

CALLOGÉNESIS Y REGENERACIÓN *In Vitro* DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CON LOS BIOESTIMULANTES CUBANOS BIOSTAN Y LIPLANT

Lianette Godoy, E. Héctor[✉], Evelyn Valera y A. Torres

ABSTRACT. The effect of Cuban biostimulants Biostan and Liplant on the *in vitro* callogenesis and regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) cvs. INCA LP-5, IACuba-28 and LC88-66 was studied, aimed to improve the amount and quality of the material disposed for the genetic transformation in this species. To study callogenesis, seeds were grown on a Murashige and Skoog medium, supplemented or not with biostimulants, and the percentage of callus formation, color, consistency and fresh weight were evaluated at 28 days. *In vitro* plant regeneration was studied six weeks after transferring calluses to KIBAN medium, supplemented or not with biostimulants. The variables evaluated were: callus regeneration ability, number of roots and shoots. Biostan and Liplant were found to potentiate the induction effect of 2,4-D on *in vitro* rice callogenesis. The lowest concentrations of Biostan and Liplant favoured INCA LP-5 regeneration, while biostimulants did not increase regeneration in the remaining varieties with respect to the control. Results suggest the use of these biostimulants supplementing 2,4-D to obtain rice calluses for the genetic transformation of this species.

Key words: *Oryza sativa*, rice, tissue culture, plant growth stimulants

RESUMEN. Se evaluó el efecto de los bioestimulantes cubanos Biostan y Liplant sobre la callogénesis y regeneración *in vitro* del arroz (*Oryza sativa* L.) cvs. INCA LP-5, IACuba-28 y LC88-66, con el objetivo de mejorar la calidad y cantidad del material destinado a la transformación genética de esta especie. Para el estudio de la callogénesis se cultivaron semillas en el medio de Murashige y Skoog, suplementado o no con los bioestimulantes, y a los 28 días se evaluaron el porcentaje de formación de callos, su coloración, consistencia y masa fresca. La regeneración de plantas *in vitro* se estudió a las seis semanas de transferidos los callos al medio KIBAN suplementado o no con los bioestimulantes. Las variables evaluadas fueron: capacidad regenerativa de los callos, número de raíces y brotes. El Biostan y Liplant potenciaron el efecto inductor del 2,4-D en la callogénesis *in vitro* del arroz. Las menores concentraciones de Biostan y Liplant favorecieron la regeneración en la variedad INCA LP-5, mientras que en las dos variedades restantes, los bioestimulantes no provocaron incrementos en la regeneración con respecto al control. Los resultados sugieren el empleo de estos bioestimulantes como complemento del 2,4-D en la obtención de callos de arroz para la transformación genética de esta especie.

Palabras clave: *Oryza sativa*, arroz, cultivo de tejidos, estimulantes de crecimiento vegetal

INTRODUCCIÓN

La introducción de genes foráneos mediante ingeniería genética, en especies en las que la eficiencia de los sistemas de transformación genética no es alta, como el arroz (*Oryza sativa* L.), requiere un sistema de inducción de callos y regeneración de plantas óptimo y reproducible, que permita obtener la mayor cantidad posible de plantas fértiles a partir de los tejidos transformados (1).

Varios factores (entre ellos la concentración de reguladores de crecimiento en los medios de cultivo) pueden afectar la obtención de callos y posterior regeneración de plantas a partir de ellos. En los últimos años, se

ha comenzado a generalizar la adición de sustancias bioactivas a los medios de cultivo, para incrementar la eficiencia de la callogénesis y regeneración (2).

En la Universidad Agraria de La Habana se producen bioestimulantes, que han sido empleados con éxito en la producción agrícola de diferentes especies de plantas. Entre ellos se encuentran el Biostan y Liplant, productos derivados del humus de lombriz, que entre sus componentes contienen fracciones hormonales, con los que se han obtenido resultados satisfactorios en la propagación *in vitro* del plátano macho (3, 4) y en la aclimatización de vitroplantas de piña (5), así como en aplicaciones *ex vitro* en el cultivo del arroz (6).

Este trabajo se propuso como objetivo evaluar el efecto del Biostan y Liplant sobre la inducción de callos y regeneración de vitroplantas de arroz, como vía para mejorar la cantidad y calidad del material vegetal, para su utilización en métodos de ingeniería genética de esta especie.

Ms.C. Lianette Godoy y Evelyn Valera, Profesoras Instructoras; Dr.C. E. Héctor, Profesor Auxiliar y Dr.C. A. Torres, Profesor Titular del Grupo de Biotecnología Vegetal, Facultad de Agronomía, Universidad Agraria de La Habana (UNAH), Gaveta Postal 18-19, San José de las Lajas, La Habana, CP32 700, Cuba.

✉ efidel@isch.edu.cu

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal. Se utilizaron semillas de arroz de las variedades INCA LP-5, IACuba-28 y LC88-66, obtenidas en el Instituto de Investigaciones del Arroz. Las semillas se descascararon manualmente y se seleccionaron las que tenían el embrión bien conservado, mediante observación al estereomicroscopio. La desinfección se realizó mediante un procedimiento (2), que consiste en lavados consecutivos con etanol 70 % (1 min), hipoclorito de sodio 5 % (20 min), tres enjuagues en agua destilada estéril y secado con papel de filtro estéril, todo ello en la cámara de flujo laminar.

Inducción de callogenesis. Se diseñaron 13 tratamientos consistentes en el medio de cultivo de Murashige y Skoog (7), con o sin ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D), al que se añadieron distintas concentraciones de los bioestimulantes Biostan o Liplant (Tabla I). Las semillas cultivadas (12 por cada variante) se incubaron en la oscuridad a $25\pm 1^\circ\text{C}$. A los 28 días se evaluaron: porcentaje de formación de callos, coloración de los callos (amarillo, cremoso o pardo), consistencia (friable o compacto) y masa fresca (g). Los porcentajes de formación de callos se procesaron para cada variedad a través del Análisis de Varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y las sumas de rangos para cada variedad, se compararon con la Prueba de Student-Newman-Keuls para $p < 0.05$. Los datos de masa fresca se procesaron por un Análisis de Varianza Bifactorial (variedades x tratamientos) con un Diseño Completamente Aleatorizado y las medias se compararon mediante la dócima de Rangos Múltiples de Duncan para $p < 0.05$.

Tabla I. Tratamientos experimentales ensayados para la inducción de callogenesis en arroz

Tratamiento	2,4-D (mg.L ⁻¹)	Biostan (mg.L ⁻¹)	Tratamiento	2,4-D (mg.L ⁻¹)	Liplant (dilución v/v)
1 (control)	2	-	8	-	1/30
2	-	3	9	-	1/40
3	-	4	10	-	1/50
4	-	5	11	2	1/30
5	2	3	12	2	1/40
6	2	4	13	2	1/50
7	2	5			

Regeneración de plantas. Se obtuvieron callos de las tres variedades en el medio MS (7) suplementado con 2,4-D (2 mg.L^{-1}). Los callos se transfirieron a siete tratamientos basados en el medio KIBAN (2) para la regeneración de plantas de arroz, que contiene 6-furfurilaminopurina (kinetina) 3 mg.L^{-1} , ácido naftalenacético (ANA) 1 mg.L^{-1} y 6-bencilaminopurina (6-BAP) 0.5 mg.L^{-1} . A los tratamientos se añadió Biostan o Liplant (Tabla II).

Los callos (10 repeticiones/tratamiento) se cultivaron en condiciones de luz, bajo un flujo de fotones fotosintéticos de $50\text{-}62.5 \text{ mmol.m}^{-2}.\text{seg}^{-1}$ durante seis semanas, a una temperatura de $25\pm 1^\circ\text{C}$. Transcurrido este tiempo se evaluaron las siguientes variables:

- ⇒ capacidad regenerativa de los callos según la escala de 1 a 5 grados de Santana (8)
- ⇒ número de raíces
- ⇒ número de brotes

Tabla II. Tratamientos experimentales ensayados para la regeneración de plantas de arroz

Tratamiento	Biostan (mg.L ⁻¹)	Liplant (dilución v/v)
1 (control)	-----	-----
2	3	-----
3	4	-----
4	5	-----
5	-----	1/30
6	-----	1/40
7	-----	1/50

Los resultados se procesaron para cada variedad a través del Análisis de Varianza no paramétrico de Kruskal-Wallis y las Sumas de Rangos se compararon con la Prueba de Student-Newman-Keuls.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Inducción de callogenesis. La variable porcentaje de formación de callo (Tabla III) se comportó de manera similar en las tres variedades para las variantes de medio de cultivo que no contenían 2,4-D. Los resultados fueron estadísticamente inferiores al control (variante 1) en todos estos casos, pues aunque se formó callo en las variedades IACuba-28 y LC88-66 con Biostan 3 mg.L^{-1} sin 2,4-D (variante 2), el porcentaje fue muy bajo. La variedad INCA LP-5 en este tratamiento no formó callos; tampoco se indujo la callogenesis en los restantes (3, 4, 8, 9 y 10) para ninguna de las tres variedades.

Tabla III. Efecto del Biostan y el Liplant sobre la callogenesis de tres variedades de arroz

Tratamientos	Porcentaje de formación de callo		
	INCA LP-5	IACuba-28	LC 88-66
1	92 c	88 c	90 b
2	0 e	42 e	67 c
3	0 e	0 f	0 d
4	0 e	0 f	0 d
5	91 c	90 b	92 b
6	82 d	84 d	88 b
7	100 a	81 d	90 b
8	0 e	0 f	0 d
9	0 e	0 f	0 d
10	0 e	0 f	0 d
11	96 b	97 a	96 a
12	90 c	92 b	85 b
13	96 b	82 d	82 b

En los demás tratamientos, que contenían 2,4-D 2 mg.L^{-1} , se obtuvo callo en las tres variedades, y los porcentajes de formación en general fueron iguales o estadísticamente superiores al control.

Para la variedad INCA LP-5, el mejor tratamiento resultó ser el 7 (Biostan 5 mg.L⁻¹ combinado con 2,4-D 2 mg.L⁻¹), que fue superior estadísticamente a los demás, seguido de los tratamientos 11 y 13 que combinaban el 2,4-D 2 mg.L⁻¹ con el Liplant 1/30 (v/v) y 1/50 (v/v), que también superaron al control y al resto de las variantes.

Las variedades IACuba-28 y LC88-66 alcanzaron los mayores porcentajes de formación de callos en el tratamiento 11, que contenía 2,4-D 2 mg.L⁻¹ y Liplant 1/30 (v/v), el que difirió significativamente de todos los restantes.

En el caso de IACuba-28, le siguieron los tratamientos 5 (2,4-D 2 mg.L⁻¹ con Biostan 3 mg.L⁻¹) y 12 (2,4-D 2 mg.L⁻¹ con Liplant 1/40 V/V) que también superaron al control. En la variedad LC88-66 ningún otro tratamiento superó al control.

La adición de 2,4-D es suficiente para inducir la desdiferenciación celular; la concentración de 2 mg.L⁻¹ de este regulador del crecimiento se reconoce como la óptima para lograr la iniciación de callos de arroz (9).

La Figura 1 muestra un ejemplo del efecto del Biostan 5 mg.L⁻¹ con y sin la presencia de 2,4-D.

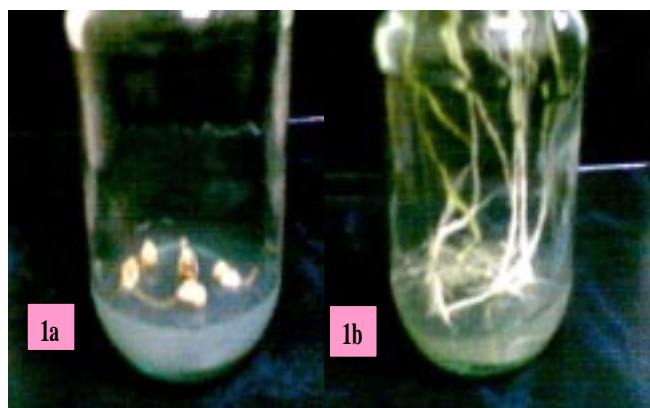


Figura 1. Efecto (a) del Biostan 5 mg.L⁻¹ combinado con 2,4-D 2 mg.L⁻¹ (tratamiento 7) y (b) sin 2,4-D (tratamiento 4) en la variedad INCA LP-5

El hecho de que se haya obtenido callo con el solo empleo de Biostan 3 mg.L⁻¹ (tratamiento 2) en dos de las tres variedades, puede deberse a la concentración de sustancias con actividad auxínica presentes en este bioestimulante de naturaleza orgánica (10), que oscila entre 1 y 10 mg.g⁻¹.

Las variables coloración y consistencia de los callos se comportaron de manera uniforme para las tres variedades en todos los tratamientos que contenían 2,4-D con Biostan o Liplant a todas las concentraciones ensayadas, así como en el control, obteniéndose callos de color amarillo cremoso y de consistencia friable, similares a los que se muestran en la Figura 1a. Estas propiedades son características de los callos embriogénicos en esta especie (9). La ausencia de 2,4-D en los medios de cultivo produjo callos pardos y compactos, lo cual se asocia a la pobre viabilidad del callo para regenerar plantas posteriormente (Figura 1b).

Los resultados del efecto del Biostan y el Liplant en combinación con el 2,4-D sobre la masa fresca de los callos se muestran en la Tabla IV.

Tabla IV. Efecto del Biostan y el Liplant sobre la masa fresca de callos de tres variedades de arroz

Tratamientos	Masa fresca (g)		
	INCA LP-5	IACuba-28	LC88-66
1	0.3499 ij	0.3385 j	0.2508 k
2	0.1000 m	0.1845 l	0.2030 l
3	0.1000 m	0.1210 m	0.1000 m
4	0.1000 m	0.1000 m	0.1000 m
5	0.4633 de	0.4680 de	0.3753 hi
6	0.5422 c	0.3785 hi	0.3716 hij
7	0.6575 a	0.3644 hij	0.4651 de
8	0.1000 m	0.1000 m	0.1000 m
9	0.1000 m	0.1000 m	0.1000 m
10	0.1000 m	0.1000 m	0.1000 m
11	0.5808 b	0.5345 c	0.4330 ef
12	0.5802 b	0.3871 gh	0.4708 d
13	0.5888 b	0.4173 fg	0.4538 de

F: 51.033 SX (AxB): 0.0045

Se observó interacción significativa entre las variedades y los tratamientos. Los mejores resultados en cada variedad se obtuvieron en tratamientos en que se combinó el 2,4-D con los bioestimulantes, que en general superaron estadísticamente a sus respectivos controles (tratamiento 1). Este resultado pone de manifiesto que la presencia del 2,4-D es imprescindible para la formación de callo en el arroz, lo que coincide con lo informado anteriormente en esta especie (2).

Los pobres resultados de los tratamientos sin 2,4-D indican que el Biostan y Liplant en las concentraciones ensayadas, no resultan sustitutos efectivos del 2,4-D como inductor de la calogénesis *in vitro* para estas tres variedades de arroz. Sin embargo, puesto que los mayores valores de masa fresca en las tres variedades se obtuvieron en combinaciones del 2,4-D con ambos bioestimulantes, estos últimos al parecer potencian el efecto de este regulador del crecimiento. Los bioestimulantes Biostan y Liplant han sido empleados para la estimulación de otros procesos *in vitro* y *ex vitro* (3, 4, 5, 11).

Regeneración de plantas. Los tratamientos 2 y 7, que tenían las menores concentraciones de bioestimulantes en estudio, correspondientes al Biostan 3 mg.L⁻¹ y Liplant 1/50 (v/v), no difirieron significativamente del control en cuanto a su capacidad regenerativa (Figura 2). En cambio, los restantes tratamientos resultaron estadísticamente inferiores al control, evidenciándose un marcado efecto depresivo de los bioestimulantes sobre la potencialidad de los callos para la organogénesis. Este fenómeno puede tener su explicación en que al aumentar la cantidad de bioestimulante en el medio de cultivo, se incrementa la concentración de la fracción auxínica en el medio (4), por lo cual el balance hormonal se desplaza en ese sentido y se inhibe la formación de brotes. Como resultado se manifiesta un predominio de los grados 1 y 2 de la escala, que se corresponden con la menor capacidad regenerativa de los callos.

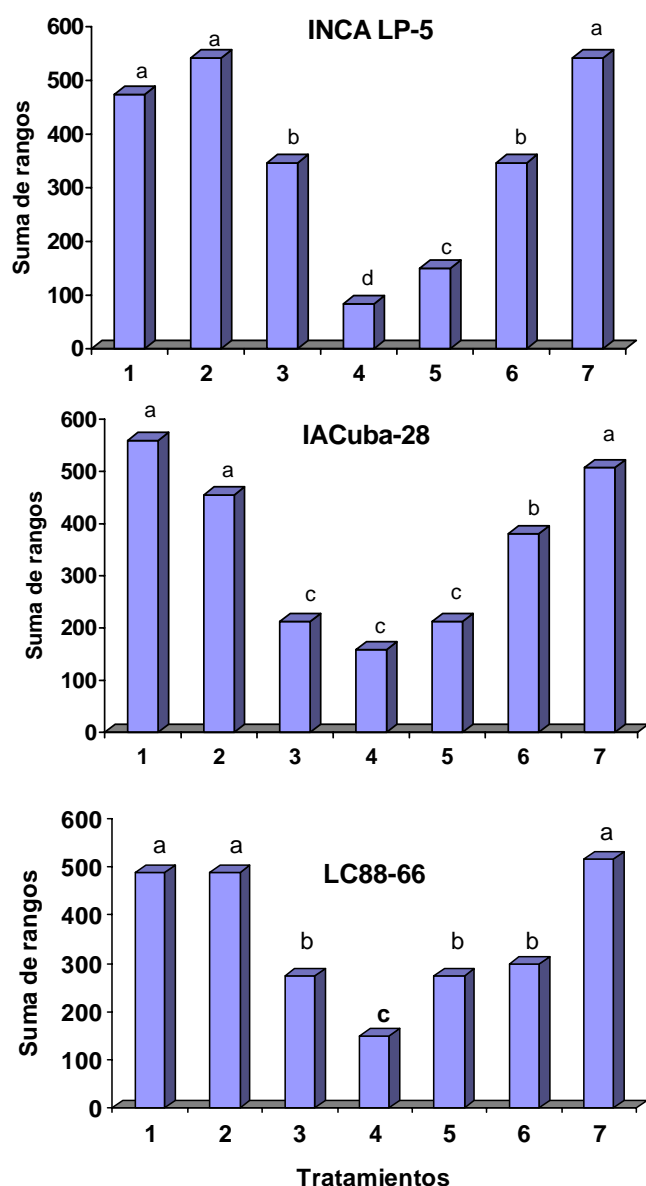


Figura 2. Efecto del Biostan y el Liplant sobre la capacidad regenerativa de los callos de tres variedades de arroz

En la variedad INCA LP-5, los mayores valores de la variable número de raíces (Figura 3) se obtuvieron en los callos cultivados en presencia de Biostan 3 mg.L⁻¹ (tratamiento 2), el cual difirió significativamente del resto. Los tratamientos 3 (Biostan 4 mg.L⁻¹), 6 (Liplant 1/40 V/V) y 7 (Liplant 1/50 v/v) mostraron resultados estadísticamente iguales al control. En la variedad IACuba-28, esta variable tuvo sus mayores valores en el control y en el tratamiento 7, que contiene la menor concentración de Liplant. En los restantes, los bioestimulantes tuvieron un efecto depresivo sobre la rizogénesis.

En la variedad LC88-66, el número de raíces fue estimulado en mayor medida por el tratamiento 2, seguido del 7. Ambos superaron estadísticamente al control, y eran los que contenían las menores concentraciones de ambos bioestimulantes.

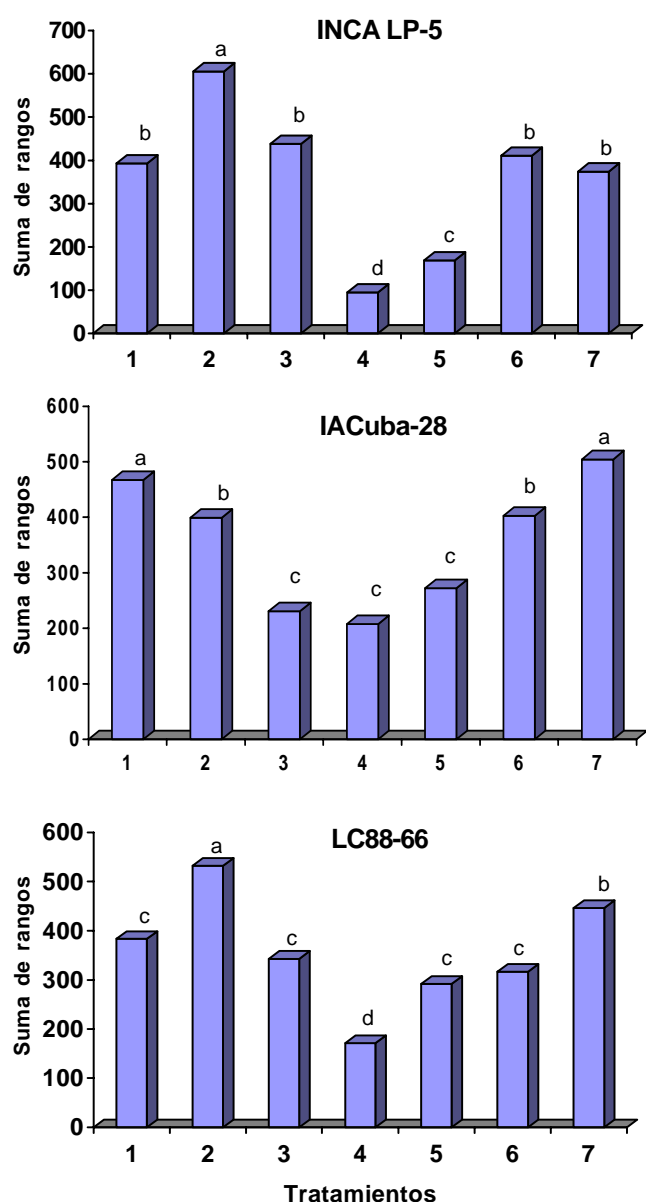


Figura 3. Efecto del Biostan y el Liplant sobre el número de raíces formadas en los callos de tres variedades de arroz

El tratamiento 2 fue el más efectivo en la formación de raíces, pues superó al control para las variedades INCA LP-5 y LC88-66; el tratamiento 7 también resultó efectivo al igualar al control en las variedades INCA LP-5 e IACuba-28, y superarlo en LC88-66. El resto de los tratamientos mostró un efecto depresivo sobre esta variable, con valores significativamente inferiores al control. En muchos casos, esto coincidió con el comportamiento de la variable capacidad regenerativa de los callos y la posible causa puede ser el incremento excesivo de las concentraciones de auxinas en el medio de cultivo (4) hasta niveles fisiológicamente no permisibles, como resultado del aporte de los bioestimulantes.

El número de brotes tuvo un comportamiento más heterogéneo para las tres variedades (Figura 4). En la INCA LP-5 esta variable tuvo su mayor valor en el tratamiento 2, que difirió significativamente de todos los otros, seguido del 7, que también fue significativamente superior al control. El resto de los tratamientos experimentales tuvo efecto depresivo sobre la brotación. En las variedades IACuba-28 y LC88-66, el control fue significativamente superior a todas las concentraciones de bioestimulantes ensayadas, lo cual evidencia un efecto negativo de estos sobre la brotación en estas variedades.

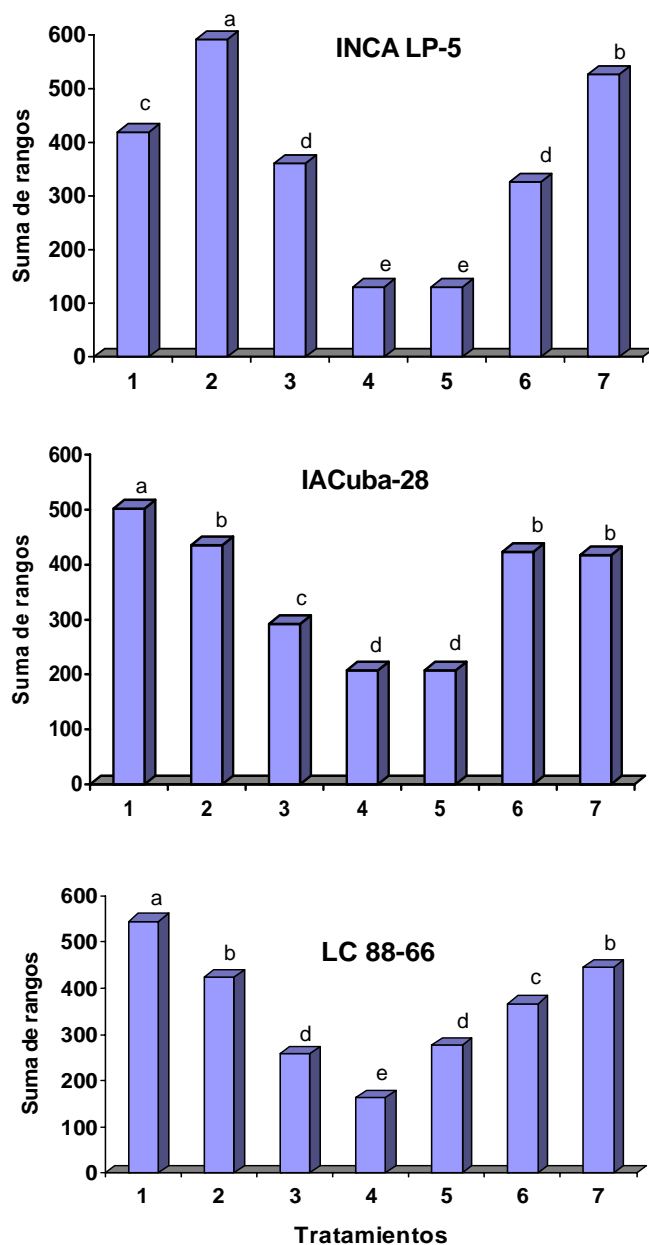


Figura 4. Efecto del Biostan y el Liplant sobre el número de brotes formados en los callos de tres variedades de arroz

Generalmente, el proceso de formación de brotes exige una relación citoquinina/auxina elevada. Al cultivar callos *in vitro* manteniendo una alta relación de citoquininas/auxinas, se producen células meristemáticas que se dividen y generan otras que se diferencian para formar yemas, tallos y hojas; por lo general, si se invierte esta proporción, se favorecerá la formación de raíces. Sin embargo, el resultado final dependerá no solo de las cantidades de ambos tipos de reguladores del crecimiento añadidas al medio de cultivo, sino del balance endógeno que se establezca entre estas y las concentraciones ya existentes en el propio tejido vegetal (4, 11).

Del análisis integral de todos los resultados, es posible inferir que el Biostan y Liplant no sustituyen al 2,4-D en la callogénesis *in vitro* del arroz, pero potencian su efecto inductor para este proceso. Las menores concentraciones de Biostan (3 mg.L⁻¹) y Liplant (1/50 v/v) favorecieron la regeneración de brotes a partir de los callos en la variedad INCA LP-5. En las dos variedades restantes, ninguna concentración de bioestimulantes provocó incrementos en la regeneración con respecto al control.

La explicación de los comportamientos observados en la callogénesis y regeneración de plantas parece estar relacionada con la presencia de sustancias reguladoras con actividad auxínica en los bioestimulantes, y las diferencias genéticas y fisiológicas entre las variedades estudiadas.

Los resultados permiten sugerir el empleo de los bioestimulantes Biostan y Liplant en la obtención de callos de arroz para la transformación genética de esta especie.

REFERENCIAS

1. Sasson, A. Cultivos transgénicos: hechos y desafíos. Ed. Elfos Scientiae, 2001. 377 p.
2. Coll, Y. Establecimiento de condiciones para la manipulación *in vitro* de células y tejidos de variedades cubanas de arroz (*Oryza sativa* L.). [Tesis de Maestría]; Universidad de La Habana, 1998, 39 p.
3. Díaz, B.; Héctor, E.; Torres, A.; Cabañas, M.; Garcés, N.; Izquierdo, H.; Núñez, M. e Iglesias, R. Empleo de productos bioactivos cubanos como sustitutos de los reguladores del crecimiento en la propagación del plátano macho (AAB). Fase de establecimiento *in vitro*. *Alimentaria*, 2004, vol. 51, no. 359, p. 103-107.
4. Héctor, E.; Torres, A.; Algoe, S. y Cabañas, M. Sustitución del ácido indolacético (AIA) por los bioestimulantes BB-6 y Biostan en el establecimiento y multiplicación *in vitro* del plátano macho (*Musa* sp. AAB) clon Sobrino. En: Memorias de la Conferencia Internacional sobre Desarrollo Agropecuario y Sostenibilidad AGROCENTRO 2005. CD-ROM (3:2005), 2005.
5. Chea, A.; Valera, E. e Isidró, M. Influencia de diferentes sustratos y bioproductos en la fase de aclimatación de vitroplantas de piña (*Ananas comosus* (L.) Merr). En: III Taller de Productos Bioactivos, Congreso Científico del INCA (14: 2004, nov 9- 12, La Habana). Memorias. CD-ROM. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, 2004. ISBN 959-7023-27-X

6. Izquierdo, R.; Marrero, E. L.; Díaz, M. M.; Garcés, N.; García, V.; Hernández, I. y Urra, I. Nueva alternativa en la producción de arroz (*Oryza sativa* L.) popular en condiciones del municipio de Güines. En: III Taller de Productos Bioactivos. Congreso Científico del INCA (14:2004). Memorias (CD-ROM), Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, ISBN: 959-7023-27-X.
7. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 1962, vol. 15, p. 473-497.
8. Santana, N. Determinación de un medio para la obtención de callos de variedades de caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbrido) *in vitro*. *Cultivos Tropicales*, 1982, vol. 24, p. 567-577.
9. Prede, M. L. Morfogénesis *in vitro* en variedades comerciales de arroz (*Oryza sativa* L.): evidencia histológica y efecto biorregulador de fitohormonas tradicionales y análogos de brasinoesteroides. [Tesis de Maestría]; UH, 1999. 104 p.
10. Garcés, N.; Lorente, A.; Arteaga, M.; Caro, I.; Huelva, R. y Mesa, S. Efecto de los productos Biostan y Liplant sobre cultivares de tomate y pepino en casas de cultivos protegidos en Cuba. En: Memorias AGROTROP/2002, UNAH. 2002.
11. Héctor, E.; Díaz, B.; Torres, A., Garcés, N.; Huelva, R.; Roque, A.; Godoy, L.; Isidró, M.; Tirado, A.; Cabañas, M.; Cremé, Y.; Díaz, A. y Proenza, R. Efecto del Liplant y el Biostan en la propagación *in vitro* del plátano macho (*Musa* sp. AAB). En: Memorias AGROTROP/2002, UNAH, 2002.

Recibido: 13 de diciembre de 2005

Aceptado: 15 de octubre de 2006

DIPLOMADOS

Precio: 2000 CUC

Uso y manejo de los biofertilizantes

Coordinador: Dr.C. Nicolás Medina Basso

Duración: 1 año

SOLICITAR INFORMACIÓN

Dr.C. Walfredo Torres de la Noval
Dirección de Educación, Servicios Informativos
y Relaciones Públicas
Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA)
Gaveta Postal 1, San José de las Lajas,
La Habana, Cuba. CP 32700
Telef: (53) (47) 86-3773
Fax: (53) (47) 86-3867
E.mail: posgrado@inca.edu.cu