

Influencia de la fuente de carbono y el agente gelificante sobre la regeneración de arroz Indica variedad IACuba-28 a partir de callos

Maylin Pérez Bernal*, Yamilet Coll García, Annery González Quintero, Julio Alfonso Rubí, Raúl Armas Ramos, Carlos Hernández Díaz, Merardo Pujol Ferrer. *Autor para correspondencia.

Grupo de Plantas y Enzimas. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus Apartado 83, Código Postal 60200, Sancti Spiritus, Cuba. Teléfono: (041) 26273 Fax: (041) 28539 e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Se evaluaron cuatro variantes de medio de cultivo de regeneración en la variedad de arroz IACuba-28 a partir de callos. Se utilizó el medio de cultivo basal MS y una concentración constante de reguladores del crecimiento. Se empleó maltosa o sacarosa como fuente de carbono, en combinación con 8.0 g.l⁻¹ de agarosa ó 3 g.l⁻¹ de fitagel como agente gelificante. En todos los casos se verificó la regeneración de brotes, obteniéndose los mejores resultados con el uso de la combinación maltosa-fitagel, en la que se detectaron los primeros puntos verdes a los cinco días de incubados los callos, dando lugar al mayor volumen de plantas en un tiempo más reducido.

Palabras clave: agarosa, maltosa, brotes

ABSTRACT

Several variations on plant regeneration medium from callus in IACuba-28 rice cultivar were evaluated using the basal MS medium with the same growth regulator concentrations. As carbon source 30g.l⁻¹ of maltose or sucrose was used, in combination with 8g.l⁻¹ of agarose or 4.3g.l⁻¹ of phytigel as gelling agent. In all cases green shoots in callus were observed, but the best results were obtained using the combination maltose-phytagel, where the first green shoots were detected and the higher plant number was obtained five days after callus incubation in a shorter time.

Key words: agarose, maltose, shoots

INTRODUCCION

Una de las exigencias principales de los protocolos de transformación genética de plantas es el mantenimiento de una alta eficiencia de regeneración, lo que también es muy útil en otros procedimientos del cultivo de tejidos vegetales, como la micropropagación, la inducción de mutaciones *in vitro* y el cultivo de anteras, entre otros. Específicamente en arroz (*Oryza sativa* L.), se han citado varios informes que describen la manipulación de diferentes componentes del medio de cultivo de regeneración, confiriéndole gran importancia al manejo de las concentraciones y tipos de agentes gelificantes (Tsukahara y Hirosawa, 1992, Coll *et al.*, 1998) y las fuentes de carbono (Torrizo y Zapata, 1992, Ghosh Biswas y Zapata, 1993, Al-Khayri *et al.*, 1996). El medio de cultivo KIBAN, referido por Coll *et al.* (1998) contiene 30g.l⁻¹ de sacarosa y 4.3g.l⁻¹ de fitagel, y fue empleado para la regeneración de variedades de arroz tipo Indica. Según Ghosh Biswas y Zapata (1993) es factible el empleo de maltosa 30g.l⁻¹ para la eficiente regeneración de protoplastos de arroz Indica en 8.0g.l⁻¹ de agarosa.

Con el incremento de la eficiencia de regeneración, dado por el aumento del número de plantas

regeneradas en un tiempo reducido, se evitan los inconvenientes del cultivo prolongado del material vegetal *in vitro* y se aceleran los procesos biotecnológicos que incluyan una fase de regeneración de este tipo.

El presente trabajo describe el efecto de diferentes fuentes de carbono y agentes gelificantes en la regeneración de plantas a partir de callos de arroz de la variedad cubana IACuba-28 de tipo Indica, con vistas a lograr una alta eficiencia y reducir el tiempo de cultivo *in vitro* del material vegetal, por un aumento de la velocidad de regeneración de un mayor número de plantas.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

Se emplearon semillas maduras de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad IACuba-28, las cuales fueron descascaradas manualmente y sumergidas un minuto en etanol 90% y luego sumergidas en una solución de desinfectante comercial Domestos (v/v, Lever, España) al 40% durante 20 minutos. Posteriormente se lavaron con agua destilada estéril y se secaron sobre discos de papel absorbente en una cabina de flujo laminar horizontal.

Para la inducción de los callos se incubaron las semillas desinfectadas en medio de cultivo N6 (Chu *et al.*, 1975) enriquecido con 1.0g.l^{-1} de hidrolizado de caseína y 2.0mg.l^{-1} de ácido 2,4-diclorofenoxiacético, y solidificado con 3.0g.l^{-1} de Fitigel. El cultivo de los callos se mantuvo durante cuatro semanas a 28°C en condiciones de oscuridad.

Experimentos de regeneración

Se estudiaron tres medios de cultivo de regeneración: KIBAN1, KIBAN2 y KIBAN3, concebidos a partir de modificaciones del medio de cultivo KIBAN (Coll *et al.*, 1998), que se tomó como control experimental, y que básicamente contiene las sales y vitaminas del medio MS (Murashige y Skoog, 1962), sacarosa 30g.l^{-1} , bencilaminopurina 0.5mg.l^{-1} , ácido naftalenacético 1.0mg.l^{-1} y kinetina 3.0mg.l^{-1} , solidificado con 4.3g.l^{-1} de fitagel (Sigma).

En el medio de cultivo KIBAN1 se sustituyó el fitagel por 8g.l^{-1} de agarosa (Pronadisa, Hispanlab, S.A.).

En los medios de cultivo KIBAN2 y KIBAN3 se incluyó maltosa 30g.l^{-1} como fuente de carbono, en lugar de la sacarosa, y como agente gelificante se empleó 4.3g.l^{-1} de fitagel y 8.0g.l^{-1} de agarosa, respectivamente.

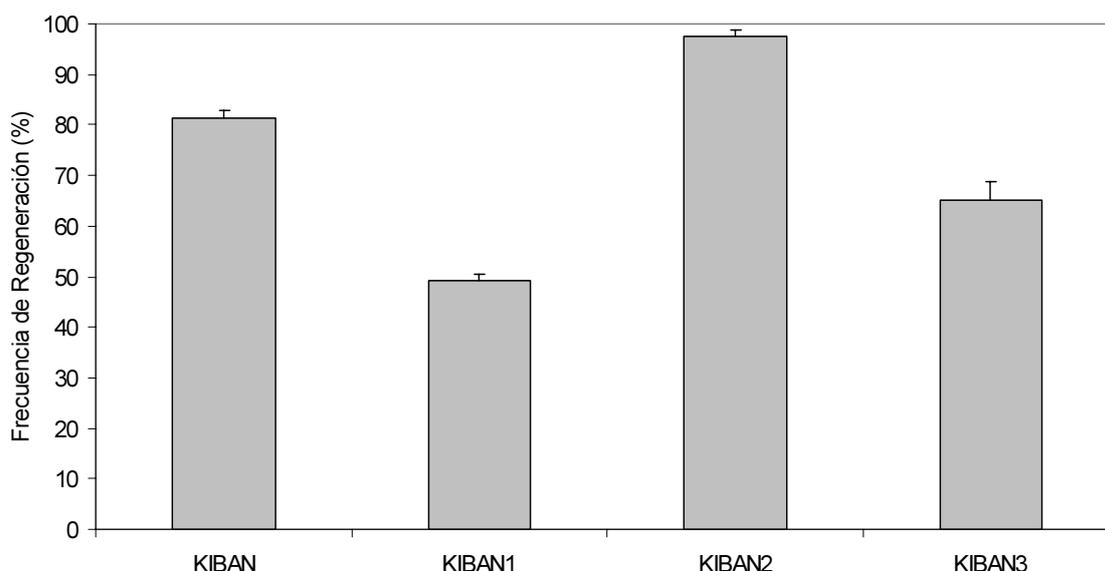
Se escogieron callos de $5.0\text{-}6.0\text{ mm}$ de diámetro para ser incubados en placas de Petri con el medio de cultivo de regeneración, y se colocaron en un cuarto iluminado, a $27 \pm 1^{\circ}\text{C}$. Fueron utilizados 200 callos para cada variante en estudio, distribuidos

en tres experimentos con diez réplicas cada uno. La frecuencia de regeneración se calculó considerando el porcentaje de callos con brotes respecto al total sembrado. El comportamiento de la frecuencia de regeneración en los experimentos se estudió mediante un análisis de varianza bifactorial completamente aleatorizado, haciendo uso del paquete estadístico COSTAT 2.04.

Se realizaron seis extracciones sucesivas de brotes a partir de los callos, cada cinco días, y luego de cada intervalo se transfirieron los callos a medio de cultivo de regeneración fresco. Los brotes se cuantificaron y se sembraron en frascos de vidrio transparente que contenían medio MS (Murashige y Skoog, 1962) solidificado con 3.0g.l^{-1} de Fitagel, para observar el crecimiento del follaje y el desarrollo del sistema radicular. Transcurridos siete días se transfirieron las plantas a tierra en pequeñas bandejas de 48 capacidades y posteriormente a macetas, con suministro permanente de agua, evaluándose la adaptación de las mismas a estas condiciones.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En la figura 1 se aprecia que en el control KIBAN se mantuvo la frecuencia de regeneración en el rango referido por Coll *et al.* (1998), pero la cifra más alta se verificó sustituyendo la sacarosa por maltosa 30g.l^{-1} y con 4.3g.l^{-1} de fitagel (medio KIBAN2), encontrándose una frecuencia de un 97% de callos con brotes respecto al total, resultando significativamente superior ($p=0.000$) a los medios restantes.



Los datos se refieren a valores promedios de tres experimentos con diez réplicas cada uno.

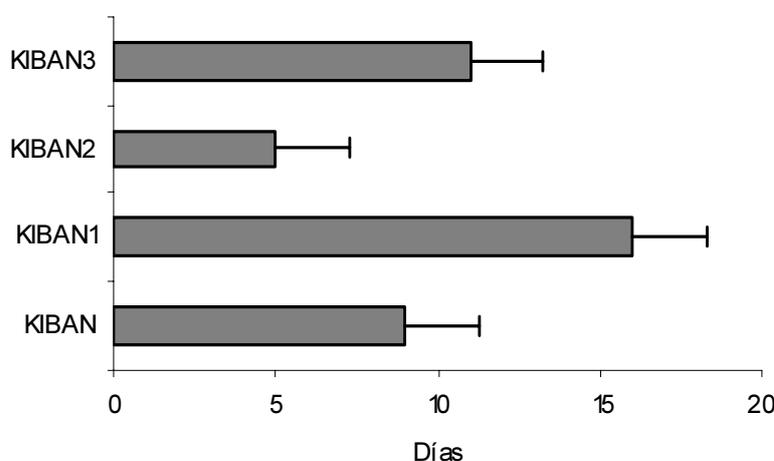
Figura 1. Comportamiento de la frecuencia de regeneración a partir de callos de arroz Indica variedad IACuba-28 con diferentes fuentes de carbono y agentes gelificantes: KIBAN: sacarosa-fitagel, KIBAN1: sacarosa-agarosa, KIBAN2: maltosa-fitagel, KIBAN3: maltosa-agarosa.

La sacarosa ha sido la fuente de carbono por excelencia utilizada en los medios N6 y MS para la regeneración (Wang *et al.*, 1989; Ghosh Biswas y Zapata, 1990), pero los resultados de este estudio demostraron la superioridad de la maltosa para la regeneración de plantas de arroz a partir de callos, tal y como se han reportado para la regeneración de plantas a partir de protoplastos (Ghosh Biswas y Zapata, 1993), la embriogénesis somática en alfalfa (Strickland *et al.*, 1987) y el cultivo de anteras en trigo (Last y Brettell, 1990).

El uso de maltosa en lugar de sacarosa constituye una importante modificación en el medio de cultivo de regeneración. En el medio de cultivo KIBAN2 se observaron callos con estructuras globulares

homogéneas y densas que propiciaron las etapas de formación de embriones somáticos. La aparición de los primeros brotes ocurrió a los cinco días de cultivo en este medio.

El comienzo de la regeneración en el control tuvo lugar a los nueve días, similar al tiempo requerido en el medio de cultivo con maltosa y agarosa. En el medio KIBAN1 no se apreciaron señales de regeneración hasta los 16 días de incubación en esas condiciones (Fig. 2). La favorable respuesta fisiológica detectada en el medio de cultivo KIBAN2, con el consiguiente desarrollo de brotes en un tiempo reducido, permite considerar a la maltosa como la fuente carbonada más apropiada para la regeneración de esta variedad a partir de callos.



Los datos representan el promedio de tres experimentos.

Figura 2. Comparación del tiempo de inicio de la regeneración de brotes a partir de los callos de arroz, incubados en medios de regeneración con diferentes fuentes de carbono y agentes gelificantes: KIBAN: sacarosa-fitigel, KIBAN1: sacarosa-agarosa, KIBAN2: maltosa-fitigel, KIBAN3: maltosa-agarosa.

Se considera que el tipo de agente gelificante tiene igualmente una marcada influencia sobre la regeneración de plantas. A diferencia de lo que refirieron Torrizo y Zapata (1992) y Ghosh Biswas y Zapata (1993) que sugirieron el empleo de agarosa 8.0g.l^{-1} para la regeneración de cultivares de arroz, este estudio demostró que es significativo ($p=0.000$) el efecto negativo que ocasiona la agarosa sobre la frecuencia de regeneración en esta variedad. En la figura 1 se aprecia un descenso de un 39% en la frecuencia de regeneración en KIBAN1 respecto al KIBAN. Similar efecto de reducción se observa entre KIBAN2 y KIBAN3, con un 33%. Estos resultados sugieren que en ambos casos la agarosa es determinante en la disminución de la frecuencia de regeneración, ya que los valores más bajos se alcanzan cuando es usada como gelificante, independientemente de la fuente carbonada que se utilice.

El tratamiento estadístico de los valores de frecuencia de regeneración por réplica experimental indicó que no fue significativa la interacción entre la fuente de carbono y el agente gelificante ($p=0.834$).

En los callos incubados en el medio de cultivo con agarosa se encontraron estructuras muy compactas y deshidratadas respecto a las observadas en presencia de fitigel, lo cual indica que la agarosa a esta concentración provoca en las células del callo un estrés hídrico desfavorable que afecta la embriogénesis y reduce los niveles de regeneración. Puede considerarse además la dependencia del genotipo en el efecto del gelificante sobre la regeneración (Ghosh Biswas y Zapata, 1993).

En la transferencia de brotes desde el medio de cultivo regeneración hacia el medio de cultivo MS, efectuada con una frecuencia de cinco días, se comprobó que en KIBAN2 se alcanzó un promedio de brotes regenerados superior al resto de las variantes. El pico máximo de brotes transferidos a MS se registró al cabo de los 15 días desde el inicio de la regeneración (Fig. 3), lo que se traduce en un menor tiempo para lograr una mayor cantidad de brotes respecto a los otros medios de regeneración en estudio.

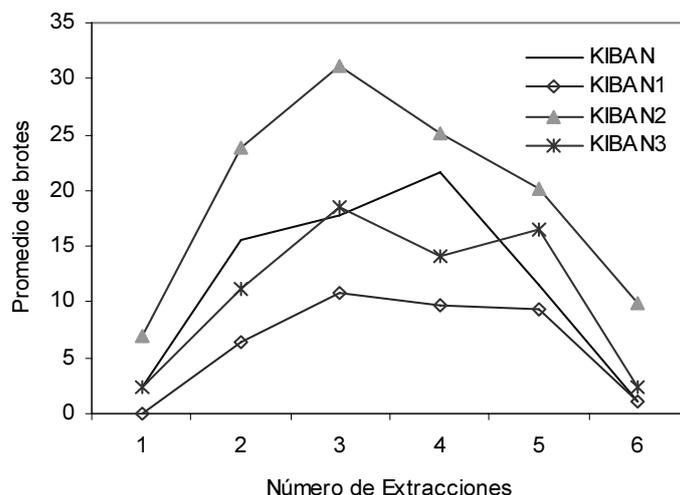


Figura 3. Evolución dinámica de la transferencia de brotes regenerados hacia el medio MS, efectuada en seis extracciones de brotes a partir de callos de arroz, incubados en los medios de regeneración con diferentes fuentes de carbono y agentes gelificantes: KIBAN: sacarosa-fitagel, KIBAN1: sacarosa-agarosa, KIBAN2: maltosa-fitagel, KIBAN3: maltosa-agarosa. Se muestra el promedio de brotes individualizados cada 5 días en tres experimentos.

Luego de cada intervalo de extracción de brotes, los callos con puntos verdes fueron incubados nuevamente en medio de regeneración fresco, lo cual favoreció la continuidad de la regeneración en las capas periféricas del callo, a partir de las cuales ocurre este proceso (Alfonso-Rubí *et al.*, 1999). Con esto se logra regenerar un número mayor de plántulas y se favorece el adecuado estado fisiológico de las células que se desarrollan en un medio en el que se han eliminado los residuos tóxicos del metabolismo y se han renovado los nutrientes.

Los brotes individualizados en frascos con medio MS mostraron un buen desarrollo del sistema radicular y un normal crecimiento del follaje en todos los casos. No se encontraron plántulas albinas ni con otras alteraciones fenotípicas visibles. Al ser transferidas a tierra, estas plantas manifestaron una favorable adaptación, con un 98% de supervivencia en esas condiciones.

CONCLUSIONES

La mayor eficiencia de regeneración se alcanzó con el medio de cultivo KIBAN2, en el que se empleó 30g.l⁻¹ de maltosa como fuente de carbono y fitagel 4.5 g.l⁻¹ como gelificante, sin que sea significativa la interacción entre ambos factores. Con este medio se observaron los primeros brotes al cabo de cinco días de incubación de los callos y se logró la más alta frecuencia de regeneración, que significa más de un 97% de callos con brotes respecto al total.

La extracción sucesiva de brotes de los callos cada cinco días después del comienzo de la regeneración fue en ascenso en todas las variantes ensayadas hasta los 15 ó 20 días aproximadamente. Nuevamente se observó un favorable comportamiento en el medio de cultivo KIBAN2, con un pico máximo de extracción de más de 30 brotes al cabo de los 15 días.

REFERENCIAS

- Alfonso-Rubí J, Carbonero P y Díaz I (1999) Parameters influencing the regeneration capacity of calluses derived from mature Indica y Japonica rice seeds after microprojectile bombardment. *Euphytica* 107: 115-123
- Al-Khayri JM, Shamblin CE, McNew RW y Anderson EJ (1996) Callus induction and plant regeneration of U.S. genotypes as affected by medium constituents. *In vitro Cell.Dev.Biol.* 32: 227-232
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Chen H, Yin KC, Chu CY y Bi F (1975) Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18: 659-668
- Coll Y, Pujol M, Castillo D, González A, Alfonso J y Armas R (1998) Improvement of Indica rice (*Oryza sativa* L) *in vitro* regeneration efficiency from callus mediated by stress. *Cereal Research Communications* 26(2): 153-160
- Ghosh Biswas GC y Zapata FJ (1990) Callus formation and plant regeneration from protoplasts derived from suspension culture of rice (*Oryza sativa* L. Cv. Taipei 177). *Plant Breed.* 105: 95-100
- Ghosh Biswas GC y Zapata FJ (1993) High-frequency regeneration from protoplasts of indica rice (*Oryza sativa* L) using maltose. *J. Plant. Physiol.* 141: 470-475
- Last DI y Brettell RIS (1990) Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep.* 9: 14-16
- Murashige T y Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 5: 473-497
- Strickland SG, Nichol JW, McCall, CM y Stuart DA (1987) Effect of carbohydrate source on alfalfa somatic embryogenesis. *Plant Sci.* 48: 113-121
- Toranzo LB y Zapata FJ (1992) High efficiency plant regeneration from protoplasts of the indica cultivar IR-58. *J. Experimental Botany* 43(257): 1633-1637
- Tsukahara M y Hirotsawa T (1992) Characterization of factors affecting plantlet regeneration from rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Bot. Mag. Tokyo* 105: 227-233
- Wang D, Miller PD y Sondahl MR (1989) Plant regeneration from protoplasts of Indica type rice and CMS rice. *Plant Cell Rep.* 8: 329-332