 g/L de prolina + 0,5 g/L de ácidos casamínos + 2,5 mg/L de 2,4-D + 2,5 g/L de gelrite; pH 5,8) a 28 °C y 70% de humedad relativa, en cajas de Petri, en oscuridad total, durante tres semanas.
2. Transferir los callos a cajas de Petri de vidrio con una hoja de papel Whatman N° 1 para desecarlos parcialmente. Dejar los callos a 28 °C y 70% de humedad relativa, durante 48 horas.
3. Transferir los callos desecados a medio de regeneración (MS básico + 30 g/L de sacarosa + 0,5 g/L de prolina + 0,5 g/L de ácidos casamínos + 0,5 mg/L de ANA + 2,0 mg/L de KIN + 6 g/L de gelrite; pH 5,8), en cajas de Petri, en fotoperíodo 16 h luz / 8 h oscuridad, a 28 °C y 70% de humedad relativa, durante tres semanas.

Bibliografía.

1. ABDUL RAHMAN Z, ROOWI S, ZALIHA W. 2010. Regeneration of Malaysian Indica Rice (*Oryza sativa*) Variety Mr232 via Optimised Somatic Embryogenesis System. *Journal of Phytology* 2 (3): 30–38.
2. ABLE JA, LANGRIDGE P, MILLIGAN A. 2006. Capturing diversity in the cereals: many options but little promiscuity. *TRENDS in Plant Science* 12 (2): 71–79.
3. ACOSTA E. M, SÁNCHEZ B. J, BAÑÓN A. M. Auxinas. En: J Azcón-Bieto, M Talón, editores. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 305-323.
4. ALDEMITA RR, HODGES TK. 1996. *Agrobacterium tumefaciens*- mediated transformation of japonica and indica rice varieties. *Planta* 199: 612–617.
5. AMARASINGHE AAY, YANG YS. 2005. Comparative studies on *in-vitro* response of fresh and old calli of rice (*Oryza sativa* L.). *The Journal of Agricultural Science* 1 (2): 1–14.
6. APG III. 2009. An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III. *Botanical Journal of the Linnean Society* 161: 105–121.
7. AZOFEIFA A. 2009. Problemas de oxidación y oscurecimiento de explantes cultivados *in vitro*. *Agronomía Mesoamericana* 20 (1): 153–175.
8. BELTRÁN MOLINA JH, QUEVEDO CÁRDENAS LA. Biotecnología aplicada al arroz. En: M Diago Ramírez, E Almanza Caicedo, A Cuevas, editores. *Compendio Resultados de Investigación 2006-2007*. Bogotá: FEDEARROZ-Fondo Nacional del Arroz; 2007. p. 33-38.
9. BEYER P. 2010. Golden Rice and ‘Golden’ crops for human nutrition. *New Biotechnology* 27 (5): 478–481.
10. BOZHKOVA PV, FILONOVA LH, VON ARNOLD S. 2002. A key developmental switch during Norway spruce somatic embryogenesis is induced by withdrawal of growth

regulators and is associated with cell death and extracellular acidification. *Biotechnol Bioeng* 77: 658–667.

11. BROOKES G, BARFOOT P. 2008. Global Impact of Biotech Crops: Socio-Economic and Environmental Effects, 1996-2006. *AgBioForum* 11 (1): 21–38.
12. BROOKES G, BARFOOT P. 2009. GM crops: global socio-economic and environmental impacts 1996-2007. ed. UK: PG Economics Ltd. 124p.
13. CARSONO N. The Establishment of *in vitro* Culture and Genetic Transformation of the Wheat Glu-1Dx5 Gene to Rice Plants by Gene Gun Bombardment. [Tesis de Doctorado]. Tokyo: United Graduate School of Agricultural Science, Tokyo University of Agriculture and Technology; 2007.
14. CHRISPEELS MJ, SADAVA DE. 2003. *Plants, Genes, and Crop Biotechnology*. 2. USA: Jones and Bartlett Publishers. 562p.
15. DANILOVA SA. 2007. The Technologies for Genetic Transformation of Cereals. *Russian Journal of Plant Physiology* 54 (5) (5): 569–581.
16. DAWE D, PANDEY S, NELSON A. Emerging trends and spatial patterns of rice production. En: S Pandey, D Byerlee, D Dawe, A Dobermann, S Mohanty, S Rozelle *et al.*, editors. *Rice in the Global Economy: Strategic Research and Policy Issues for Food Security*. ed. Filipinas: International Rice Research Institute; 2010. p. 15-36.
17. DIAGO M. 2003. *Compendio de Resultados de Investigación 2001-2002*. Colombia: Fedearroz-Fondo Nacional del Arroz.
18. DIAGO M. 2005. *Compendio de Resultados de Investigación 2003-2005*. Colombia: Fedearroz-Fondo Nacional del Arroz.
19. FAO. 2012. *FAO Statistical Yearbook*. Roma: Food and Agriculture Organization of the United Nations. 363p.
20. FEDEARROZ. 2008. III Censo Nacional Arrocerero. Cubrimiento Cosecha A-B, 2007. Bogotá: Federación Nacional de Arroceros, Fondo Nacional del Arroz. 196p.
21. FEDEARROZ. 2010. *Evaluación socioeconómica de la cadena productiva del arroz en Colombia*. Bogotá: Federación Nacional de Arroceros, Fondo Nacional del Arroz. 99p.
22. FERNIE AR, TADMOR Y, ZAMIR D. 2006. Natural genetic variation for improving crop quality. *Current Opinion in Plant Biology* 9: 196–202.

23. GARCÍA-GONZÁLES R, QUIROZ K, CARRASCO B, CAGLIARI P. 2010. Plant tissue culture: Current status, opportunities and challenges. *Ciencia e Investigación Agraria* 37 (3): 5–30.
24. GELVIN SB. 2003. *Agrobacterium*-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 67: 16–37.
25. GELVIN SB. 2010. Plant Proteins Involved in *Agrobacterium*-mediated Genetic Transformation. *Annu Rev Phytopathol* 48: 45–68.
26. GREWAL D, GILL R, GOSAL SS. 2005. Factors Enhancing Induction of High Frequency Plant Regeneration from Somatic Embryos of Indica Rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Biological Sciences* 5 (6): 697–702.
27. HAZARIKA BN. 2006. Morpho-physiological disorders in in vitro culture of plants. *Scientia Horticulturae* 108 105–120.
28. HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, KUMASHIRO T. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA. *The Plant Journal* 6 (2): 271–282.
29. HIEI Y, KOMARI T, KUBO T. 1997. Transformation of rice mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Mol Biol* 35: 205–218.
30. HERRERA-ESTRELLA L, DEPICKER A, VAN MONTAGU M, SCHELL J. 1983. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector. *Nature* 303: 209–212.
31. HOQUE ME, ALI MS, KARIM NH. 2007. Embryogenic Callus Induction and Regeneration of Elite Bangladeshi Indica Rice Cultivars. *Plant Tissue Cult & Biotech* 17 (1): 65–70.
32. IGNACIMUTHU S, AROCKIASAMY S. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of an elite *indica* rice for insect resistance. *Current Science* 90 (6): 829-835.
33. IZAWA T, KONISHI S, SHOMURA A, YANO M. 2009. DNA changes tell us about rice domestication. *Current Opinion in Plant Biology* 12: 185–192.
34. IZQUIERDO J. Hacia una agricultura sustentable: las alternativas de las ciencias de la vida y de la biotecnología. En: V Echenique, C Rubinstein, LA Mroginski, editors. *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal*. 1 ed. Buenos Aires: Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria; 2004. p. 17-19.
35. JACKSON MB, ABBOTT AJ, BELCHER AR, HALL KC, BUTLER R, CAMERON J. 1991. Ventilation in plant tissue culture and effects of poor aeration on ethylene and

- carbon dioxide accumulation, oxygen depletion and explants development. *Ann Bot* 67 229–237.
36. JAMES C. 2011. *Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2011*. Ithaca, NY: ISAAA. 26p.
37. JONES TJ, ROST TL. 1989. The developmental anatomy and ultrastructure of somatic embryos from rice (*Oryza sativa* L.) scutellum epithelial cells. *Botanical Gazette* 150 (1): 41–49.
38. JUDD WS, CAMPBELL CS, KELLOG EA, STEVENS PF. 1999. *Plant Systematics: A Phylogenetic Approach*. ed. USA: Sinauer Associates, Inc. 464p.
39. KATHURIA H, GIRI J, TYAGI H, TYAGI A. 2007. Advances in Transgenic Rice Biotechnology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 26: 65–103.
40. KIRAKOSYAN A, KAUFMAN PB, CSEKE LJ. *New Developments in Agricultural and Industrial Plant Biotechnology*. En: A Kirakosyan, PB Kaufman, editors. *Recent Advances in Plant Biotechnology*. ed. New York: Springer; 2009. p. 107-117.
41. KRİKORIAN AD. Medios de cultivo: generalidades, composición y preparación. En: WM Roca, LA Mroginski, editors. *Cultivo de Tejidos en la agricultura*. ed. Cali: CIAT; 1993. p. 41-78.
42. KUMAR KK, MARUTHASALAM M, LOGANATHAN D, BALASUBRAMANIAN P. 2005. An Improved *Agrobacterium*-Mediated Transformation Protocol for Recalcitrant Elite Indica Rice Cultivars. *Plant Molecular Biology Reporter* 23 67–73.
43. LEE LY, GELVIN SB. 2008. T-DNA Binary Vectors and Systems. *Plant Physiology* 146: 325–332.
44. LENTINI Z, LOZANO I, TABARES E, FORY L, DOMÍNGUEZ J, CUERVO M, CALVERT L. 2003. Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. *Theor Appl Genet* 106: 1018–1026.
45. LITZ RE, JARRET RL. Regeneración de plantas en el cultivo de tejidos: embriogénesis somática y organogénesis. En: WM Roca, LA Mroginski, editores. *Cultivo de Tejidos en la agricultura*. ed. Cali: CIAT; 1993. p. 143-172.
46. MACHAKOVA I, ZAZIMALOVA E, GEORGE EF. *Plant Growth Regulators I: Introduction; Auxins, their Analogues and Inhibitors*. En: EF George, MA Hall, G-J De

- Klerk, editores. *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Dordrecht: Springer; 2008. p. 175-204
47. MARTÍNEZ HJ, ESPINAL CF, ACEVEDO X. La cadena del arroz en Colombia: Una mirada global de su estructura y dinámica 1991-2005. Bogotá: Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural, Observatorio Agrocadenas Colombia; 2005. Disponible en <http://201.234.78.28:8080/jspui/handle/123456789/616>. Consultada en 26 de enero de 2011.
48. MOHANTY S, WAILES E, CHAVEZ E. The global rice supply and demand outlook: the need for greater productivity growth to keep rice affordable. En: S Pandey, D Byerlee, D Dawe, A Dobermann, S Mohanty, B Hardy, editors. *Rice in the Global Economy: Strategic Research and Policy Issues for Food Security*. ed. 2010. p. 175-188.
49. MROGINSKI LA, ROCA WM. Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales in vitro. En: WM Roca, LA Mroginski, editores. *Cultivo de Tejidos en la agricultura*. ed. Cali: CIAT; 1993. p. 19-40.
50. MURASHIGE T, SKOOG F. 1962. A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
51. NAQVI SSM. Plant Growth Hormones: Growth Promoters and Inhibitors. En: M Pessaraki, editor. *Handbook of Plant and Crop Physiology*. ed. USA: Marce Dekker, Inc.; 2002. p. 501-525
52. NARCISO J, HATTORI K. 2010. Genotypic differences in morphology and ultrastructures of callus derived from selected rice varieties. *Philippine Science Letters* 3 (1): 59–65.
53. NEUMANN K-H, KUMAR A, IMANI J. 2009. *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology*. ed. Berlín: Springer. 333p.
54. NILL K. 2002. *Glossary of Biotechnology Terms*. 3 ed. USA: CRC Press. 284p.
55. PANJAITAN SB, ABDULLAH SNA, AZIZ MA, MEON S, OMAR O. 2009. Somatic Embryogenesis from Scutellar Embryo of *Oryza sativa* L. var. MR219. *Pertanika J Trop Agric Sci* 32 (2): 185–194.
56. PARKHI V, RAI M, TAN J, OLIVA N, REHANA S, BANDYOPADHYAY A, *et al.* 2005. Molecular characterization of marker-free transgenic lines of *indica* rice that accumulate carotenoids in seed endosperm. *Mol Gen Genomics* 274: 325–336.

-
57. PEDROZA MANRIQUE JA. 2008. Aplicaciones del cultivo de tejidos vegetales en condiciones *in vitro*. 1 ed ed. Bogotá: Universidad Distrital Francisco José de Caldas. 348p.
58. PERAFÁN R. Determinación de un sistema de regeneración para arroz (*Oryza sativa* ssp. *indica*). [Tesis de maestría]. Bogotá: Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Colombia; 2011.
59. PÉREZ BERNAL M, DELGADO RIGO M, HERNÁNDEZ DÍAZ CA, ARMAS RAMOS R. 2007. Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IACuba-28) resistentes a higromicina. Rev Colomb Biotecnol 9 (1): 35–40.
60. PÉREZ MOLPHE BALCH EM, RAMÍREZ MALAGÓN R, NÚÑEZ PALENIUS HG, OCHOA ALEJO N. 1999. Introducción al Cultivo de Tejidos Vegetales. 1ed ed. Mexico: Universidad Autónoma de Aguas Calientes. 179p.
61. POEHLMAN JM, ALLEN SLEPER D. 2005. Mejoramiento Genético de las Cosechas. 2 ed. México: Limusa Wiley. 512p.
62. POTRYKUS I. 1991. Gene Transfer to Plants: Assessment of Published Approaches and Results. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol 42 205–225.
63. QUEVEDO CÁRDENAS LA, BELTRÁN MOLINA JH. Biotecnología para Fedearroz-2000 y para Colombia XXI. En: M Diago Ramírez, E Almanza Caicedo, A Cuevas, editores. Compendio Resultados de Investigación 2006-2007. Bogotá: FEDEARROZ-Fondo Nacional del Arroz; 2007. p. 44-52.
64. RADICE S. Morfogénesis. En: G Levitus, V Echenique, C Rubinstein, E Hopp, LA Mroginski, editores. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II. ed. Argentina: INTA; 2010. p. 26-33.
65. RAHMAN Z, ROOWI S, ZALIHA W, SUBRAMANIAM S. 2010. Regeneration of Malaysian Indica Rice (*Oryza sativa*) Variety MR232 via Optimised Somatic Embryogenesis System. Journal of Phytology 2 (3): 30–38.
66. RAMESH S, NAGADHARA D, PASALU IC, PADMA KUMARI A, SARMA NP, REDDY VD, RAO KV. 2004. Development of stem borer resistant transgenic parental lines involved in the production of hybrid rice. Journal of Biotechnology 111: 131-141.
67. RAGHAVAN V. 2004. Role of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) in somatic embryogenesis on cultured zygotic embryos of *Arabidopsis*: cell expansion, cell

- cycling, and morphogenesis during continuous exposure of embryos to 2,4-D. *American Journal of Botany* 91 (11): 1743–1756.
68. RODRÍGUEZ-ENRÍQUEZ J, DICKINSON HG, GRANT-DOWNTON RT. 2011. MicroRNA misregulation: an overlooked factor generating somaclonal variation? *TRENDS in Plant Science* 16 (5): 242–248.
69. SAHARAN V, YADAV RC, YADAV NR, CHAPAGAIN BP. 2004a. High frequency plant regeneration from desiccated calli of *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 3 (5): 256–259.
70. SAHARAN V, YADAV RC, YADAV NR, RAM K. 2004b. Studies on improved *Agrobacterium*-mediated transformation in two *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology* 3 (11): 572–575.
71. SANG T, GE S. 2007. Genetics and phylogenetics of rice domestication. *Current Opinion in Genetics & Development* 17: 533–538.
72. SEGURA J. Citoquininas. En: J Azcón-Bieto, M Talón, editores. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*. ed. España: McGraw-Hill Interamericana; 2000. p. 343-360.
73. SHARMA KK, BHATNAGAR-MATHUR P, THORPE TA. 2005. Genetic transformation technology: status and problems. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant* 41: 102–112.
74. SHIMODA N, TOYODA-YAMAMOTO A, NAGAMINE J, USAMI S, KATAYAMA M, SAKAGAMI Y, *et al.* 1990. Control of expression fo *Agrobacterium vir* genes by synergistic actions of phenolic signal molecules and monosaccharides. *Proc Natl Acad Sci USA* 87: 6684–6688.
75. SHRAWAT AK, LÖRZ H. 2006. *Agrobacterium*-mediated transformation of cereals: a promising approach crossing barriers. *Plant Biotechnology Journal* 4: 575–603.
76. SINGH RJ. 2003. *Plant Cytogenetics*. 2 ed. USA: CRC Press. 463p.
77. SONNANTE G, STOCKTON T, NODARI RO, BECERRA VL, GEPTS P. 1994. Evolution of genetic diversity during the domestication of common-bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 89 629–635.
78. SRIDEVI G, DHANDAPANI M, VELUTHAMBI K. 2005. *Agrobacterium*-mediated transformation of White Ponni, a non-basmati variety of *indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Current Science* 88 (1): 128–132.
79. TARIQ M, ALI G, HADI F, AHMAD S, ALI N, SHAH AA. 2008. Callus Induction and in vitro Plant Regeneration of Rice (*Oryza sativa* L.) Under Various Conditions. *Pakistan Journal of Biological Sciences* 11 (2): 255–259.

-
80. TOKI S, HARA N, ONO K, ONODERA H, TAGIRI A, OKA S, *et al.* 2006. Early infection of scutellum tissue with *Agrobacterium* allows high-speed transformation of rice. *The Plant Journal* 47: 969–976.
81. TZFIRA T, CITOVSKY V. 2006. *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology* 17: 147–154.
82. VALLEJO CABRERA FA, ESTRADA SALAZAR E. *Mejoramiento Genético de Plantas*. Palmira: Universidad Nacional de Colombia-Sede Palmira; 2002.
83. VAN STADEN J, ZAZIMALOVA E, GEORGE EF. *Plant Growth Regulators II: Cytokinins, their Analogues and Antagonists*. En: EF George, MA Hall, G-J De Klerk, editores. *Plant Propagation by Tissue Culture. Volume 1. The Background*. 3 ed. Dordrecht: Springer; 2008. p. 205-226
84. VAUGHAN DA, LU B-R, TOMOOKA N. 2008. The evolving story of rice evolution. *Plant Science* 174: 394-408.
85. VEGA R, VÁSQUEZ N, ESPINOZA AM, GATICA A, VALDEZ-MELARA M. 2009. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Rev Biol Trop* 57 (1): 141–150.
86. YOOKONGKAEW N, SRIVATANAKUL M, NARANGAJAVANA J. 2007. Development of genotype-independent regeneration system for transformation of rice (*Oryza sativa* ssp. *indica*). *J Plant Res* 120: 237–245.
87. ZIMMERMANN R, WERR WOLFGANG. 2005. Pattern formation in the monocot embryo as revealed by *NAM* and *CUC3* orthologues from *Zea mays* L. *Plant Molecular Biology* 58: 669-685.