

Empleo de reguladores de crecimiento para la formación de cloroplastos en callos de arroz (variedad Jucarito-104) cultivados en luz y oscuridad

Maylin Pérez Bernal*, Yeosvany Cabrera Artilles, Magalis Delgado Rigo, Carlos Alberto Hernández Díaz, Raúl Armas Ramos. *Autor para correspondencia.

Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado 83 CP 60 200. Sancti Spiritus, Cuba.
e- mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

RESUMEN

Para promover la formación de cloroplastos en callos de arroz se analizó la influencia de combinaciones de 2,4-D y kinetina, así como el efecto de la luz y la oscuridad sobre la callogénesis y regeneración de plantas. Para detectar la clorofila se tomaron muestras de callos inmediatamente antes de ser transferidos al medio de regeneración, y a las 12, 24, 48 y 72 horas de cultivo en este medio y se observaron al microscopio de fluorescencia. La combinación de 1.0mg.l⁻¹ de 2,4-D y 2.5mg.l⁻¹ de kinetina no afectó significativamente la calidad de la callogénesis respecto al control sin kinetina, lo cual es conveniente pues la inclusión de kinetina en el medio de formación de callos puede favorecer el desarrollo de los plastidios. La formación de callos en la luz fue menos eficiente que en la oscuridad y afectó el porcentaje de plantas regeneradas. A las 24 horas de cultivo en regeneración se detectó la clorofila por fluorescencia, indicando la presencia de cloroplastos en células meristemáticas en diferenciación. A las 72 horas se observaron incontables conglomerados fluorescentes. En los callos formados sin kinetina la clorofila fue detectada por primera vez al cuarto día en forma de pequeños puntos fluorescentes.

Palabras clave: citoquinina, clorofila, regeneración

ABSTRACT

In this study we identify appropriate conditions for early induction of chloroplast in rice callus. It were analyzed different combinations of 2,4-D and kinetin, and effect of light and dark on the quality of callus formation and plant regeneration. We found that 1.0mg.l⁻¹ of 2,4-D and 2.5mg.l⁻¹ of kinetin were the best combination for the major average and quality of embryogenic callus obtained 21 day after culture, without significant effects respect to control without kinetin. Kinetin is a cytokinin that induces the development of plastids during callus formation. Callus formation under light was low efficient than at the dark one. In order to detect chlorophyll we used fluorescent microscopy for analysis of calli samples immediately before transferred them to regeneration media, and 12, 24, 48 and 72 hours after. Only 24 hours of incubation on regeneration media were sufficient to detect chlorophyll by fluorescent microscopy. Uncountable fluorescent clusters were observed at 72 hours. In callus formed without kinetin chlorophyll were detected four days after culture as small fluorescent spots.

Key words: chlorophyll, cytokinin, regeneration

INTRODUCCION

La transformación genética de cloroplastos se ha convertido en una tecnología muy ventajosa para el mejoramiento de algunos cultivos y la expresión de proteínas heterólogas en estos organelos. Numerosas ventajas hacen de este método una opción tentativa en la ingeniería genética de plantas, dentro de las cuales la más significativa es el aumento de los niveles de expresión del transgén, superiores entre diez y cincuenta veces respecto a la expresión nuclear, debido al alto número de copias del genoma de plastidio en cada célula vegetal (Guda *et al.*, 2000). Además, la heredabilidad de la información genética es materna, por lo que se evita que mediante el polen se dispersen en el ambiente los nuevos caracteres introducidos, y se eliminan así posibles daños al entorno. Otra ventaja importante es que la inserción de los nuevos genes puede ser

dirigida a una región determinada mediante secuencias que propicien la recombinación homóloga, lo que reduce los efectos de posición, silenciamiento de genes y otros fenómenos que influyen sobre la expresión de los genes introducidos al núcleo celular (Hajdukiewicz *et al.*, 2001).

Se han logrado expresar genes de orígenes diferentes (bacterianos, de mamíferos y virales) en plastidios de plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L.), la única especie vegetal que se ha logrado transformar de forma estable, aunque existen informes de transformación genética de plastidios en papa (*Solanum tuberosum* L.) (Khan y Maliga, 1999) y tomate (*Solanum esculentum*) (Ruf *et al.*, 2001).

Uno de los mayores obstáculos para la transformación de cloroplastos de plantas que regeneran vía embriogénesis somática es la dificultad

de expresar transgenes en proplastidios, en los cuales los sistemas de expresión y regulación génica son muy distintos a los de los cloroplastos maduros (Lee *et al.*, 2006). A pesar de esta limitación, se ha informado la transformación de plastidios en cultivos de dicotiledóneas vía embriogénesis somática, como la soya (*Glycine max* Merr.), la zanahoria (*Daucus carota* L.) y el algodón (*Gossypium herbaceum* L.) (Kumar *et al.*, 2004a; 2004b; Dufourmantel *et al.*, 2004; 2005). Sin embargo, en monocotiledóneas importantes como el arroz (*Oryza sativa* L.) son escasos los informes de plantas transplantómicas fértiles con transmisión comprobada de los transgenes a la descendencia (Lee *et al.*, 2006).

La transformación de plastidios de arroz es bastante ineficiente si se compara con especies dicotiledóneas. Existen varias razones que lo justifican. En primer lugar, las monocotiledóneas generalmente carecen de sistemas de cultivo *in vitro* eficientes y capaces de sustentar una alta capacidad de regeneración de plantas transplantómicas. Segundo, los proplastidios son en este caso el blanco de la transformación y su tamaño es una gran limitante: son cinco veces más pequeños que los cloroplastos maduros (Lee *et al.*, 2006). A esto se suma que los niveles de transcripción y traducción son menores en los proplastidios respecto a los cloroplastos (Mullet, 1993; Silhavy y Maliga, 1998).

Se ha demostrado que para el desarrollo de los cloroplastos son necesarias las citoquininas, que intervienen en la inducción de numerosos genes involucrados en el metabolismo de estos organelos, y promueven la conversión de etioplastos en cloroplastos por estimulación de la síntesis de clorofila. También se ha citado la favorable acción coordinada de la luz y las citoquininas en muchos procesos que involucran a los cloroplastos (Benková *et al.*, 1999).

En el cultivo de tejidos de arroz (*Oryza sativa* L.) se ha referido como un procedimiento muy aplicable a la regeneración de plantas vía embriogénesis

somática indirecta (Chowdhry *et al.*, 1993; Rueb *et al.*, 1994; Coll *et al.*, 1998). En la fase de callos que comprende, se establece una masa desdiferenciada de células meristemáticas que no tienen cloroplastos, por lo que no es factible utilizarlas como explante para la transformación genética específica de estos organelos. Por esta razón, el presente trabajo tuvo como objetivo determinar el efecto de dos reguladores de crecimiento, el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) y la kinetina, en la formación de cloroplastos en callos de arroz de la variedad Jucarito-104, cultivados en la luz y en la oscuridad. Se valora además la incidencia de estos factores sobre la calidad de la callogénesis y posterior regeneración de plantas. Mediante la técnica de microscopía de fluorescencia se describe una metodología para la detección de la clorofila en células de los callos en las primeras horas de cultivo en el medio de cultivo de regeneración.

MATERIALES Y METODOS

Formación de callos con diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina

Se utilizaron semillas maduras de arroz (*Oryza sativa* L.), variedad Jucarito-104, desinfectadas durante veinte minutos en hipoclorito de sodio (2%) y lavadas tres veces con agua estéril, para ser sembradas en placas de Petri con medio de cultivo N6 (Chu *et al.*, 1975) enriquecido con 1.0g.l⁻¹ de hidrolizado de caseína y 30g.l⁻¹ de sacarosa. Los experimentos se realizaron con dieciséis combinaciones de 2,4-D y kinetina en este medio de cultivo.

Al medio de cultivo se le ajustó el pH a 5.7 y se le añadieron 3.0g.l⁻¹ de Phytigel®. Se dispusieron cinco placas por tratamiento, con diez semillas cada una, y se colocaron durante tres semanas en la oscuridad a 28±1 °C. Transcurrido este tiempo se determinó el mejor tratamiento para ser utilizado en el experimento siguiente. El criterio seguido para esta decisión fue la evaluación de la eficiencia de la callogénesis, atendiendo al número de callos con estructuras embriogénicas formados, en relación con el número total de callos.

Tabla 1. Tratamientos con 2,4-D y kinetina empleados en el medio de cultivo para la formación de callos de arroz (variedad Jucarito -104). El tratamiento C corresponde al control.

| 2,4-D (mg.l ⁻¹) | 1.0 | 1.5 | 2.0 | 2.5 |
|--------------------------------|-----|-----|-----|-----|
| Kinetina (mg.l ⁻¹) | | | | |
| 0 | A | B | C | D |
| 1.0 | E | F | G | H |
| 2.0 | I | J | K | L |
| 2.5 | M | N | O | P |

Efecto del cultivo en luz y oscuridad sobre la calogénesis

Se utilizó el medio de cultivo del experimento anterior para la formación de callos, pero solamente con el tratamiento de 2,4-D y kinetina de mejores resultados. Para este estudio se situaron 50 placas con 10 semillas cada una: la mitad de las placas bajo luz fluorescente, con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad, y la otra mitad en la oscuridad total, a 28±1 °C ambas condiciones. La calidad de la calogénesis se evaluó con el mismo criterio del experimento anterior.

Regeneración de plantas

Los callos formados en los tratamientos en la luz y la oscuridad fueron transferidos a placas de Petri con el medio de cultivo KIBAM (Pérez *et al.*, 2002) que contiene el medio de cultivo basal MS (Murashige y Skoog, 1962), 3% de maltosa, kinetina 3mg.l⁻¹, 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0.5mg.l⁻¹, ácido naftalenacético (ANA) 1mg.l⁻¹ y 4.5g.l⁻¹ de Phytigel®. Se incubaron a 28±1 °C en una cámara de crecimiento con una combinación de luz solar y luz fluorescente, y fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 horas de oscuridad. Para valorar la eficiencia de regeneración en cada tratamiento se determinó el promedio de plantas regeneradas por callo.

Detección de clorofila por microscopía de fluorescencia

Se seleccionaron al azar diez muestras de callos de 2-3 mm de diámetro, formados con y sin kinetina, y se tomaron inmediatamente antes de ser transferidos al medio de cultivo de regeneración, y a las 12, 24, 48 y 72 horas de cultivo en este medio. Se disgregaron cuidadosamente y se colocó cada muestra sobre un portaobjetos para ser observadas al microscopio óptico de fluorescencia (Zeiss Axioskop) con un aumento de

400x y una luz de excitación entre 450 y 490 nm. Se determinó el número de puntos fluorescentes rojos por área total observada (aproximadamente 3.14cm²) en cada muestra.

Tratamiento estadístico de los resultados

Los experimentos donde se analiza el efecto de la combinación de reguladores de crecimiento en la formación de callos, así como el destinado a estudiar la incidencia de la luz y la oscuridad en la calogénesis y posterior regeneración de plantas, fueron conducidos y analizados según un diseño completamente aleatorizado. El ANOVA de clasificación simple y la comparación múltiple de medias (Prueba Student-Newman-Keuls) fueron realizados haciendo uso del paquete estadístico COSTAT versión 6.3.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos con diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina

Transcurridas las tres semanas en la oscuridad en medio de cultivo N6 con las diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina, se observó el mismo comportamiento en la formación de callos. En todos los tratamientos se encontraron dos tipos de callos: aquellos con apariencia muy compacta, endurecida y poco friable, y otros con estructuras proembriogénicas y globulares de color amarillo claro, densas, disgregables y de rápido crecimiento. Son estos últimos los callos que se prefieren en el cultivo de tejidos de arroz por su alta capacidad para regenerar plantas (Coll *et al.*, 1998). En la figura 1 se muestran los resultados cuantitativos obtenidos en esta fase experimental, donde se observa que no existieron diferencias significativas (p< 0.05) en el porcentaje de callos con estructuras embriogénicas formados en cada combinación.

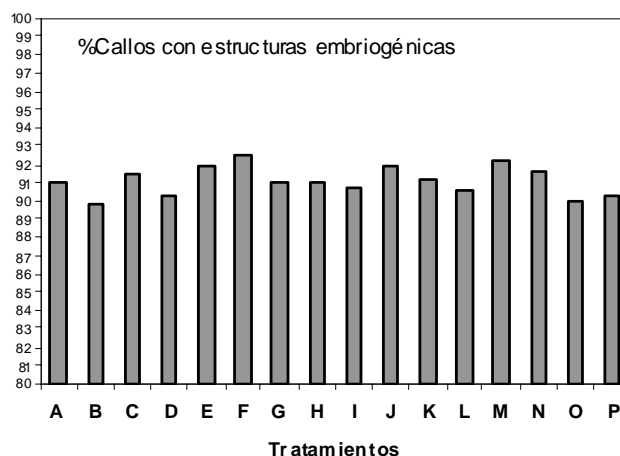


Figura 1. Eficiencia de la calogénesis a partir de semillas maduras de arroz de la variedad Jucarito-104, incubadas en la oscuridad en medio de cultivo con diferentes combinaciones de 2,4-D y kinetina (especificadas con letras en la Tabla 1) a las tres semanas de cultivo. No existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (p<0.05) según la Prueba Student-Newman-Keuls.

Estos resultados coinciden con la valoración cualitativa de la callogénesis, es decir, las combinaciones de reguladores de crecimiento que se incluyeron en el medio de cultivo para la formación de callos no originaron diferencias respecto al control C, es decir, la kinetina no provocó cambios significativos en esta fase del cultivo *in vitro*. Este resultado indica que puede incluirse la kinetina en el medio de cultivo para la formación de callos para favorecer la conversión de los proplastidios en cloroplastos en esta masa desdiferenciada de células (Benková *et al.* 1999), sin afectar la calidad de la callogénesis.

Atendiendo al efecto determinante de la kinetina para la diferenciación de cloroplastos, se consideró que la combinación M (2.5mg.l⁻¹ de kinetina y 1mg.l⁻¹ de 2,4-D) es la que debe incluirse en el medio de formación de callos, al tener la mayor concentración de kinetina y la menor de 2,4-D. Este balance de reguladores de crecimiento permite potenciar el papel de la kinetina sobre la formación de cloroplastos, y reducir la probabilidad de mutagénesis que pueda ocasionar el 2,4-D en las células del callo.

Efecto del cultivo en luz y oscuridad sobre la callogénesis

En los experimentos de callogénesis en la luz en el medio de cultivo con 2.5 mg.l⁻¹ de kinetina y 1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D algunas semillas emitieron coleóptilos verdes que finalmente involucionaron, y los callos formados en estas condiciones mantuvieron su coloración amarilla, crecieron con lentitud, menor tamaño y con apariencia más compacta y poco disgregable. Solamente en el 53.82% de estos callos se encontraron estructuras proembriónicas, lo cual difiere significativamente ($p < 0.05$) respecto al cultivo en la oscuridad, que osciló alrededor del 91%.

Los proplastidios se encuentran en las células meristemáticas y son cinco veces más pequeños que los cloroplastos maduros. Su conversión directa en cloroplastos se ha estudiado en plantas crecidas bajo condiciones de iluminación, aunque también se ha visto que en semilleros en completa oscuridad primero se transforman en etioplastos y en el tránsito a la luz sufren modificaciones morfofisiológicas para convertirse en cloroplastos (Atak *et al.*, 2003). Con intereses de transformación nuclear no es usual la inducción de callos de arroz en la luz, porque se producen respuestas fisiológicas diversas en una masa de células que se prefiere indiferenciada y proliferativa. Ammirato (1987) plantea que los procesos relacionados con la embriogénesis somática se favorecen mediante incubación en la oscuridad, y Thorpe (1988) se refiere a que pueden ocurrir bajo diferentes regímenes de luz y oscuridad. Sin embargo, con fines de transformar cloroplastos

sería conveniente cultivar los callos en la luz, pues es conocido que es un factor imprescindible en procesos directamente involucrados con los cloroplastos y la fotosíntesis, y podría favorecer la formación de estos organelos en los callos.

Regeneración de plantas

Al ser transferidos al medio de cultivo KIBAM, los callos formados en presencia de luz sufrieron una regeneración tardía y poco eficiente, con un promedio de 5.11 plantas por callo (Figura 2). Es probable que la presencia de luz durante la callogénesis pueda alterar los procesos fisiológicos involucrados con la regeneración, que unido a la poca calidad de los callos, determine la ineficiente regeneración de plantas. Lo mismo sucedió en los callos del control.

En el caso de los provenientes de la oscuridad se obtuvo un promedio de 12.7 plantas por callo, y en general se valora como muy eficiente la regeneración de estos callos, pues además de este alto promedio, regeneraron plantas completas con tallos y raíces de tamaño adecuado. Los callos del control C formados en la oscuridad mantuvieron un promedio de 11.44 plantas por callo, dato que no difiere significativamente ($p < 0.05$) del anterior, lo cual indica que la formación de los callos en presencia de kinetina y bajas concentraciones de 2,4-D (combinación M) no es un factor que origine diferencias en la calidad de la regeneración.

A pesar de la conveniencia de cultivar los callos en presencia de luz, con el fin de favorecer la formación de los cloroplastos (Benková *et al.*, 1999), estos resultados indican que el cultivo en estas condiciones retarda la regeneración y disminuye el número de plantas regeneradas por callo, lo que no es ventajoso para los protocolos de transformación genética.

Detección de clorofila por microscopía de fluorescencia

La observación al microscopio permitió localizar la fluorescencia de la clorofila en forma de pequeños puntos o conglomerados celulares de color rojo brillante. En las muestras de callos tomadas inmediatamente antes de transferirlos a medio de cultivo de regeneración así como a las 12 horas después de estar dispuestos en este medio de cultivo, no se observaron señales fluorescentes indicativas de la clorofila. A las 24 horas de cultivo se detectó en las muestras de callos un promedio cinco puntos fluorescentes rojos, lo que indica que en ese período ya existe clorofila en las células. Transcurridas 48 horas se triplicó el número de puntos fluorescentes en las muestras de callos, y a las 72 horas se observaron numerosos conglomerados de tamaño variable considerados incontables con la técnica utilizada (Figura 3).

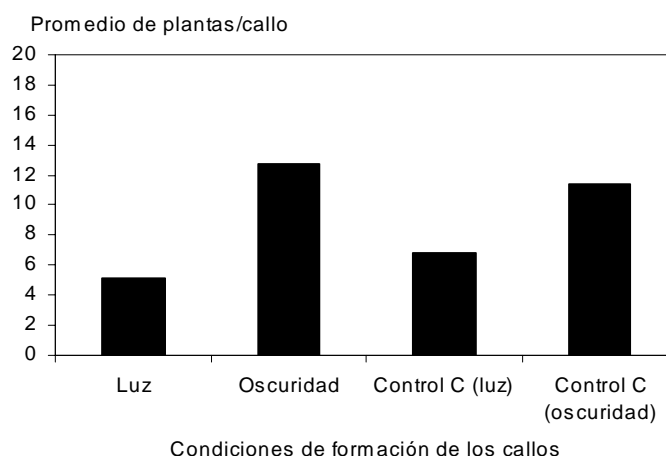


Figura 2. Eficiencia de regeneración de plantas a partir de callos de arroz de la variedad Jucarito-104 formados en la luz y la oscuridad. Letras diferentes sobre las barras indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) entre las medias según la Prueba Student-Newman-Keuls.

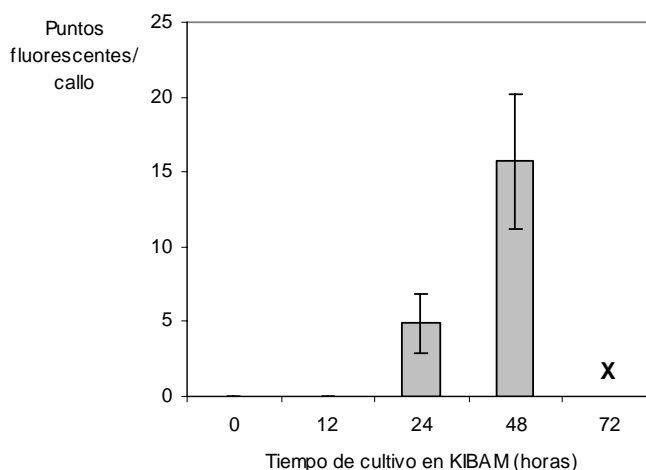


Figura 3. Detección de la clorofila por microscopía de fluorescencia en células de callos de arroz de la variedad Jucarito-104, formados en el medio de cultivo con la combinación M (2.5 mg.l⁻¹ de kinetina y 1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D) y cultivados diferentes tiempos en medio de regeneración KIBAM (Pérez *et al.*, 2002). Los resultados representan la media de diez repeticiones \pm el error estándar. (X) Significa que en este tiempo ya no es posible el conteo de puntos individuales, porque se encontraron conglomerados fluorescentes numerosos y de tamaño variable.

Es conocido que cuando la clorofila absorbe energía luminosa pueden ocurrir tres eventos: 1) que la energía sea atrapada y convertida en energía química como en la fotosíntesis, 2) que se disipe como calor, 3) que sea emitida inmediatamente con una longitud de onda mayor con pérdida de energía como fluorescencia. La fluorescencia se define genéricamente como la propiedad de una sustancia para emitir luz cuando es expuesta a una cierta radiación electromagnética. La clorofila presenta una fluorescencia en el rojo cuando es excitada con luz azul: puede medirse fácilmente y servir de marcador de la existencia de los cloroplastos y del funcionamiento fotosintético (Briantais *et al.*, 1986).

En los callos formados sin kinetina la clorofila fue detectada por primera vez como puntos fluorescentes en muestras tomadas al cuarto día en medio de cultivo de regeneración. Esto confirma la conveniencia de incluir la kinetina en el medio de cultivo para la formación de callos para acelerar la diferenciación de los cloroplastos (Benková *et al.*, 1999).

Con estos resultados puede hacerse una definición aproximada del comienzo de la formación de cloroplastos durante el proceso de regeneración. De los intervalos de tiempo analizados, es a las 72 horas de incubación en este medio de cultivo cuando se dispone de células con un mayor número de

cloroplastos. Como en este tiempo son aún muy incipientes los procesos de diferenciación relacionados con la regeneración, se considera que este puede ser un momento ideal para someter a los cloroplastos a la transformación genética, para luego continuar con la diferenciación celular hasta la regeneración de plantas completas a partir de los callos.

CONCLUSIONES

Se observó un efecto positivo de la oscuridad en la formación de callos, utilizando el medio de cultivo con 1.0 mg.l⁻¹ de 2,4-D y 2.5 mg.l⁻¹ de kinetina. En estas condiciones se observaron callos con estructuras proembriogénicas y globulares de rápido crecimiento, y a partir de ellas ocurrió la regeneración eficiente de plantas completas.

Utilizando el microscopio de fluorescencia fue posible detectar la clorofila, en forma de puntos rojos aislados, en los callos cultivados 24 horas en el medio de regeneración. A las 72 horas de cultivo se encontraron grandes conglomerados fluorescentes, que indicaron la existencia de un considerable número de cloroplastos en las células de estos callos, lo que permite disponer en ese momento de un material vegetal de interés para la transformación genética de cloroplastos de arroz.

REFERENCIAS

- Ammirato PV (1987) Organizational events during somatic embryogenesis. En: Green, CE, Somers DA, Hackett WP y Biesboer DD (eds) Plant Tissue and Cell Culture. pp. 57-81. Alan R. Liss. Inc New York
- Atak C, Emiroglu O, Alikamanoglu S, Rzakoulieva A (2003) Stimulation of regeneration by magnetic field in soybean (*Glycine max* L Merrill) tissue cultures. *Journal of Cell and Molecular Biology* 2: 113-119
- Benková E, Witters E, Van Dongen W, Kolar J, Motyka V, Brzobohaty, Van Onckelen HA, Machackova I (1999) Cytokinins in tobacco and wheat chloroplasts. Occurrence and changes due to light/dark treatment. *Plant Physiology* 121: 245-251
- Briantais J M, Vernotte C, Krause GH, Weis, E (1986) Chlorophyll fluorescence of higher plant chloroplasts and leaves. En: Govindjee J, Ames and D.J. Fork (eds) Light emission by plants and photosynthetic bacteria. pp. 539-577. Academic Press, New York
- Chowdhry CN, Tyagi AK, Maheshwari N, Maheshwari SC (1993) Effect of l-proline and l-tryptophan on somatic embryogenesis and plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L. cv. Pusa 169) *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 32(3): 357-361
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Chu CY, Bin FY (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, 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
- Dufourmantel N, Pelissier B, Garcon F, Peltier G, Ferullo JM (2004) Generation of fertile transplastomic soybean. *Plant Molecular Biology* 55: 479-489
- Dufourmantel N, Tissot G, Goutorbe F, Garcon F, Muhr C (2005) Generation and analysis of soybean plastid transformants expressing *Bacillus thuringiensis* Cry 1Ab protoxin. *Plant Molecular Biology* 58: 659-668
- Guda C, Lee, SB, Daniell, H (2000) Stable expression of a biodegradable protein-based polymer in tobacco chloroplast. *Plant Cell Report* 19: 257-262
- Hajdukiewicz, PTJ, Gilbertson L, Staub JM (2001) Multiple pathways for Cre/lox-mediated recombination in plastids. *Plant Journal* 27: 161-170
- Khan MS y Maliga, P (1999) Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants. *Nature Biotechnology* 17: 910-915
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004a) Plastid-expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots and leaves confers enhanced salt tolerance. *Plant Physiology* 136: 2843-2854
- Kumar S, Dhingra A, Daniell H (2004b) Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes. *Plant Molecular Biology* 56: 203-216
- Lee SM, Kang K, Chung H, Yoo SH, Xu XM, Lee SB, Cheong JJ, Daniell H, Kim M (2006) Plastid transformation in the monocotyledonous Cereal Crop, rice (*Oryza sativa*) and transmission of transgenes to their progeny. *Molecules and Cells* 21(3): 401-410
- Mullet J (1993) Dynamic regulation of chloroplast transcription. *Plant Physiology* 103: 309-313.
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 5: 473-497
- Pérez M, Coll Y, González A, Alfonso-Rubí J, Armas R, Hernández CA, Pujol M (2002) Influencia de la fuente de carbono y el agente gelificante sobre la regeneración de arroz Indica variedad IACuba-28. *Biotecnología Vegetal* 2(3): 163-166
- Rueb S, Leneman M, Schilperoort RA, Hensgens LAM (1994) Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced from mature rice seeds. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 36(2): 259-264
- Ruf S, Hermann M, Berger IJ, Carrer H, Bock R (2001) Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruits. *Nature Biotechnology* 19 (9):826-7
- Silhavy, D, Maliga P (1998) Plastid promoter utilization in a rice embryogenic cell culture. *Current Genetic* 34: 67-70
- Thorpe, TA (1988) Organogenesis *in vitro*. Structural, physiological and biochemical aspects. En: IK Vasil (eds) International review of Cytology. Supplement 11A, perspectives in Plant Cell and Tissue culture pp. 71-112, Academic Press, New York