

Propagación *in vitro* de la variedad cubana de arroz Jucarito-104

Maylin Pérez Bernal^{1*}, Yamilet Coll García², Annerys González Quintero¹, Carlos Hernández Díaz¹, Raúl Armas Ramos¹, Merardo Pujol Ferrer³. *Autor para correspondencia

¹ Departamento de Investigaciones. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus. Apartado Postal 83, Código 60 200, Sancti Spiritus, Cuba. e-mail: maylin.perez@cigb.edu.cu

² Centro de Estudios de Productos Naturales, Facultad de Química, Universidad de La Habana.

³ Investigaciones Agropecuarias. Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana.

RESUMEN

La propagación *in vitro* de plantas tiene entre sus ventajas que puede realizarse en cualquier época del año para producir plantas similares genéticamente, libres de patógenos sistémicos y con gran vigor. Con el propósito de establecer las condiciones propicias para la propagación a gran escala de plantas de la variedad cubana de arroz Jucarito-104, se realizaron experimentos para identificar factores involucrados en la multiplicación *in vitro* de brotes axilares, a través de la adición de citoquininas (6-BAP y kinetina) en el medio de cultivo, así como variantes de medio de cultivo MS semisólido y líquido. Se comprobó que empleando 5.0mg.l⁻¹ de 6-BAP en medio de cultivo MS líquido se logra un coeficiente de multiplicación de siete brotes por explante inicial en solo siete días, lo que permite obtener un elevado número de plantas en un tiempo reducido. No fue necesaria la adición de auxinas al medio de cultivo de enraizamiento para lograr un 100% de plantas con raíces y se alcanzó un 99% de supervivencia durante la aclimatización. Esta metodología puede ser aplicada en el manejo *in vitro* de esta variedad de arroz en trabajos de mejoramiento genético por mutaciones, cultivo de anteras, rescate de embriones y transgénesis, para reproducir rápidamente material vegetal de gran valor.

Palabras clave: brotes axilares, citoquininas, medio de cultivo líquido

ABSTRACT

In vitro propagation is an efficient method of propagating disease-free, genetically uniform and massive amounts of *in vitro* plants, irrespective of the year season. This study was carried to develop a micropropagation system for the Cuban Jucarito-104 rice cultivar and to evaluate the response of rice *in vitro* plantlets to different cytokinins (6-BAP and kinetin) and liquid or semisolid MS culture media, in order to identify treatments to achieve shoot multiplication. Best results were obtained using 5.0mg.l⁻¹ of 6-BAP in MS liquid medium: seven axillary buds per initial explants after seven days of *in vitro* culture of plantlets. Acclimatization was acceptable without adding auxins on rooting media in order to obtain 100% of plants with normal root. This result may facilitate the application of biotechnological approaches for improving this rice cultivar.

Key words: axillary buds, cytokinins, liquid culture media

INTRODUCCIÓN

A través de la propagación *in vitro* se puede lograr el mantenimiento y reproducción acelerada de materiales vegetales valiosos como plantas transgénicas, híbridos somáticos, líneas F1 híbridas y con esterilidad masculina, haploides y dobles haploides obtenidos mediante cultivo de anteras, así como germoplasma de especies en peligro de extinción. Otra de sus ventajas es que puede realizarse en cualquier época del año para producir plantas similares genéticamente, libres de patógenos sistémicos y con un gran vigor.

En el caso del arroz (*Oryza sativa* L.), uno de los cereales más consumidos por la población mundial, se han descrito procedimientos para la micropropagación a partir de brotes adventicios

(Khanna y Raina, 1998; Toyozo *et al.*, 2003) y de embriogénesis somática indirecta (Rahim *et al.*, 2005). Otros autores estudiaron la estabilidad genética de las plantas de arroz micropropagadas, por caracterización morfológica (Yoshida y Kato, 1996) o mediante análisis isoenzimáticos (Medina *et al.*, 2004).

La mayoría de estos trabajos estudia la composición de reguladores de crecimiento del medio de cultivo que se emplea para la micropropagación, como elemento decisivo en la respuesta *in vitro* del material vegetal. Específicamente las citoquininas son ampliamente utilizadas, ya que rompen la dominancia apical y estimulan la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas. Su uso varía en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas de los explantes (Licea *et al.*, 2001).

Hasta la fecha no se han referido métodos para la propagación *in vitro* de variedades cubanas de arroz empleadas rutinariamente en la producción nacional, y que puedan ser aplicados a protocolos de mejoramiento genético, para obtener a corto plazo un gran número de plantas transgénicas o mejoradas por técnicas clásicas. Por esta razón, este trabajo tuvo como objetivo establecer un protocolo para la micropropagación de la variedad cubana Jucarito-104.

MATERIALES Y MÉTODOS

Desinfección y germinación *in vitro* de las semillas

Se utilizaron semillas maduras de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Jucarito-104, las cuales fueron descascaradas manualmente y desinfectadas mediante inmersión en etanol al 70% por dos minutos, y posteriormente en lejía (hipoclorito de sodio 2%) durante diez minutos. A continuación se lavaron tres veces con agua destilada estéril y se secaron sobre papel absorbente, antes de ser colocadas en frascos de vidrio con medio de cultivo semisólido MS (Murashige y Skoog, 1962) con 30g.l⁻¹ de sacarosa y 3.0g.l⁻¹ de Phytigel® (medio M). Se situaron un total de 250 semillas, 10 por frasco, y se colocaron para la germinación en un cuarto climatizado con un régimen de fotoperíodo de 16 horas de luz (fluorescente) y 8 horas de oscuridad y temperatura de 28 ± 1°C.

A los cuatro días se determinó el número de semillas libres de contaminantes microbianos visibles por frasco y se calculó el porcentaje de desinfección. Las plántulas se separaron de las semillas y se leccionó un fragmento de tallo de 2.0cm próximo al cuello de la raíz, para ser utilizado como explante de partida para la propagación *in vitro*.

Multiplificación de los explantes

Un total de 100 explantes preparados como se describió anteriormente, a razón de 10 por frasco para cada tratamiento, fueron colocados en tres medios de cultivo semisólidos: M, M + 5.0mg.l⁻¹ de 6-Bencilaminopurina (6-BAP) (medio MB) y M + 5.0mg.l⁻¹ de kinetina (medio MK). Se cultivaron durante siete días a 28 ± 1 °C con un régimen de fotoperíodo de 18 horas de luz (fluorescente) y 8 horas de oscuridad.

Influencia del cultivo del explante en medio líquido sobre la multiplicación

Se utilizaron 100 explantes, 10 por tratamiento, que fueron colocados en medio de cultivo semisólido MB, en MS líquido (medio ML), o en ML + 5.0mg.l⁻¹ de 6-BAP (medio MLB). Los tratamientos con medio de cultivo líquido se colocaron en Erlenmeyers de 250ml de capacidad con 25ml de medio de cultivo y se incubaron durante siete días en un agitador rotatorio

a 150 rpm, a 28 ± 1°C con un fotoperíodo de 18 horas de luz (fluorescente) y 8 horas de oscuridad.

En todos los tratamientos se calculó el coeficiente de multiplicación como el número de brotes axilares producidos por explante inicial.

Enraizamiento de las plantas

Los brotes axilares obtenidos en la fase de multiplicación fueron individualizados del explante madre con ayuda de una pinza fina y se sembraron en frascos de vidrio con medio de cultivo MS semisólido con 1% de sacarosa y 3.0g.l⁻¹ de Phytigel®. Esta fase transcurrió durante diez días en las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo establecidas en los experimentos de la fase de multiplicación.

Se determinó el número de plantas con raíces y la altura de las plantas (cm) antes de ser transferidas a la fase de aclimatización.

Aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro*

Dos días antes del trasplante se destaparon los frascos que contenían las plantas. Al cabo de este tiempo se extrajeron del medio de cultivo con una pinza, se lavaron cuidadosamente los restos de Phytigel® de las raíces y se colocaron individualmente en tubos de ensayo con 10ml de agua con la mezcla de sales (Duchefa Biochemie) del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962). Posteriormente se sembraron en un sustrato consistente en materia orgánica y arena en una proporción 3:1. El riego se realizó en forma manual y con una frecuencia de días alternos.

Se evaluó la supervivencia de las plantas a los 30 días en esta fase.

Procesamiento estadístico de los resultados

Los datos de los coeficientes de multiplicación se procesaron mediante un análisis de varianza completamente aleatorizado. La comparación múltiple de medias se realizó a través de la prueba de Student-Newman-Keuls, haciendo uso del paquete estadístico COSTAT versión 6.3.

RESULTADOS Y DISCUSION

Desinfección y germinación *in vitro* de las semillas

Se obtuvo un 98.76% de semillas libres de contaminantes microbianos visibles, por lo cual se consideró que la desinfección del material vegetal fue satisfactoria. El hipoclorito de sodio es uno de los desinfectantes superficiales más empleados en el cultivo *in vitro*, generalmente en

concentraciones de 1 a 3% en tiempos de diez a veinte minutos y su efectividad puede aumentar si los explantes se lavan primeramente con etanol al 70% (Marulanda e Isaza, 2004).

Transcurridos cuatro días se observó un 98.8% de germinación, con lo cual se comprobó la buena calidad y viabilidad de las semillas empleadas.

Multiplicación de los explantes

Como se observa en la figura 1A, en medio de cultivo MS semisólido y sin reguladores de crecimiento la producción de plantas estuvo limitada a un coeficiente de multiplicación de 1.3, pero cuando se le añadió 6-BAP (medio MB) esta cifra se incrementó a 3.2, valor que fue significativamente diferente ($p < 0.05$) del resto de los tratamientos. Esto coincidió con lo descrito por Medina *et al.* (2004), que utilizan 5mg.l^{-1} de 6-BAP para micropropagar seis variedades de arroz cultivadas en Argentina.

Es muy frecuente que una gran cantidad de trabajos sobre propagación *in vitro* estén relacionados con la composición de reguladores de crecimiento del medio de cultivo, como elemento decisivo en la respuesta *in vitro* del material vegetal (Licea *et al.*, 2001). El uso de citoquininas es generalizado en los medios de cultivo para la propagación *in vitro* de plantas, el tipo y concentración varían en dependencia del balance endógeno de auxinas y citoquininas de los explantes. La proliferación de brotes axilares se logra con la adición de citoquininas al medio de cultivo para romper la dominancia apical y estimular la brotación de las yemas que se encuentran en las axilas de las hojas.

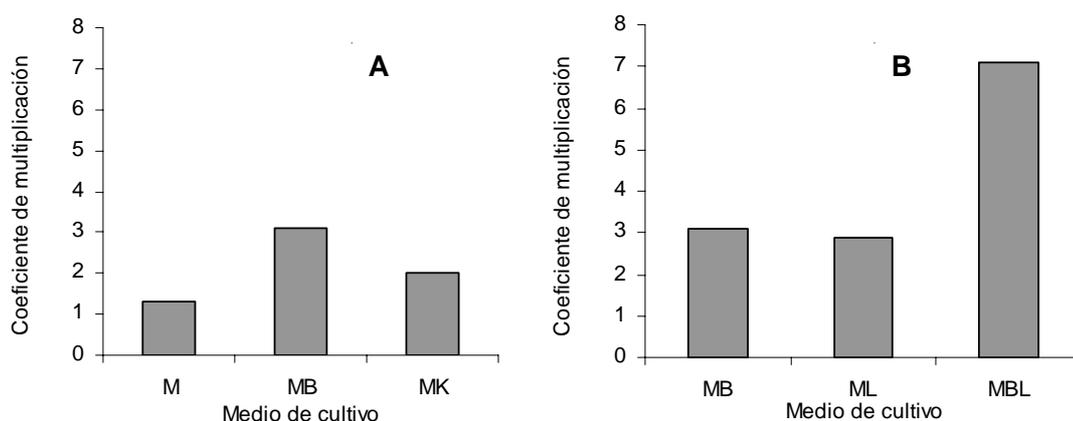
El 6-BAP es, en general, la citokinina más efectiva en la inducción de yemas axilares, seguida en orden

decreciente por la kinetina, la 2-isopenteniladenina y la zeatina. Se describe su utilización en el 74.6, 19.4, 3 y 3%, respectivamente, de los medios de cultivo empleados en la propagación *in vitro* (Hu y Wang, 1993). Otros autores han propuesto la utilización conjunta de 6-BAP y kinetina en diferentes concentraciones (Daquinta *et al.*, 2000; Murillo, 2002), lo cual pudiera considerarse para la micropropagación de las variedades cubanas de arroz.

Influencia del cultivo del explante en medio líquido sobre la multiplicación

En el caso del cultivo en medio líquido, se observó que la incubación en medio de cultivo ML produjo en solo siete días más del doble de los brotes que cuando los explantes fueron incubados en la variante semisólida del mismo medio de cultivo (medio M). Además, se obtuvo un número superior de brotes que con el medio de cultivo MB (Figura 1B). El incremento mayor entre todos los tratamientos se obtuvo cuando los explantes fueron cultivados en el medio MB líquido (MBL), donde el coeficiente de multiplicación sobrepasó la cifra de siete, la cual fue significativamente diferente del resto de los tratamientos ($p < 0.05$).

Con el cultivo líquido se logra que todo el explante se sumerja en el medio de cultivo con aireación constante y pueda asimilar más rápidamente sus principales constituyentes. Las diferencias de este con el medio de cultivo semisólido pudieron estar motivadas por una mayor retención de los componentes en el medio de cultivo gelificado (Licea *et al.*, 2001) lo que retrasaría la multiplicación de los explantes cultivados en este tratamiento respecto al medio de cultivo líquido.



Medias con letras diferentes indican que existen diferencias significativas ($p < 0.05$) según la Prueba de Student-Newman-Keuls.

Figura 1. Efecto de las citoquininas 6-BAP y kinetina (A) y del cultivo de los explantes en medio de cultivo líquido en la multiplicación de brotes axilares de la variedad cubana de arroz Jucarito-104 (B).

Es posible que en el medio de cultivo MBL se produzca un efecto sinérgico del 6-BAP y el cultivo líquido, que incrementa notablemente el coeficiente de multiplicación de brotes.

Enraizamiento de las plantas

El 100 % de las plantas obtenidas en todos los tratamientos emitieron raíces y alcanzaron una altura promedio de 10.2cm antes de ser llevadas a condiciones *ex vitro*. Es esencial que en el medio de cultivo de enraizamiento se haya reducido la concentración de sacarosa al 1.0% respecto al de multiplicación, en que está al 3%. Esta restricción es un paso inicial de adaptación de las plantas al cambio de condiciones heterótrofas a autótrofas que ocurrirá cuando sean transferidas a la fase de aclimatización.

En el medio de cultivo para enraizamiento pueden adicionarse auxinas como el ácido naftalenacético (ANA) y el ácido indolacético (AIA) para promover el desarrollo del sistema radicular. Sin embargo, en este caso no fue necesario el efecto auxínico para lograr una adecuada formación de raíces, en concordancia con lo publicado por Medina *et al.* (2004) para variedades argentinas y a diferencia de los resultados obtenidos por Latha *et al.* (1998) en la micropropagación de una variedad silvestre de arroz, donde fue imprescindible incluir el ácido indolacético para la formación de raíces. Es probable que la influencia del genotipo sea un factor a tener en cuenta para establecer el medio de cultivo apropiado para el enraizamiento *in vitro* del arroz.

Aclimatización de las plantas cultivadas *in vitro*

A los 30 días se obtuvo un 99% de supervivencia de las plantas transplantadas al sustrato. Pérez y Pastelón (2001) señalan que el tamaño de las plantas de *Alpinia purpurata* transplantadas al área del invernadero fue directamente proporcional al porcentaje de supervivencia. Estos resultados fueron logrados también en el cultivo de *Gerbera* por Torres (1999) y en la fase de aclimatización de *Solanum tuberosum* por Jiménez (2000). En este estudio, la altura promedio de las plantas llevadas a condiciones *ex vitro* resultó ser la adecuada, dado el elevado porcentaje de supervivencia obtenido.

Es conocido que las plantas recién enraizadas son muy sensibles a los cambios ambientales, de manera que el éxito o el fracaso de todo el proceso de propagación *in vitro* dependen de la aclimatización (Marulanda e Isaza, 2004). En esta fase las plantas sufrirán cambios que permitirán su adaptación y supervivencia en condiciones naturales. Por esta razón es factible realizar paulatinamente el tránsito de las plantas de condiciones *in vitro* a *ex vitro*, lo que se hizo en dos pasos previos al trasplante: dos días se destaparon los frascos con las plantas y 24

horas después estas se mantuvieron en agua con la mezcla de sales basales del medio de cultivo MS. Estos pasos intermedios se efectuaron con la finalidad de que las plantas iniciaran su adaptación a un ambiente físico con humedad relativa más baja que la que tenían hasta ese momento. En estas condiciones pueden promoverse la funcionalidad de los estomas y la formación de la cutícula de cera en hojas y tallos, lo cual es importante para regular fisiológicamente la pérdida de agua a lo largo de toda la superficie de las plantas cuando sean transplantadas a condiciones *ex vitro*, evitando su desecación.

Medina *et al.* (2004) comprobaron la conservación de la estabilidad genética en plantas de seis variedades argentinas de arroz propagadas *in vitro*. En el presente estudio no se encontraron alteraciones fenotípicas visibles en las plantas obtenidas, no obstante sería factible realizar análisis moleculares en las mismas para comprobar la existencia o no de variaciones somaclonales, las cuales pueden generarse en todo proceso de cultivo *in vitro* (Rasheed *et al.*, 2005).

CONCLUSIONES

Se estableció un protocolo para la propagación *in vitro* de brotes axilares de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Jucarito-104. Para ello debe emplearse el medio de cultivo MS líquido con 5.0mg l⁻¹ de 6-BAP, en agitación rotatoria a 150 rpm con un fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente y 8 horas de oscuridad, durante de siete días. Con esto se logra un coeficiente de multiplicación de más de siete brotes por explante inicial, en solo siete días. No es necesario adicionar auxinas al medio de cultivo de enraizamiento para lograr un 100% de plantas con raíces en la variedad de arroz Jucarito-104.

REFERENCIAS

- Carmona, ER, Rodríguez M, Borroto J, Arencibia AD (2000) Somaclonal variation in transgenic sugarcane plants: practical implications. En: Arencibia, A (Ed.) Developments in Plant Genetics and Breeding, pp. 62-67. Elsevier. London
- Daquinta, M, Ramos L, Lezcano Y, Rodríguez R, Escalona M (2000) Algunos elementos en la micropropagación de la Teca. Biotecnología Vegetal (1): 39-43
- Hu, C, Wang P (1993) *In vitro* cloning of the deciduous timber trees *Sassafras randaiense*. Zpflanzenphysiol. 3: 214-220
- Jiménez, F (2000) Aclimatización de plantas *in vitro* y producción de minitubérculos de papa (*Solanum tuberosum* L.) en casas de cultivo. Tesis para optar por el grado de Master en Biotecnología Vegetal. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central de Las Villas, Santa Clara, Cuba.
- Khanna, HK, Raina SK (1998) Genotype x culture media interaction effects of regeneration response of three indica rice cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 52: 145-153

- Latha R, Ajito A, Srinivasa RC, Eganathan P, Balakrishna P (1998) *In Vitro* Propagation of Salt-Tolerant Wild Rice Relative, *Porteresia coarctata* Tateoka. *Journal of Plant Growth Regulation* 17(1): 231-235
- Licea Moreno, RJ, Fernández Moreno M, Alvarado Ruffo K, Gómez Kosky R (2001) Influencia de la concentración de agar sobre la multiplicación *in vitro* de *Cymbopogon citratus* (D.C.) Stapf. *Biotecnología Vegetal* 1(2): 77-81
- Marulanda, ML, Isaza L (2004) Establecimiento *in vitro* de heliconias con fines de producción masiva. *Scientia et Technica* 10(26): 193-197
- Medina, R, Falocci M, Marassi MA, Mroginsky RA (2004) Genetic stability in rice micropropagation. *Biocell* 28(1): 13-20
- Murashige, T, Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497
- Murillo, MV (2002) Propagación vegetativa de la Teca por cultivo de tejidos *in vitro*. *Revista El Mueble y la Madera* (21): 45-46
- Pérez, M, Pastelón C (2001) Establecimiento aséptico a partir de ápices de ginger (*Alpinia purpurata*). XIV Reunión Científica Tecnológica Forestal y Agropecuaria. Veracruz, México.
- Rahim, F, Ilahi I, Bano S, Jabeen M (2005) Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. cv Swat-II) through somatic embryogenesis. *Pakistan Journal of Botany* 37(2): 237-242
- Rasheed S, Tahira F, Tayyab H, Khurram B, Shiekh R (2005) RAPD characterization of somaclonal variation in indica basmati rice. *Pakistan Journal of Botany* 37(2): 249-262
- Torres, JG (1999) Micropropagation and acclimatization of *Hedionea multiflorum*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 48: 213-217
- Toyozo, T, Iwao O, Masamichi H (2003) Improvement of micropropagation in rice through multiple shoot induction from seeds cultures *in vitro*. *Bulletin of Agricultural and Forestry Research Center* 6: 11-20
- Yoshida, T, Kato H (1996) *In vitro* propagation of hybrid rice. Vertical, rotatory liquid culture of multiple shoots and field performance. *JARQ* 30: 9-14