

**Universidad de Costa Rica  
Facultad de Ciencias  
Escuela de Biología**

**Tesis para optar por el grado de Licenciatura en Biología  
con énfasis en Genética y Biotecnología**

Multiplicación de callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.) subespecie *indica*  
mediante un sistema de cultivo por inmersión temporal automatizado (RITA®)

**Laura Sánchez Cordero  
A24698**

**2012**

## **AGRADECIMIENTOS**

Primero que todo a Dios, por permitirme alcanzar mis metas y darme la fortaleza para no rendirme ante las adversidades.

A mis padres por brindarme todo su apoyo económico, moral y espiritual durante toda mi carrera profesional.

A mi directora de tesis Griselda Arrieta Espinoza, por todo su apoyo y colaboración para terminar exitosamente este proyecto.

A mis lectores Víctor Jiménez García y Laura Yesenia Solís Ramos, por la gran ayuda profesional que me brindaron durante todo el desarrollo de este proyecto.

A mi mejor amiga Gabriela Vargas Zeledón por su apoyo incondicional y los valiosos aportes que me brindó para la correcta elaboración de esta tesis.

A mis amigas Ana María Conejo Barboza, Raquel Romero Chaves y Ruth Castro Vásquez por su amistad y el gran apoyo que me brindaron durante todo este proyecto.

Esta tesis fue aceptada por la Comisión del Programa de Estudios de la Escuela de Biología de la Universidad de Costa Rica, como requisito parcial para optar por el grado de Licenciatura en Biología con énfasis en Genética y Biotecnología.

Directora de tesis

---

Griselda Arrieta Espinoza, M.Sc.

Miembro del Comité

---

Laura Yesenia Solís Ramos, Ph.D.

Miembro del Comité

---

Víctor Jiménez García, Ph.D.

Director Escuela de Biología

---

Dr. Gustavo Gutiérrez Espeleta

Sustentante

---

Bach. Laura Sánchez Cordero

## RESUMEN

Las ventajas que brindan los equipos de inmersión temporal para la propagación masiva de plantas, fundamentó su utilización en el presente estudio con la finalidad de determinar la efectividad del sistema de cultivo por inmersión temporal automatizado (RITA®) sobre la multiplicación de callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.) de la subespecie *indica*. Para ello, se indujo la formación de callos en medio semi-sólido a partir de embriones maduros de arroz de la variedad CR-5272. Se realizaron tres subcultivos para seleccionar las secciones embriogénicas de los callos y éstas se transfirieron a recipientes RITA® para su multiplicación. Para determinar la producción de biomasa de los callos embriogénicos de arroz en los recipientes de inmersión temporal se combinaron dos parámetros: número de inmersiones por día (2 ó 3) y duración de la inmersión (1, 2 ó 3 minutos). De esta forma se establecieron seis tratamientos. En cada tratamiento se incluyeron tres recipientes RITA® y se realizaron tres repeticiones. Además se colocaron callos embriogénicos en medio semi-sólido en placas petri como testigo. Se evaluó el incremento de biomasa de los callos embriogénicos multiplicados en los RITA® y en las placas petri (testigo) a las dos, cuatro y seis semanas por medio de la cuantificación de peso fresco y seco del material. Al finalizar la fase de multiplicación, se evaluó la regeneración de plántulas a partir de los callos multiplicados y su supervivencia en condiciones de invernadero.

Los resultados obtenidos en la investigación indican que a partir de las cuatro semanas de haber cultivado los callos embriogénicos de arroz en RITA®, se observan diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) en los incrementos de biomasa con respecto al número de inmersiones. Los callos expuestos a tres inmersiones por día mostraron un mayor incremento de biomasa (casi el triple) en comparación con los callos tratados con dos inmersiones. También la duración de la inmersión tuvo un efecto significativo sobre el incremento de biomasa de los callos. Una inmersión de dos minutos, mostró un incremento de biomasa tres veces mayor que el obtenido con tres minutos, y hasta diez veces mayor que el de un minuto de inmersión. El testigo en medio semi-sólido mostró incrementos de biomasa hasta 1000 veces menores a los obtenidos en los RITA®. En total se regeneraron 54 plántulas a partir de los callos multiplicados en los RITA® y ocho de ellas se desarrollaron completamente y llegaron a formar panícula en condiciones de invernadero.

# ÍNDICE GENERAL

<b>Agradecimientos.....</b>	<b>ii</b>
<b>Resumen.....</b>	<b>iv</b>
<b>Índice general.....</b>	<b>v</b>
<b>Índice de cuadros.....</b>	<b>vi</b>
<b>Índice de figuras.....</b>	<b>vii</b>
<b>Índice de anexos.....</b>	<b>viii</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>1</b>
<b>Justificación.....</b>	<b>3</b>
<b>Objetivos.....</b>	<b>4</b>
Objetivo general.....	4
Objetivos específicos.....	4
<b>Marco teórico.....</b>	<b>5</b>
Características del género <i>Oryza</i> .....	5
Origen y distribución del arroz.....	6
Situación mundial e importancia del arroz en Costa Rica.....	7
Biotecnología aplicada al mejoramiento genético.....	8
Sistema de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®).....	9
<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>12</b>
Localización experimental.....	12
Material vegetal.....	12
Desinfección de la semilla.....	12
Inducción de callo embriogénico.....	12
Selección de secciones embriogénicas en los callos.....	13
Multiplicación de callos embriogénicos en los RITA®.....	13
Regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA®...	14
Aclimatación de plántulas regeneradas en RITA®.....	15
<b>Resultados.....</b>	<b>17</b>
Inducción de callo y selección de secciones embriogénicas.....	17
Multiplicación de callos embriogénicos en RITA®.....	18
Regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA®...	25
Aclimatación de plántulas regeneradas en RITA®.....	26
<b>Discusión.....</b>	<b>28</b>
<b>Conclusiones.....</b>	<b>33</b>
<b>Recomendaciones.....</b>	<b>34</b>
<b>Literatura citada.....</b>	<b>35</b>
<b>Anexos.....</b>	<b>41</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Tratamientos aplicados para evaluar la multiplicación de los callos embriogénicos de arroz de la variedad CR-5272 en el sistema de inmersión temporal (RITA®).....	<b>14</b>
<b>Cuadro 2.</b> Peso seco promedio de los callos embriogénicos de arroz cultivados en RITA® y en medio semi-sólido a las dos, cuatro y seis semanas en función del número de inmersiones diarias.....	<b>19</b>
<b>Cuadro 3.</b> Peso seco promedio de los callos embriogénicos de arroz cultivados en RITA® y en medio semi-sólido a las dos, cuatro y seis semanas en función de la duración de las inmersiones diarias.....	<b>20</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Funcionamiento de un RITA®.....	<b>10</b>
<b>Figura 2.</b> Diagrama de flujo experimental desde el proceso de desinfección hasta la fase de regeneración en los RITA® y en el tratamiento testigo.....	<b>16</b>
<b>Figura 3.</b> Inducción de callos embriogénicos a partir de embriones maduros de arroz de la variedad CR-5272.....	<b>17</b>
<b>Figura 4.</b> Multiplicación de callos embriogénicos en RITA® tras dos semanas de cultivo, de acuerdo con los tratamientos de inmersión descritos en el Cuadro 1.....	<b>21</b>
<b>Figura 5.</b> Multiplicación de callos embriogénicos en RITA® tras cuatro semanas de cultivo, de acuerdo con los tratamientos de inmersión descritos en el Cuadro 1.....	<b>22</b>
<b>Figura 6.</b> Multiplicación de callos embriogénicos en RITA® tras seis semanas de cultivo, de acuerdo con los tratamientos de inmersión descritos en el Cuadro 1.....	<b>23</b>
<b>Figura 7.</b> Crecimiento de los callos embriogénicos de arroz colocados en medio MSTP como testigo.....	<b>24</b>
<b>Figura 8.</b> Proceso de regeneración de plántulas de arroz de la variedad CR-5272, a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA® provenientes del tratamiento 2I-2.....	<b>25</b>
<b>Figura 9.</b> Secciones de color verde de los callos embriogénicos del testigo, tras un mes en el proceso de regeneración.....	<b>26</b>
<b>Figura 10.</b> Proceso de aclimatación de plantas de arroz de la variedad CR-5272, regeneradas a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA®.....	<b>27</b>

## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1.</b> Implementación del proceso de multiplicación en RITA® de callos de arroz en la transformación genética.....	<b>42</b>
<b>Anexo 2.</b> Análisis de varianza (ANOVA) factorial para determinar el efecto del número de inmersiones diarias sobre el peso seco promedio de los callos embriogénicos en el RITA® a las dos, cuatro y seis semanas comparado con el testigo.....	<b>43</b>
<b>Anexo 3.</b> Análisis de varianza (ANOVA) factorial para determinar el efecto de la duración de las inmersiones por día sobre el peso seco promedio de los callos embriogénicos en el RITA® a las dos, cuatro y seis semanas comparado con el testigo.....	<b>44</b>

## INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) constituye uno de los principales alimentos para la mayoría de los habitantes del mundo, ya que provee más de la mitad del alimento diario a la tercera parte de la población mundial (Ronald 1997). En el continente asiático donde se encuentra el 58% de esa población, se consume más del 90% de todo el arroz producido en el mundo (Martínez y Tohm 1997). Costa Rica no es la excepción, por cuanto este cereal forma parte de la canasta básica de la alimentación con un consumo *per capita* anual de aproximadamente 50,98 kg (CONARROZ 2010). Debido a la importancia económica y social de este cultivo, se hace necesario implementar nuevas tecnologías para su producción y que satisfagan la competitividad y sostenibilidad de los sistemas productivos (Tanksley y McCouch 1997).

El mejoramiento genético del arroz, se ha enfocado en contrarrestar los efectos negativos causados por diferentes factores bióticos y abióticos que provocan la disminución de los rendimientos productivos. Para ello, se han implementado programas que incluyen las técnicas convencionales basadas en la utilización de germoplasma silvestre y la biotecnología por medio de la ingeniería genética. Esta última ha permitido la incorporación de genes que confieren rasgos tales como altas cantidades de  $\beta$ -caroteno (provitamina A) en el arroz dorado (Ye *et al.* 2000, Hoa *et al.* 2003), resistencia a insectos como el barrenador del arroz (Wang *et al.* 2002, Chen *et al.* 2006), resistencia a virus como el de la hoja blanca (Lentini *et al.* 2003) y resistencia a herbicidas (Cao *et al.* 1992), entre otros.

Ahora bien, el cultivo de tejidos es el punto de partida esencial para producir los explantes que permitirán la modificación del arroz y la obtención de las plantas transgénicas. Para ello, se requiere inicialmente de una fase de inducción de embriogénesis somática indirecta, seguida de una fase de regeneración de plantas (Pérez *et al.* 2007). De acuerdo con los estudios anatómicos e histológicos realizados por Vega *et al.* (2009), los callos de arroz se originan a partir del epitelio escutelar de embriones cigóticos maduros y al crecer la capa de células epiteliales en un medio MS (Murashige y Skoog 1962) suplementado con 2,5 mg/L de 2,4-D (ácido 2,4-diclorofenoxiacético), se presentan agrupaciones de células embriogénicas en las zonas periféricas, que posteriormente formarán proembriones y embriones somáticos.

Sin embargo, una limitante que se ha observado en la inducción de callos embriogénicos de arroz en medio semi-sólido, es que dicho proceso requiere una gran cantidad de tiempo (varios meses) y que además los porcentajes de regeneración de plantas que se han obtenido no superan el 50% (Valdez *et al.* 1996, Meneses *et al.* 2005). La utilización de equipos basados en la inmersión temporal de los explantes en medio líquido podría ser una alternativa para mejorar el proceso en el cultivo *in vitro* de arroz, ya que en este tipo de sistemas se da un contacto intermitente entre el material vegetal y el medio líquido, permitiendo así un mejor crecimiento y una mayor tasa de proliferación en comparación con el contacto permanente de una parte del explante que se da en medio semi-sólido (Lorenzo *et al.* 1998, Hempfling y Preil 2005).

Los Recipientes de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®, por sus siglas en francés), desarrollados por Alvard y Teisson (1993), han permitido la propagación masiva *in vitro* de una gran cantidad de plantas tales como café (Etienne-Barry *et al.* 1999), jícara (Murch *et al.* 2004), fresa (Hanhineva *et al.* 2005) y ñame (Salazar y Hoyos 2007). En el caso del arroz, estos recipientes se han utilizado en varias investigaciones para la regeneración de plantas a partir de callos embriogénicos (Chan 2001) y la multiplicación de callos producidos a partir de anteras (Quintero 2003, Quintero *et al.* 2004). Los equipos de inmersión temporal que utilizan medio líquido para la propagación masiva de plantas (Lorenzo *et al.* 1998; Hempfling y Preil 2005) podrían utilizarse para la multiplicación de los callos embriogénicos de arroz en el proceso de transformación genética del arroz.

## JUSTIFICACIÓN

Entre las técnicas de cultivo *in vitro*, la embriogénesis somática se presenta como una herramienta muy valiosa para la multiplicación de tejido vegetal. En arroz, generalmente se utiliza la embriogénesis somática indirecta para la formación de proembriones, ya que en esta especie se pueden obtener callos de tipo embriogénico al colocar los embriones maduros en un medio de cultivo suplementado con 2,4-D (Vega 1999). En la mayoría de las investigaciones realizadas en arroz, se requiere una cantidad sustancial de callos para poder llevar a cabo, ya sea la propagación masiva de plantas o la transformación genética, entre otros. Sin embargo, la multiplicación de los callos se realiza en medio semi-sólido y esto requiere un período de varios meses para obtener una cantidad considerable de material. Además al haber un contacto permanente con el explante, se deben realizar subcultivos constantes por el crecimiento de los callos y el agotamiento de los nutrientes del medio. Esto demanda una gran inversión en mano de obra y cantidad de reactivos.

Por las razones anteriores, se considera que la utilización de un sistema de cultivo por inmersión temporal (RITA®) facilitaría la multiplicación de callos embriogénicos de arroz y reduciría el tiempo invertido en esta fase con respecto al medio semi-sólido. Además, el uso de los RITA® podría ser muy ventajoso para multiplicar tejido transformado genéticamente por técnicas de ingeniería genética como por ejemplo la biobalística (Anexo 1). La presente investigación plantea como hipótesis de trabajo que los callos embriogénicos derivados de embriones maduros de arroz cultivados en el sistema RITA®, presenten un mayor incremento de biomasa en comparación con aquellos cultivados en el medio semi-sólido. Este planteamiento se estudiará a través de la ejecución de los siguientes objetivos general y específicos.

# OBJETIVOS

## Objetivo General

Determinar la efectividad del sistema de cultivo por inmersión temporal automatizado (RITA®) para la multiplicación de callos embriogénicos de arroz (*Oryza sativa* L.) de la subespecie *indica*.

## Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de la frecuencia y tiempo de inmersión en medio líquido sobre la multiplicación de callos embriogénicos de arroz en el sistema RITA®.
2. Comparar la producción de biomasa de callos embriogénicos de arroz producidos en RITA® con aquellos generados en medio de cultivo semi-sólido.
3. Determinar la capacidad de la reconversión de plántulas de los callos embriogénicos de arroz multiplicados en RITA® y en medio de cultivo semi-sólido.

## MARCO TEÓRICO

### Características del género *Oryza*

El género *Oryza* (Poaceae) comprende aproximadamente 23 especies conocidas distribuidas en las regiones tropicales y subtropicales del mundo, siendo *O. sativa* L. y *O. glaberrima* Steud. las únicas dos especies de arroz cultivadas (Vaughan 1994). La primera es de origen asiático y se cultiva ampliamente en regiones tropicales y subtropicales (Arnao *et al.* 2007), mientras que *O. glaberrima* se originó en África Occidental y sólo se cultiva en esa región y en unas pocas áreas de América del Sur (León 2000, Hancock 2004).

Según Ge *et al.* (1999), en las especies del género *Oryza* existen diez tipos de genomas entre diploides y tetraploides (A, B, BC, C, CD, E, F, G, HJ, HK). En América Latina, se han reportado cuatro especies silvestres de las cuales una es diploide con genoma A (*O. glumaepatula*) y tres tetraploides con genoma CD (*O. alta*, *O. latifolia* y *O. grandiglumis*), de las que se han aprovechado características de resistencia (Multani *et al.* 2003). Con la ayuda de marcadores moleculares, se han realizado estudios de diversidad genética y de estructura poblacional en especies silvestres como *O. glumaepatula* (Akimoto *et al.* 1998), comparaciones de secuencias polimórficas entre *O. sativa* y *O. rufipogon* (Sun *et al.* 2001) e identificación de secuencias específicas para grupos genómicos determinados (Kiefer-Meyer *et al.* 1995).

De acuerdo a las características morfológicas y el genoma de las especies de *Oryza*, se les incluye en cuatro complejos: *O. sativa*, *O. officinalis*, *O. ridleyi* y *O. meyeriana*. El complejo *O. sativa* ha sido subdividido a su vez en tres subespecies de acuerdo a su morfología y a marcadores moleculares: *indica*, *japonica* y la subespecie *japonica* tropical que se conoce como *javanica* (Vaughan 1994). La subespecie *indica* usualmente tiene hojas verde claro, granos delgados, espiguillas carentes de arista y presenta muchos brotes. Por su parte, la *japonica* presenta hojas verde oscuro, granos redondos y pubescentes, y pocos brotes; mientras que la subespecie *javanica* tiene por lo general granos largos y redondos, espiguillas pubescentes y con arista, y presenta pocos brotes (León 1987).

En Costa Rica la mayoría de las variedades de arroz que se cultivan pertenecen al grupo *indica* (Monge 1989). Al final de los años sesenta, en el país se introdujo la variedad IR-8 de porte bajo, buen macollamiento y alto rendimiento. Esta variedad llegó a revolucionar la producción arrocería del país obligando a los agricultores a modificar las prácticas y tecnología utilizadas hasta ese momento en la explotación del cultivo. En los años siguientes se introdujeron otras variedades y ya en el año 1973 el Programa de Investigación del Ministerio de Agricultura y Ganadería (MAG) proporciona variedades de gran importancia comercial como por ejemplo la CR-5272 (Charpantier 1988).

La variedad CR-5272 posee hojas erectas, es de porte bajo, tiene resistencia al acame y su macollamiento es moderado. La floración ocurre entre 80 y 85 días después de la siembra y llega a la cosecha entre 110 y 115 días. Su potencial de producción oscila entre 5,5 a 6 TM/Ha y el grano tiene una excelente calidad molinera (CONITTA 1991; Vega 1999). Sin embargo, es susceptible a patógenos como el hongo picularia (*Magnaporthe grisea*), el virus de la hoja blanca (RHBV), el añudo de la vaina del arroz (*Rhizoctonia solani*), *Helminthosporium* y el ácaro *Rynchosporium* (Charpantier 1988).

## **Origen y distribución del arroz**

El arroz, uno de los cultivos más antiguos del mundo, fue domesticado desde hace unos 10.000 años (Watanabe 1997) y es originario del sudeste de Asia. De ahí fue llevado a China, luego a Persia, Mesopotamia, Arabia y Turquía, así los árabes lo introdujeron posteriormente en Siria, Egipto y Norte de África; de ahí pasó a España y Portugal y en el siglo XVII los holandeses y portugueses lo introdujeron en América, también a Australia y las Islas del Pacífico (Monge 1989). En América Latina, el arroz cultivado fue introducido durante el período de conquista y debido a la dominación de la cultura Ibérica, su consumo se generalizó en muchos países principalmente en Centro y Sur América (Cabezas y Espinoza 2000).

Desde su domesticación, el arroz se ha seleccionado para crecer en diferentes condiciones según su sitio de cultivo. Es una de las plantas más adaptables a diversas condiciones ambientales por lo que se cultiva en casi todas las partes del mundo, desde el nivel del mar hasta los 2500

metros de altitud, y es casi la única planta domesticada que se desarrolla en forma óptima en terrenos inundados (Parsons 1982, Tascón y García 1985). Las necesidades de radiación solar en el cultivo del arroz varían según sean las fases de crecimiento, de esta manera bajas intensidades lumínicas en la fase reproductiva y de maduración, causan pérdidas de rendimiento por disminución del número de granos y un menor porcentaje de granos llenos. En las condiciones de los países tropicales, el cultivo se cosecha adecuadamente con radiaciones entre 250 a 350 cal / cm<sup>2</sup> / día (Vargas 1991).

## **Situación mundial e importancia del arroz en Costa Rica**

Este cereal constituye uno de los principales productos agrícolas a nivel mundial, ya que es el segundo alimento más consumido después del trigo. En el continente asiático se producen anualmente 570 millones de toneladas métricas, mientras que en América Latina y el Caribe se producen por año más de 22 millones de toneladas métricas (FAO 2004). El 72% de la producción se concentra en cinco países productores: China (33%), India (22%), Vietnam (4%) y Tailandia (4%). Los Estados Unidos de América, aportan el 2% de la producción mundial. El principal país exportador es Tailandia, con una producción de 6,6 millones de toneladas de arroz pilado al año; le siguen en orden de importancia Vietnam con 4 millones, China con 3 millones, EE.UU. con 2,8 millones, Pakistán con 2 millones e India con 1,8 millones de toneladas de arroz pilado (CNP 2001).

De acuerdo con los informes presentados por la FAO, en el 2010 la producción mundial de arroz se estima en 697,9 millones de toneladas (465,4 millones de toneladas de arroz elaborado), lo cual supera en un 2% a la producción del año 2009. En Asia la producción total de arroz alcanza los 631,4 millones de toneladas, superando en un 3% los resultados del 2009; mientras que en África la producción arrocera fue de 24,6 millones de toneladas, un 1% más que el año anterior. Por su parte, en América Latina y el Caribe la producción se estimó en 26,5 millones de toneladas, debido en gran parte a Brasil (Méndez 2010).

En Costa Rica la actividad arrocera tiene una importancia significativa para el sector agropecuario, ya que el arroz constituye un alimento básico en la dieta de la población (Cordero 1993). Según las estadísticas arroceras del CONARROZ (2010), en el país se siembran 66 mil hectáreas de arroz que corresponden a un rendimiento promedio de 3,78 toneladas métricas por hectárea y un consumo *per capita* anual de aproximadamente 50,98 kg. En Costa Rica el arroz se puede cultivar desde el nivel del mar hasta 850 msnm, en los lugares donde existan condiciones topográficas y de suelo adecuadas. Las regiones arroceras de Costa Rica incluyen la Brunca, Huetar Atlántica, Pacífico Central, Huetar Norte (Los Chiles, Guatuso y Upala) y Chorotega (Cañas, Bagaces, Tamarindo, entre otros) (CONARROZ 2004).

## **Biotecnología aplicada al mejoramiento genético**

La ingeniería genética de plantas permite la transferencia de genes específicos a células vegetales. Por medio de esta técnica biotecnológica se pueden introducir genes de otras especies vegetales, de animales o de microorganismos a las plantas transgénicas, y conferirles características deseables como tolerancia a herbicidas, sequía, así como resistencia a patógenos bacterianos y hongos (Dale y von Schantz 2002). La transformación de plantas es un proceso interdisciplinario que requiere de la implementación de diferentes técnicas y protocolos: cultivo de tejidos *in vitro* para la producción de células blanco y regeneración de plantas transformadas, biología molecular para la clonación de los genes de interés y el análisis de las plantas transformadas y métodos para la introducción de los genes en las células blanco (Medina *et al.* 2001).

En el caso del mejoramiento de arroz por medio de ingeniería genética, la embriogénesis somática se utiliza para producir el tejido que se modificará. La embriogénesis somática es un proceso de diferenciación de células somáticas para la producción de embriones, sin que medie la fusión de gametos (von Arnold 2008). La producción de embriones somáticos puede darse de forma directa o indirecta. En la primera se forma un embrión asexual a partir de una célula individual, de un grupo de células o de una porción del explante, sin que ocurra una fase de callo. En la indirecta se da la proliferación de callo para la formación de proembriones, lo cual generalmente se logra en un medio de cultivo con alta concentración de auxinas. Los embriones

somáticos son estructuras bipolares con un extremo radical y uno apical, no poseen conexión vascular con el tejido materno y son capaces de crecer y formar una planta completa (Gahan y George 2008).

En un estudio realizado por Valdez *et al.* (1996) con diferentes cultivares de arroz tipo *indica* costarricenses (CR-201, CR-1113, CR-1707, CR-1821, CR-5272, CR-8334, CR-8341), se obtuvieron plántulas a partir de callos embriogénicos de siete meses de edad originados de embriones cigóticos maduros. Se determinó que la mejor combinación de medios para la formación de plantas fue: MS + 2,5 mg/L de 2,4-D para callogénesis y MS + 0,5 mg/L de bencilamino purina (BAP) + 0,05 mg/L de ácido naftalenacético (ANA) para regeneración. Se obtuvieron frecuencias de callos morfogénicos de entre 10 y 47%, en donde los cultivares CR-1113 y CR-5272 produjeron los mayores porcentajes (22,7% y 46,9%, respectivamente). Sin embargo, las tasas de formación de callo no mostraron relación con su capacidad morfogénica, ya que los genotipos que presentaron las frecuencias más altas para inducción de callos, regeneraron muy pocas o ninguna planta después de 12 semanas de cultivo: 12 plantas para CR-1113 y 51 para CR-5272 a partir de 100 callos.

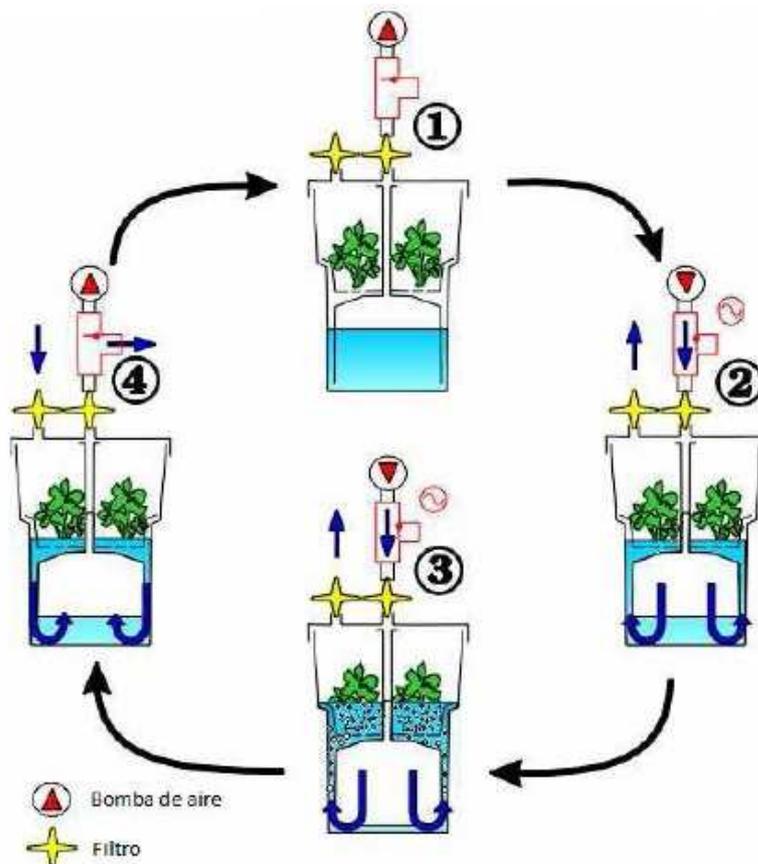
Por otra parte, Meneses *et al.* (2005) determinaron el efecto de combinar varias concentraciones de 2,4-D y el agente gelificante Phytigel sobre la inducción de callos embriogénicos en la variedad CR-5272 y su posterior regeneración. Se obtuvo un 35% de callogénesis al utilizar el medio de cultivo MS semi-sólido suplementado con 1,5 mg/L de 2,4-D + 2,4 g/L de Phytigel, en comparación con el 24% obtenido en el testigo (MS suplementado con 2 mg/L de 2,4-D y 3 g/L de Phytigel).

### **Sistema de Inmersión Temporal Automatizada (RITA®)**

Durante el proceso de automatización de los sistemas para la micropropagación de plantas, Alvard y Teisson (1993) diseñaron un recipiente conocido comercialmente como RITA®. Estos recipientes se componen de dos compartimentos, uno superior que contiene los explantes sobre una esponja de poliuretano y otro inferior que contiene el medio de cultivo líquido. El sistema permite una fase de inmersión que se logra con la inyección de aire estéril por

un compresor, para así permitir el ascenso del medio de cultivo y que los explantes queden en contacto con el mismo. Una vez que cesa el flujo de aire, las presiones se equilibran y el medio retorna por gravedad a la parte inferior del recipiente (Teisson *et al.* 1996) (Figura 1).

La frecuencia y duración de la inmersión se programa mediante un reloj automático que controla la inyección del aire estéril a través del compresor, lo que permite la automatización del sistema y determina la eficiencia en la utilización de los RITA® (Etienne *et al.* 1997). Las ventajas que ofrece dicho sistema incluyen: una inmersión por un período corto de tiempo, oxigenación del medio y de los explantes, permanencia por capilaridad de una fina película de medio en la esponja de poliuretano para hidratación de los explantes, entre otros (González 2003).



**Figura 1.** Funcionamiento de un RITA®: 1) Período de reposo. 2) Aplicación de presión, el medio líquido sube. 3) Período de inmersión, la atmósfera dentro de los frascos se renueva. 4) Se detiene la presión, el medio regresa al compartimento de abajo. Tomado de CIRAD (2001).

En un estudio realizado por Chan (2001), se evaluó el efecto de la utilización del RITA® en el proceso de regeneración de plantas *in vitro* a partir de callos embriogénicos de arroz. Se determinó que una inmersión cada 12 horas durante dos minutos permitía una exposición adecuada de los explantes al medio, obteniéndose así una alta frecuencia de brotes y la regeneración de 145 plantas *in vitro* en promedio al utilizar el medio MS suplementado con 0,5 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA. Asimismo, Díaz (2002) mediante la utilización del RITA® obtuvo un porcentaje de regeneración de plántulas de arroz del 30,6% al seleccionar las secciones embriogénicas de los callos y utilizar una fase previa de deshidratación en un medio semi-sólido de pre-regeneración (MS suplementado con 0,5 mg/L de BAP, 0,05 mg/L de ANA, 30 g/L de maltosa y 6 g/L de Phytigel; con un pH de 5.8).

Posteriormente, Quintero (2003) y Quintero *et al.* (2004) mediante el uso del RITA® obtuvieron una mayor proporción de callos embriogénicos de arroz (95%) a partir de anteras de las subespecies *indica* y *japonica*, con respecto al medio semi-sólido (45%). Los investigadores indican que la inducción más alta de callos se obtuvo con inmersiones de un minuto cada 6 horas. Sin embargo, el arroz *japonica* mostró cerca de siete veces mayor inducción de callos al compararlo con las variedades *indica*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Localización experimental**

La presente investigación se llevó a cabo en el Centro de Investigación en Biología Celular y Molecular de la Universidad de Costa Rica.

### **Material vegetal**

Se utilizó la variedad de arroz CR-5272 donada por el Centro para Investigaciones en Granos y Semillas (CIGRAS-UCR).

### **Desinfección de la semilla**

Se pesaron 20 g de semillas de arroz descascarado y se desinfectaron dos veces con el procedimiento descrito a continuación: agitación a 140 rpm por 20 minutos en 75 mL de cloro comercial (NaOCl 3.5% i.a.) más 10 gotas de Tween 20 (Sigma) en un agitador orbital horizontal (Hottech, modelo 722) y cuatro lavados con agua destilada estéril dentro de una cámara de flujo laminar.

### **Inducción de callo embriogénico**

Posterior al proceso de desinfección, se eliminó el exceso de agua de las semillas colocándolas sobre papel filtro esterilizado. Se inocularon 12 semillas por placa de Petri en medio de callogénesis denominado como MSTP (MS suplementado con 36,7 mg/L de la sal férrica del ácido etilendiaminotetraacético (Fe-EDTA), 2 mg/L de 2,4-D, 50 mg/L de triptofano, 500 mg/L de prolina, 30 g/L de maltosa, pH de 5,8 y 3 g/L de Phytigel). Estos se mantuvieron en oscuridad total por dos semanas. Al cumplirse dicho período, se eliminó la radícula de las semillas para estimular la formación de callo y los callos producidos se transfirieron a medio fresco y permanecieron en oscuridad por dos semanas más de acuerdo con el protocolo descrito por Vega *et al.* (2009). Cabe destacar que se evaluó el porcentaje de formación de callo por placa de petri.

### **Selección de secciones embriogénicas en los callos**

Se realizaron tres subcultivos (uno cada dos semanas) para seleccionar el tejido embriogénico en los callos con la ayuda de un estereoscopio (Optima, modelo ZM-160AT). Se distinguieron las secciones que presentaban características propias de callos embriogénicos de arroz, como son: apariencia globular y compacta, poca friabilidad y color amarillento (Vega *et al.* 2009). En cada subcultivo, los callos seleccionados según estos criterios se colocaron en medio de callogénesis MSTP y se mantuvieron en oscuridad total durante dos semanas.

### **Multipliación de callos embriogénicos en los RITA®**

Tras haber realizado el tercer subcultivo en medio MSTP, se tomaron 500 mg de peso fresco de los callos embriogénicos y se transfirieron a los RITA® que contenían cada uno 200 mL de medio de callogénesis líquido (MSTP). El sistema de recipientes RITA® estaba conectado a un reloj automático, en el cual se programaron 2 o 3 inyecciones de aire que correspondían al número de inmersiones del tejido en el medio líquido por día y que se realizaron cada 12 u 8 horas, respectivamente. Además, con respecto a la duración de la inmersión, se programaron tres tiempos de acuerdo con las posibilidades del sistema: 1, 2 o 3 minutos. Para determinar la producción de biomasa se combinaron estos dos parámetros: número de inmersiones por día y duración de la inmersión. De esta forma se establecieron seis tratamientos que se describen en detalle el Cuadro 1. Cabe destacar, que también se colocaron 500 mg de peso fresco de los callos embriogénicos en MSTP semi-sólido, para así establecer un tratamiento testigo. Durante el proceso de multiplicación, tanto el testigo como los RITA®, se mantuvieron en oscuridad total y no se les realizaron subcultivos (Figura 2).

**Cuadro 1.** Tratamientos aplicados para evaluar la multiplicación de los callos embriogénicos de arroz de la variedad CR-5272 en el sistema de inmersión temporal (RITA®)

Número de inmersiones por día (I)	Duración de la inmersión en el medio de cultivo		
	1 min	2 min	3 min
<b>2I</b> (una inmersión cada 12 hrs)	2I-1	2I-2	2I-3
<b>3I</b> (una inmersión cada 8 hrs)	3I-1	3I-2	3I-3

En cada uno de los tratamientos se incluyeron tres recipientes RITA® y con la finalidad de evaluar la repetitividad de los resultados en el tiempo, se realizaron tres repeticiones de cada tratamiento espaciadas por seis semanas. Se utilizaron 18 recipientes RITA® en cada repetición, para un total de 54 RITA® en todo el experimento. Se evaluó el incremento de biomasa de los callos embriogénicos a las dos, cuatro y seis semanas después de la inoculación inicial de 500 mg de callos en los RITA®. Para ello, se determinó el peso fresco y seco de los callos producidos en uno de los tres recipientes escogido al azar por tratamiento. El peso de los callos en los tratamientos y en el testigo fue determinado en una balanza analítica (Ohaus Adventurer). Finalmente, los datos fueron analizados estadísticamente con un análisis de varianza (ANOVA) factorial en el programa JMP® 7.0 (SAS Institute Inc., EUA) y posteriormente se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey para determinar las diferencias significativas entre los tratamientos.

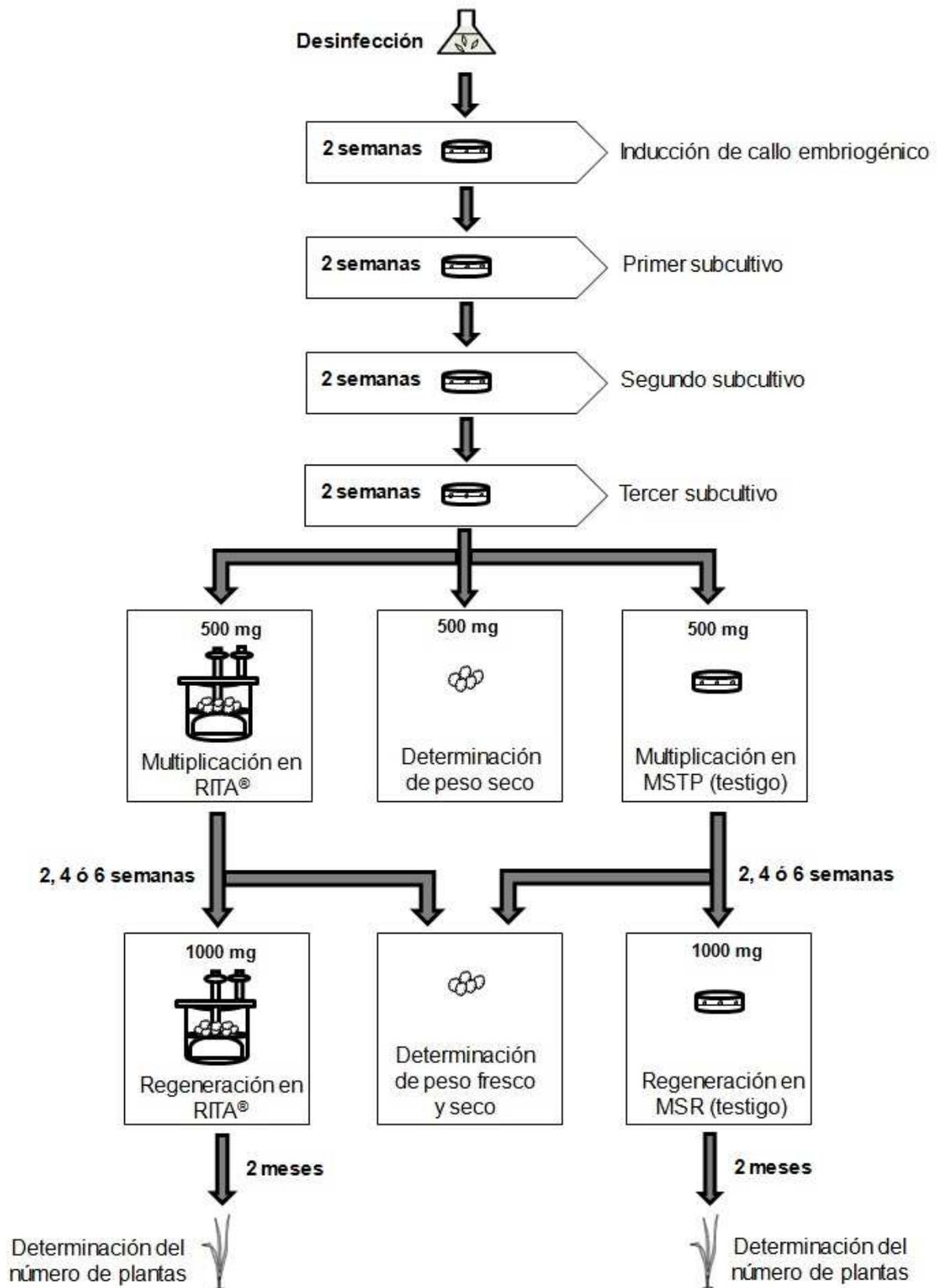
### **Regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA®**

Una vez que los callos embriogénicos alcanzaron un tiempo determinado en la fase de multiplicación (2, 4 y 6 semanas), se tomó una sub-muestra de 1000 mg en peso fresco y se transfirió a un RITA® que contenía 200 mL de medio de regeneración denominado como MSR (MS suplementado con 5 ml/L de Fe-EDTA, 0,625 mg/L de BAP, 0,05 mg/L de ANA, 30 g/L de

maltosa y pH de 5,8) de acuerdo con el protocolo descrito por Chan (2001). Los RITA® se mantuvieron durante dos meses en la fase de regeneración, en un tratamiento de dos inmersiones al día con una duración de dos minutos. También se colocaron 1000 mg de peso fresco de los callos embriogénicos en medio MSR sólido, para establecer el tratamiento testigo. Durante el proceso de regeneración, el testigo y los RITA® se mantuvieron con un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad, y no se les realizaron subcultivos. Al cumplirse los dos meses, se cuantificó la cantidad de plántulas producidas a partir de los 1000 mg de callos embriogénicos (Figura 2).

### **Aclimatación de plántulas regeneradas en RITA®**

Las plántulas regeneradas en RITA® se colocaron en recipientes con agua, que se mantuvieron en una caja plástica con papel toalla humedecido en el fondo y se sellaron con plástico adhesivo, para así establecer una cámara húmeda. Luego de una semana en luz directa, se hicieron agujeros pequeños en el plástico y a la semana siguiente agujeros más grandes, esto con el fin de que las plántulas sufrieran un proceso de aclimatación gradual. Posteriormente, las plántulas se colocaron durante un mes en almácigos con sustrato de turba para estimular la producción de raíces nuevas y finalmente se transfirieron a potes con suelo más fibra de coco (proporción 3:1) en el invernadero. El proceso de aclimatación se consideró exitoso, si la sobrevivencia de la plántula superaba un mes.

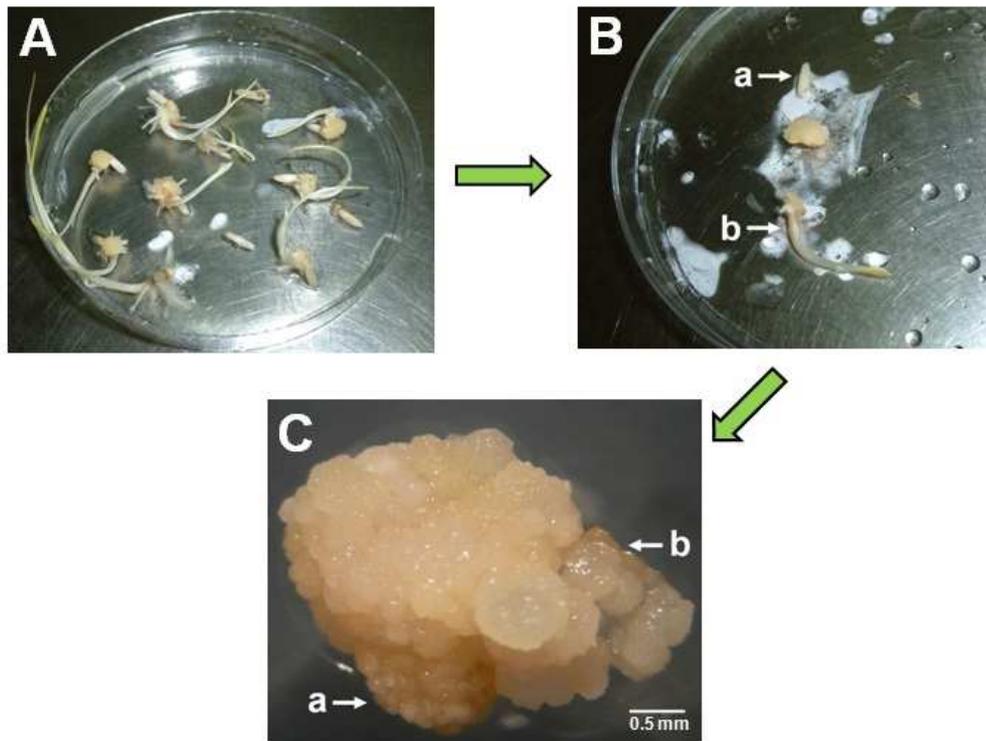


**Figura 2.** Diagrama de flujo experimental desde el proceso de desinfección hasta la fase de regeneración en los RITA® y en el tratamiento testigo.

## RESULTADOS

### Inducción de callo y selección de secciones embriogénicas

El porcentaje de formación de callo a partir de los 20 g de semillas de arroz sembradas en cada repetición, fue aproximadamente del 80% en cada placa tras las dos primeras semanas de cultivo (Figura 3A). Después del proceso de inducción de callo, se eliminó la radícula y el endospermo, para así subcultivar sólo los callos formados en medio fresco para su crecimiento (Figura 3B). Después de dos semanas de cultivo en el medio de callogénesis (MSTP), se seleccionaron las partes embriogénicas en los callos y se eliminaron las no embriogénicas. El proceso de selección de las partes embriogénicas de los callos se realizó tres veces en medio semi-sólido, antes de su inoculación en los RITA®. Las secciones embriogénicas, presentaron apariencia globular y compacta, poca friabilidad y color amarillento (Figura 3C).



**Figura 3.** Inducción de callos embriogénicos a partir de embriones maduros de arroz de la variedad CR-5272. **A)** Callos formados a partir de semilla a las dos semanas en medio de callogénesis MSTP. **B)** Eliminación del endospermo (a) y de la radícula (b). **C)** Distinción de secciones embriogénicas (a) y no embriogénicas (b) en los callos de arroz.

## **Multiplicación de callos embriogénicos en RITA®**

En el proceso de multiplicación de los callos embriogénicos en los RITA®, los incrementos de biomasa obtenidos en cada tratamiento se calcularon restándole al peso seco promedio la cantidad de biomasa que se había colocado inicialmente en el RITA® (500 mg en peso fresco se determinó que equivalían a 60 mg en peso seco). Cabe destacar que tanto para el peso fresco así como para el peso seco, el resultado obtenido en el incremento de biomasa de los callos embriogénicos de arroz fue muy similar en los tres períodos evaluados, por lo cual a continuación se presentan sólo los resultados del peso seco.

A las dos semanas de haber colocado los callos embriogénicos en RITA®, no se observaron diferencias significativas en el incremento de biomasa con respecto al número de inmersiones por día ( $p > 0.05$ , Anexo 2). En el tratamiento con tres inmersiones diarias se obtuvo un peso seco promedio de  $838 \pm 174$  mg, que corresponde a un incremento de 778 mg en comparación con el peso inicial de 60 mg. Mientras que con dos inmersiones al día se obtuvo un peso de  $324 \pm 174$  mg y un incremento de biomasa de 264 mg. En el testigo se obtuvo un peso seco promedio de  $98 \pm 176$  mg, lo cual representa sólo un incremento de 38 mg tras dos semanas de cultivo (Cuadro 2).

Sin embargo, a partir de las cuatro semanas de cultivo sí se observaron diferencias significativas ( $p < 0.05$ , Anexo 2) en la multiplicación de los callos embriogénicos, ya que los callos expuestos a tres inmersiones por día siempre mostraron un mayor incremento de biomasa, en comparación con los callos tratados con dos inmersiones y con el testigo en el cual se obtuvo un incremento de sólo 64 mg (Cuadro 2). Los callos embriogénicos sometidos a tres inmersiones por día, a las cuatro semanas de cultivo mostraron un incremento de biomasa de 838 mg (peso seco promedio de  $898 \pm 135$  mg), mientras que en los callos expuestos a dos inmersiones se cuantificó un incremento de sólo 425 mg de tejido con un peso de  $485 \pm 135$  mg (Cuadro 2). Un resultado similar se observó a las seis semanas, en donde los callos expuestos a tres inmersiones por día mostraron un peso seco promedio de  $1503 \pm 220$  mg con un incremento de biomasa de 1443 mg y en los callos que fueron sometidos a dos inmersiones al día se obtuvo un peso de  $802 \pm 220$  mg que corresponde a un incremento de biomasa de sólo 742 mg.

**Cuadro 2.** Peso seco promedio de los callos embriogénicos de arroz cultivados en RITA® y en medio semi-sólido a las dos, cuatro y seis semanas en función del número de inmersiones diarias.

Período	Peso (mg)					
	Testigo	Error estándar	2I	Error estándar	3I	Error estándar
2 sem	98 a	301	324 a	174	838 a	174
4 sem*	124 B	233	485 AB	135	898 A	135
6 sem*	204 b	381	802 ab	220	1503 a	220

\*Probabilidades estadísticamente significativas por ser menores de 0,05. Los valores representados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

Por otro lado, al evaluar el efecto de la duración de la inmersión sobre el incremento de la biomasa, se observaron diferencias significativas en los tres períodos que se evaluaron ( $p < 0.05$ , Anexo 3). Los callos expuestos a una inmersión de dos minutos siempre mostraron un mayor incremento de biomasa, en comparación con los callos tratados con un minuto de inmersión. A las dos semanas de cultivo, los callos que se sometieron a dos minutos de inmersión mostraron un incremento de biomasa de 1067 mg ( $1127 \pm 176$  mg). Mientras que con tres minutos de inmersión el incremento obtenido fue de 389 mg ( $449 \pm 176$  mg) y con un minuto fue sólo de 106 mg ( $166 \pm 176$  mg). En el testigo en medio semi-sólido, se obtuvo un peso seco promedio de  $98 \pm 176$  mg, lo cual representa sólo un incremento de 38 mg tras dos semanas de cultivo (Cuadro 3).

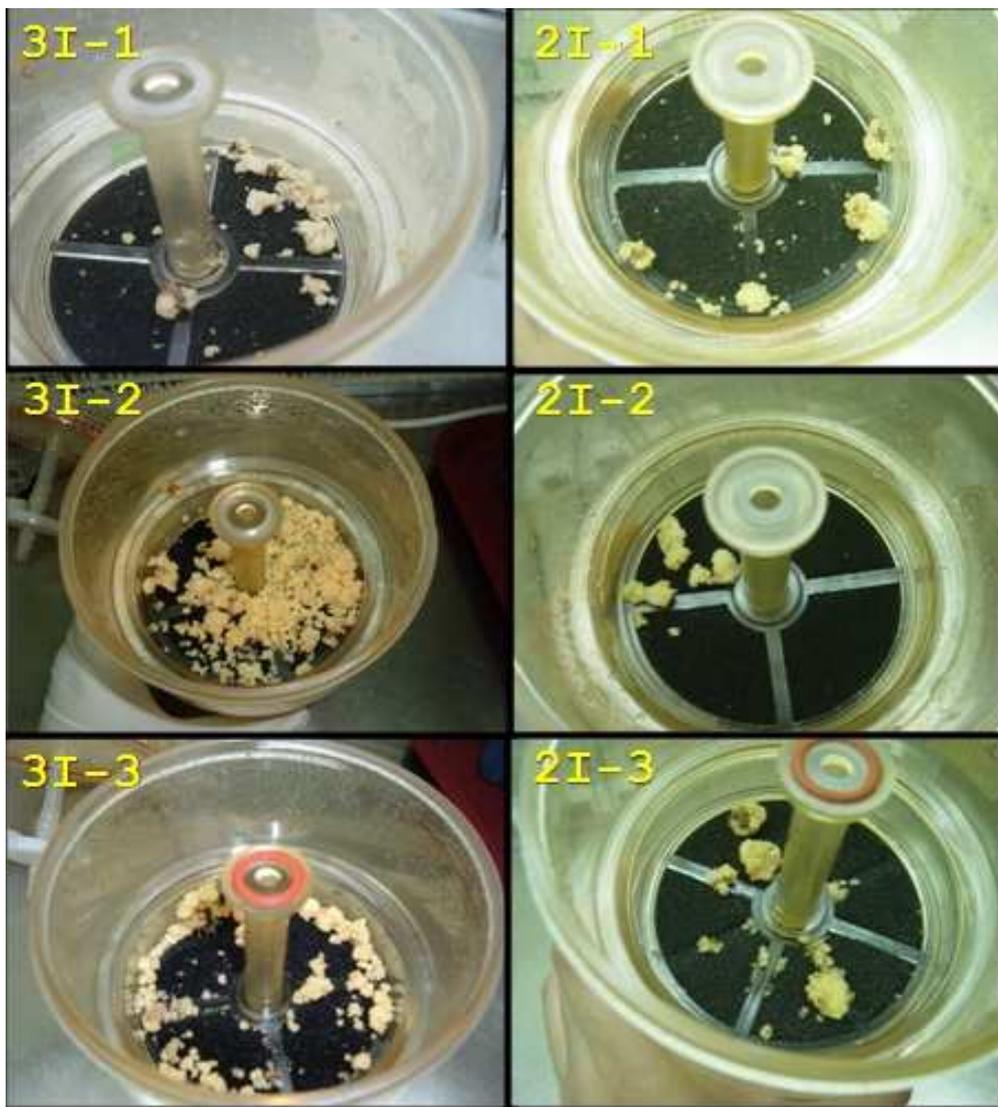
Asimismo, a las cuatro semanas una inmersión de dos minutos produjo en los callos un incremento de biomasa de 1025 mg con un peso seco promedio de  $1085 \pm 144$  mg y una de tres minutos permitió obtener un incremento de 557 mg ( $617 \pm 144$  mg). Mientras que la inmersión de un minuto sólo incrementó la biomasa de los callos en 313 mg ( $373 \pm 144$  mg). Por su parte, en el tratamiento testigo en medio semi-sólido, se obtuvo un peso seco promedio de  $124 \pm 144$  mg que corresponde a un incremento de sólo 64 mg (Cuadro 3). De igual forma, a las seis semanas de cultivo se observó un incremento de 1686 mg con una inmersión de dos minutos ( $1746 \pm 247$  mg), mientras que la de tres minutos permitió obtener un incremento de 1029 mg ( $1089 \pm 247$  mg) y la inmersión de un minuto sólo incrementó la biomasa de los callos en 562 mg ( $622 \pm 247$  mg). Por su parte, el testigo en medio semi-sólido mostró un incremento de sólo 144 mg con un peso seco promedio de  $204 \pm 247$  mg (Cuadro 3).

**Cuadro 3.** Peso seco promedio de los callos embriogénicos de arroz cultivados en RITA® y en medio semi-sólido a las dos, cuatro y seis semanas en función de la duración de las inmersiones diarias

Período	Peso (mg)							
	Testigo	Error estándar	1 min	Error estándar	2 min	Error estándar	3 min	Error estándar
2 sem*	98 <b>b</b>	248	166 <b>b</b>	176	1127 <b>a</b>	176	449 <b>ab</b>	176
4 sem*	124 <b>B</b>	204	373 <b>B</b>	144	1085 <b>A</b>	144	617 <b>AB</b>	144
6 sem*	204 <b>b</b>	349	622 <b>b</b>	247	1746 <b>a</b>	247	1089 <b>ab</b>	247

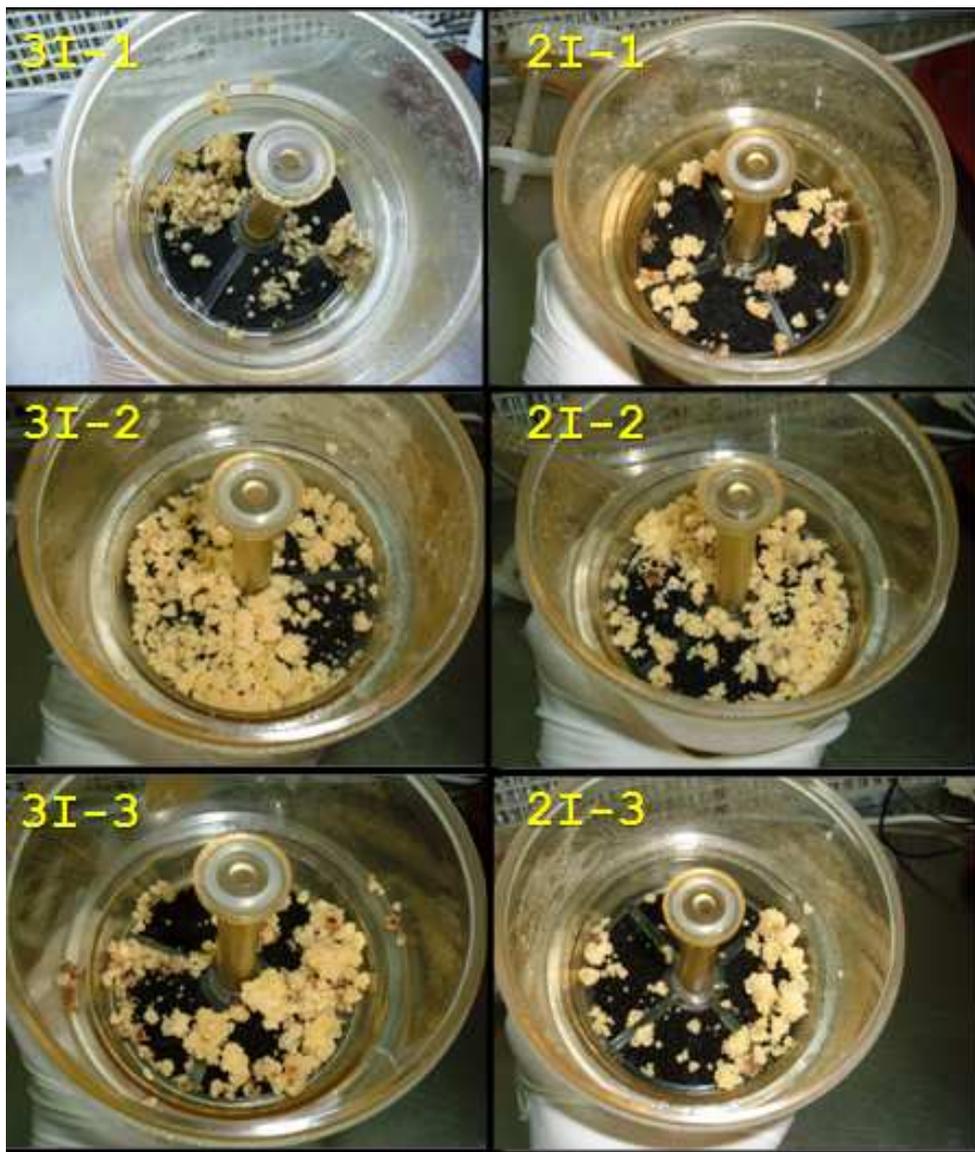
\*Probabilidades estadísticamente significativas por ser menores de 0,05. Los valores representados con letras desiguales son significativamente diferentes con un 95% de confianza.

Desde un punto de vista cualitativo, a las dos semanas de cultivo los callos embriogénicos que se encontraban en los tratamientos expuestos a tres inmersiones diarias con uno, dos y tres minutos de duración (3I-1, 3I-2 y 3I-3), mostraron diferentes grados de disgregación, siendo el tratamiento 3I-2 el que mostró un mayor grado de disgregación. Mientras que los callos de los tratamientos con dos inmersiones diarias de uno, dos y tres minutos de duración (2I-1, 2I-2 y 2I-3) se observaron más compactos y voluminosos. Es importante destacar que en todos los tratamientos se observaron callos con muy pocas secciones necrosadas (Figura 4).



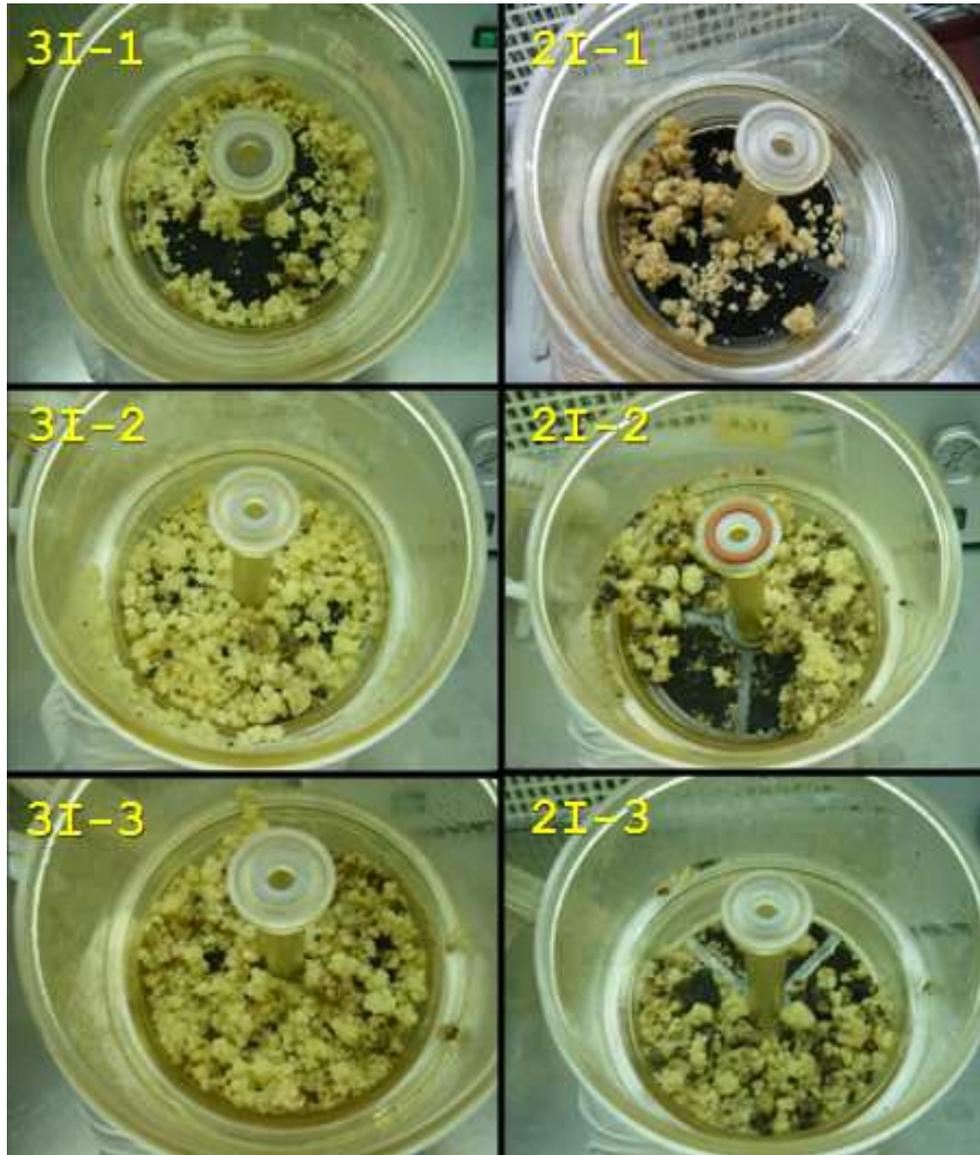
**Figura 4.** Multiplicación de callos embriogénicos en RITA® tras dos semanas de cultivo, de acuerdo con los tratamientos de inmersión descritos en el Cuadro 1.

Al observar los callos embriogénicos en los RITA® a las cuatro semanas de estar en multiplicación, se observó un aumento en la disgregación de los callos, principalmente en los que se encontraban en los tratamientos de tres inmersiones con una duración de dos minutos (3I-2 y 2I-2). Los callos de los tratamientos 3I-3 y 2I-3 se mostraron muy compactos, mientras que los callos de los tratamientos 3I-1 y 2I-1 fueron los que presentaron más secciones necrosadas al compararlos con los demás tratamientos (Figura 5).



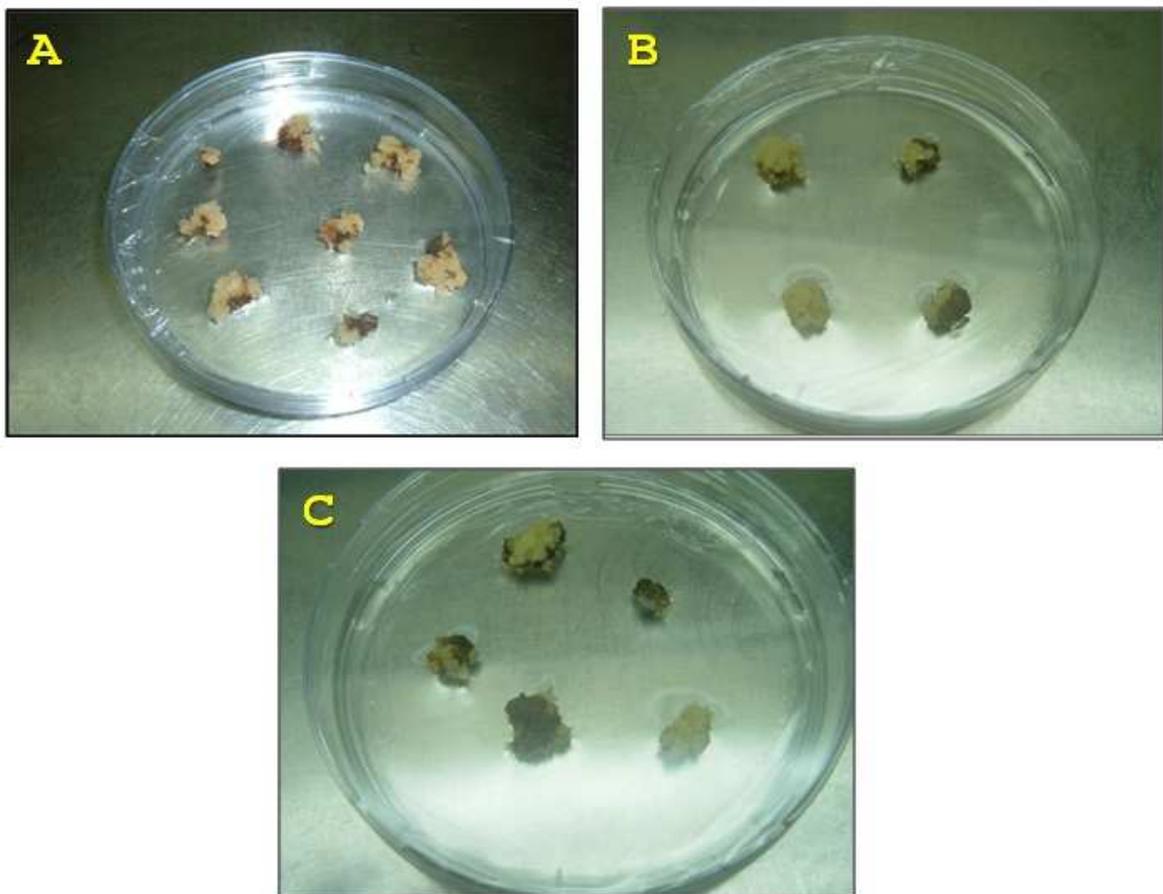
**Figura 5.** Multiplicación de callos embriogénicos en RITA® tras cuatro semanas de cultivo, de acuerdo con los tratamientos de inmersión descritos en el Cuadro 1.

Los callos embriogénicos que tenían seis semanas en el proceso de multiplicación en los RITA® mostraron el mayor grado de disgregación principalmente los callos de los tratamientos 3I-2 y 3I-3. Los callos de los tratamientos 2I-1, 2I-2 y 2I-3 fueron los que presentaron más secciones necrosadas al compararlos con los demás tratamientos (Figura 6).



**Figura 6.** Multiplicación de callos embriogénicos en RITA® tras seis semanas de cultivo, de acuerdo con los tratamientos de inmersión descritos en el Cuadro 1.

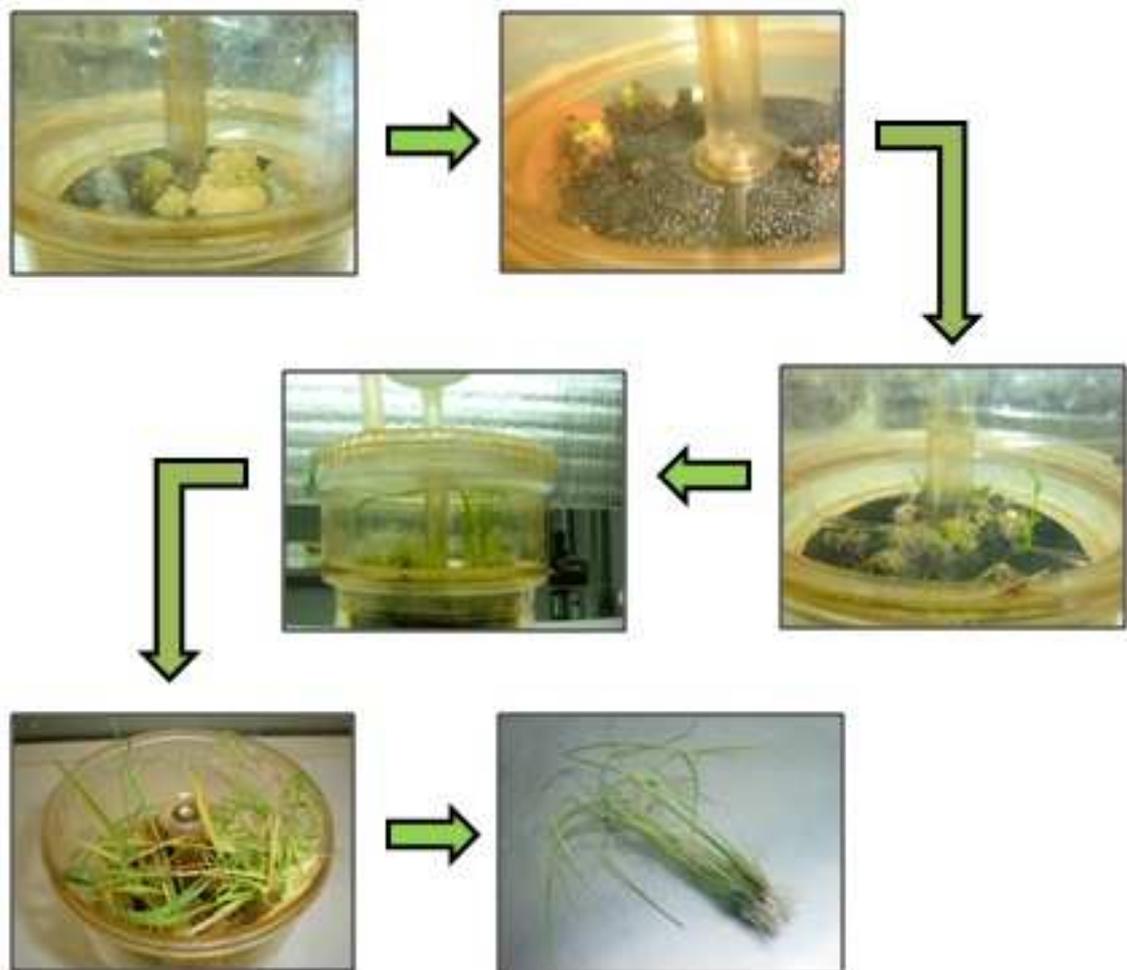
Los callos embriogénicos utilizados como testigo en medio semi-sólido, se observaron muy compactos tras dos semanas de cultivo. Además, al comparar estos callos con los obtenidos en los RITA®, se observaron más secciones de los callos necrosadas e incluso callos con un 40% de su totalidad necrosada (Figura 7A). A las cuatro semanas de cultivo, los callos en medio semi-sólido se mantenían muy compactos, pero la necrosis aumentó y se observaron callos hasta con un 70% de su totalidad necrosada (Figura 7B). Luego de seis semanas los callos embriogénicos se observaron muy compactos al compararlos con los callos que se encontraban en los RITA®, pero algunos presentaron casi el 100% de su totalidad necrosada (Figura 7C).



**Figura 7.** Crecimiento de los callos embriogénicos de arroz colocados en medio MSTP como testigo. **A)** Dos semanas en multiplicación. **B)** Cuatro semanas en multiplicación. **C)** Seis semanas en multiplicación.

## Regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA®

Con respecto al proceso de regeneración en RITA®, después de un mes de haber colocado los callos embriogénicos en medio MSR, algunas secciones de los callos comenzaron a tornarse de color verde. Luego en esas secciones verdes comenzaron a formarse pequeñas plántulas de arroz, y al cumplirse los dos meses en el proceso de regeneración, dichas plántulas fueron extraídas del RITA®. Las plántulas mostraron hojas de hasta 14 cm de largo y las raíces fueron gruesas y de color blanquecino (Figura 8). En total se regeneraron 54 plántulas en los RITA® y todas provenían del tratamiento de multiplicación de dos inmersiones al día con una duración de dos minutos (2I-2); mientras que los callos embriogénicos obtenidos en los otros tratamientos del proceso de multiplicación no regeneraron ninguna plántula.



**Figura 8.** Proceso de regeneración de plántulas de arroz de la variedad CR-5272, a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA® provenientes del tratamiento 2I-2.

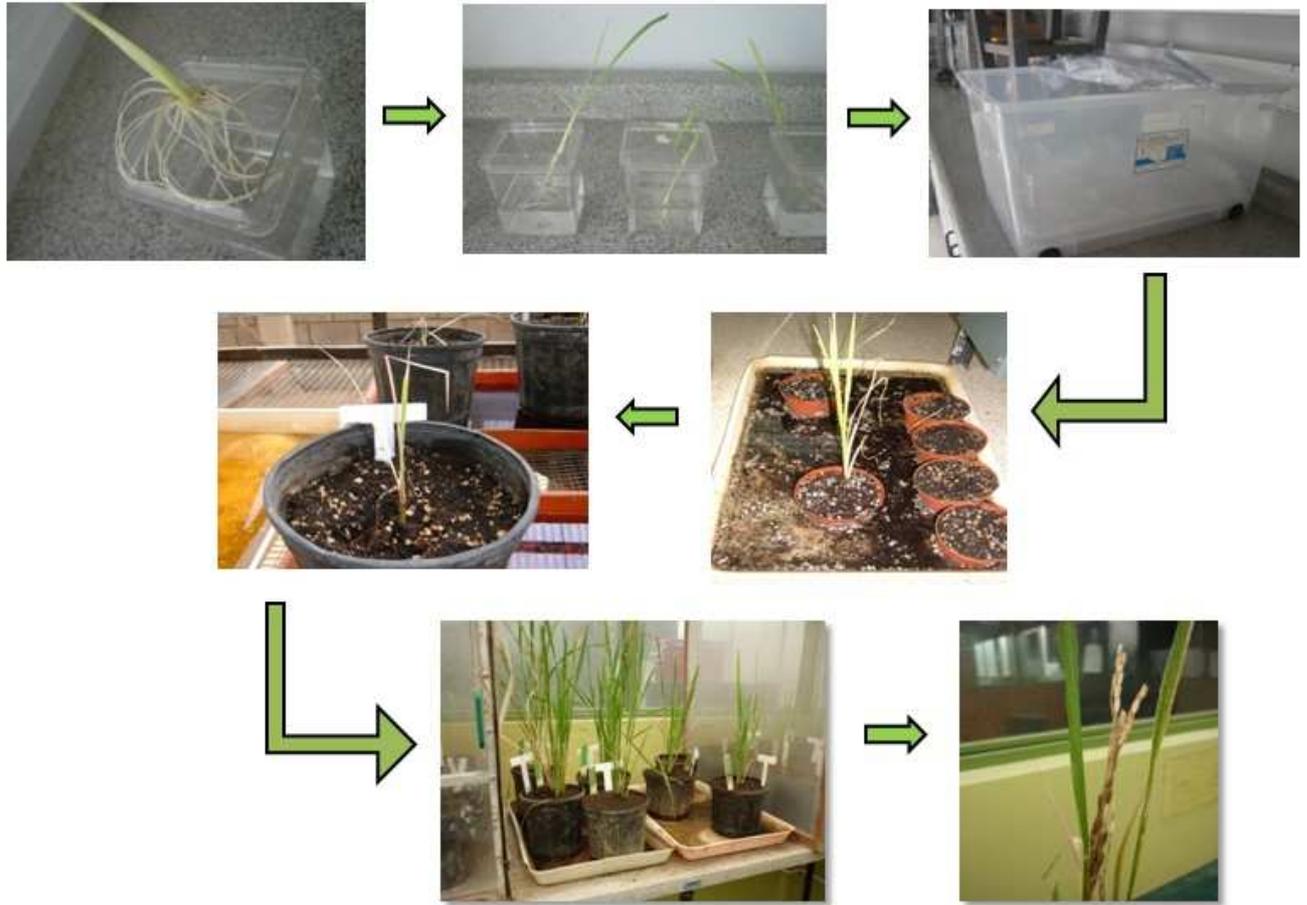
Los callos embriogénicos utilizados como testigo, mostraron algunas secciones de color verde tras un mes de estar en regeneración. Sin embargo, no llegaron a desarrollar plántulas y después de dos meses los callos se necrosaron completamente (Figura 9).



**Figura 9.** Secciones de color verde de los callos embriogénicos del testigo, tras un mes en el proceso de regeneración.

### **Aclimatación de plántulas regeneradas en RITA®**

Las plántulas regeneradas en los RITA® fueron sometidas a una aclimatación gradual, antes de pasarlas a condiciones de invernadero. Para ello, inicialmente se colocaron en recipientes tipo magenta con agua y luego de dos semanas en la cámara húmeda se observó un crecimiento, tanto en las raíces así como en las hojas. Posteriormente, las plántulas se colocaron en los almácigos con sustrato de turba y después de un mes se observó la producción de raíces nuevas. Finalmente, al transferir las plántulas a potes con suelo más fibra de coco en el invernadero, después de un mes sólo sobrevivieron ocho plantas de las 54 regeneradas en los RITA®. Esas plantas se desarrollaron completamente y llegaron a formar panícula (Figura 10).



**Figura 10.** Proceso de aclimatación de plantas de arroz de la variedad CR-5272, regeneradas a partir de callos embriogénicos multiplicados en RITA®.

## DISCUSIÓN

El recipiente de inmersión temporal automatizado (RITA®) permite combinar la aireación del tejido y su contacto con el medio, durante un lapso de tiempo controlado, los cuales son factores que no se combinan en el cultivo con medio líquido clásico (Alvard y Teisson 1993). El papel tan decisivo que juegan ambos factores en la eficiencia de la multiplicación de los callos embriogénicos de arroz se demostró con los resultados obtenidos en este estudio, al observar diferencias significativas en el incremento de biomasa de los callos al variar la duración (1, 2 y 3 minutos) y el número de inmersiones (2 y 3). Esto también fue demostrado por Salazar y Hoyos (2007), al evaluar el efecto de diferentes frecuencias (8 y 12 horas) y tiempos de inmersión (5 y 10 minutos) sobre la tasa de multiplicación de explantes de ñame. En dicha investigación se determinó que la mayor tasa de multiplicación se obtuvo con una frecuencia de inmersión cada 12 horas y durante 10 minutos. En el presente estudio se obtuvieron mayores cantidades de callos embriogénicos con inmersiones más frecuentes (cada 8 horas) y un menor tiempo (2 minutos). Esto difiere también de la investigación realizada por Colmenares y Giménez (2003), en donde se determinó que una inmersión aún más frecuente (cada 4 horas) y con una duración mucho mayor (20 minutos), obtenía un índice de multiplicación más alto en musáceas.

De acuerdo con los resultados, a partir de las cuatro semanas de cultivo se observaron diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) en la multiplicación de los callos embriogénicos con respecto al número de inmersiones. La exposición de los callos embriogénicos a tres inmersiones por día permitió obtener casi el triple de biomasa, que cuando fueron sometidos a sólo dos inmersiones por día en las evaluaciones realizadas a las cuatro y seis semanas. Esto probablemente se deba a que intervalos mayores a ocho horas afectaron la multiplicación de callos, ya que al ser un lapso de tiempo entre inmersiones demasiado largo, no permite lograr un contacto efectivo del medio líquido con los callos y esto impide una proliferación adecuada. Esto fue similar a lo observado por Quintero (2003) al cultivar anteras de arroz de diferentes genotipos de arroz *indica*, en donde intervalos mayores a seis horas fueron un obstáculo en la inducción de callos, probablemente por un alto estrés hídrico que no fue compensado con la duración de la inmersión o con la tolerancia natural de las células o tejidos.

Al evaluar el efecto de la duración de la inmersión sobre el incremento de la biomasa de los callos embriogénicos de arroz, se encontraron diferencias significativas en los tres períodos que se evaluaron ( $p < 0,05$ ). Se observó que una inmersión de dos minutos permitía un incremento de biomasa tres veces mayor que el obtenido con tres minutos, y hasta diez veces mayor que el de un minuto. Esta tendencia se mantuvo a lo largo de las 2, 4 y 6 semanas durante el proceso de multiplicación en RITA®. Según Vilchez *et al.* (2007), esto puede deberse a que tiempos de inmersión muy largos afectan el intercambio gaseoso y por ende el desarrollo de los explantes, ya que aumenta la posibilidad de hiperhidratación. Mientras que tiempos muy cortos pueden causar una reacción dentro del tejido, pero ésta desaparece en menos de una hora posterior a la inmersión (Etienne *et al.* 1997).

Según Salazar y Hoyos (2007) el efecto del tiempo de inmersión sobre el tejido que se utilice en el RITA® también puede variar considerablemente dependiendo de la especie evaluada, de la clase de tejido utilizado y del tipo de sistema de cultivo empleado. Por ejemplo, en la investigación realizada por Akita y Takayama (1994), períodos de inmersión cortos (1 minuto) permitieron estimular la producción de embriones en café. Lo mismo ocurrió en el cultivo de banano y plátanos realizado por Escalona *et al.* (1999). Mientras que para la tuberización en papa, períodos largos de inmersión (1 hora cada 6 horas) fueron muy efectivos (Etienne y Berthouly 2002). Esta gran variación en los tiempos de inmersión para inducir una respuesta morfogénica de tejidos adecuada, puede deberse a la influencia de factores como las relaciones hídricas, el intercambio gaseoso y el incremento en la toma de nutrientes mediante esta forma de cultivo de inmersión temporal (Escalona *et al.* 1999); los cuales son aspectos que inciden de alguna manera en el crecimiento y desarrollo del material vegetal.

Por otro lado, en la presente investigación se observó que en los tres períodos en que se evaluó la multiplicación de los callos embriogénicos de arroz (2, 4 y 6 semanas), el testigo en medio semi-sólido siempre mostró incrementos de biomasa menores que los obtenidos en el RITA® (hasta 1000 veces menores a partir de las 4 semanas). Ello evidencia que en el sistema de inmersión temporal es considerablemente más eficiente para multiplicar callos de arroz, que el medio semi-sólido. Esto probablemente debido a que el intercambio gaseoso brinda una mejor asimilación de los nutrientes, además de que permite una mejor difusión de sustancias y

disminución de la humedad relativa, lo cual incide positivamente en el crecimiento del tejido obteniéndose así tasas de multiplicación más altas que en el medio semi-sólido (Castro y González 2001).

También, cabe destacar que en el sistema RITA® los explantes no se mantienen en contacto permanente con el medio y la atmósfera interna de los recipientes se renueva de forma constante, evitando así la acumulación de gases nocivos tipo etileno, facilitando la regulación de la concentración de CO<sub>2</sub> y mejorando la oxigenación de los tejidos. En forma paralela la espuma de soporte retiene una película fina de medio de cultivo que evita la desecación e incrementa la disponibilidad de los nutrientes, lo cual se traduce en un crecimiento más vigoroso (Cabasson *et al.* 1997, CIRAD 2001). Diversos autores que han utilizado el sistema de inmersión temporal, también han demostrado la eficiencia de dicho sistema con relación al convencional medio semi-sólido (Teisson *et al.* 1996, Castro y González 2001, Quintero 2003, Salazar y Hoyos 2007).

Con respecto a la necrosis, al cabo de dos semanas en algunos tratamientos de los RITA® se observaron partes de callos necrosadas. Sin embargo, en este sistema de inmersión la necrosis nunca llegó a ser tan alta como la observada en el medio semi-sólido, en donde a las dos semanas ya se observaban callos hasta con un 40% de su superficie necrosada. Esta misma diferencia se mantuvo a lo largo de las 4 y 6 semanas de cultivo. La necrosis observada en el sistema de inmersión temporal puede deberse a que el tiempo de inmersión afectó la tasa de respiración del tejido. Es decir, la actividad de la enzima superóxido dismutasa (SOD) y la peroxidación de lípidos pudo aumentar con la duración de la inmersión, de tal manera que el período de inmersión parece inducir un estrés oxidativo (Martre *et al.* 2001). Por otro lado, la necrosis observada en el medio semi-sólido puede deberse al daño mecánico causado en el momento en que se seleccionaron las partes embriogénicas en el subcultivo inicial, ya que las rupturas y daños celulares podrían haber causado la liberación de compuestos fenólicos que se acumularon por la falta de subcultivos posteriores. Dichos compuestos pudieron interferir en el crecimiento de las células, incrementando la permeabilidad de las membranas, la respiración y la producción de etileno, los cuales son cambios que provocan la coloración café oscura (Vega 1999).

Después del proceso de multiplicación en RITA®, los callos embriogénicos se transfirieron al medio de regeneración MSR que estaba suplementado con 0,625 mg/L de BAP y 0,05 mg/L de ANA. Esta combinación de reguladores se utilizó debido a que para la etapa de diferenciación, las auxinas a bajas concentraciones estimulan el enraizamiento, mientras que las citoquininas en altas concentraciones favorecen el desarrollo de los brotes, tallos y hojas, pero inhiben el enraizamiento. Es por ello, que para la regeneración de plantas enraizadas es muy importante realizar una combinación de auxinas y citocininas en una proporción de 1:4 ó de 1:2 (Quintero 2003). Esto se debe a que cuando los callos son transferidos a un medio bajo en auxinas, estos proliferan de forma lenta e indiferenciada; pero después se producen una serie de rápidas divisiones celulares en distintas zonas del centro embriogénico y se conforman embriones globulares, que al crecer y tras una fase de maduración, germinan y dan lugar a plantas completas (Quintero 2003).

Tras un mes de haber colocado los callos embriogénicos en medio MSR, varias secciones de los callos comenzaron a tornarse de color verde. A partir de esas secciones, se formaron pequeñas plántulas de arroz y al cumplirse dos meses las plántulas fueron extraídas del RITA®. En total se regeneraron 54 plántulas en los RITA®, todas provenientes del tratamiento de multiplicación de dos inmersiones al día con una duración de dos minutos (2I-2), ya que los callos embriogénicos de los otros tratamientos del proceso de multiplicación no regeneraron ninguna plántula. Probablemente el hecho de que este tratamiento (2I-2) coincidiera con el utilizado en el proceso de regeneración, fue la razón por la cual los otros tratamientos de multiplicación no llegaron a regenerar plántulas. Es decir, cabe la posibilidad de que el cambio en la frecuencia de inmersión entre el proceso de multiplicación y el de regeneración, causara un estrés en los callos embriogénicos de tal forma que afectó su proliferación hasta la etapa de maduración de los embriones. Sin embargo, este posible efecto del cambio en los tratamientos de inmersión sobre el proceso de regeneración de los callos de arroz en RITA® aún no ha sido reportado, por lo cual debería ser estudiado con más detalle en investigaciones posteriores.

Además del cambio en los tratamientos de inmersión, también puede ser que algún otro factor afectara la regeneración de plantas a partir de los callos de arroz, como por ejemplo la falta de un tratamiento de desecación de los callos embriogénicos antes del proceso de regeneración en

RITA®. Esto fue estudiado por Tsukahara y Hirosawa (1992), quienes observaron que la reducción de agua contenida en los callos de arroz era necesaria para incrementar la eficiencia de regeneración. Por ello en la presente investigación, se considera que quizás el haber utilizado un pre-tratamiento de desecación de los callos embriogénicos de arroz en forma gradual, podría haber incrementado el número de plantas regeneradas a partir de los callos embriogénicos de arroz de la variedad CR-5272 que se habían multiplicado en RITA®.

Finalmente, en el proceso de aclimatación de las 54 plántulas regeneradas en RITA® solo ocho de ellas se desarrollaron completamente y llegaron a floración en condiciones de invernadero. Esto podría deberse al daño mecánico que sufrieron las raíces de algunas plántulas al tratar de retirarlas de las espumas que poseen los RITA®, ya que éstas quedaban atrapadas y se tenía que ejercer cierta fuerza para desprenderlas de la espuma. Es por ello que se considera que ese daño mecánico sufrido por las raíces, pudo limitar su sobrevivencia cuando fueron transferidas bajo condiciones de invernadero durante el proceso de aclimatación. Un resultado similar se observó en la investigación realizada por Holst (2010), al estudiar el efecto del sistema de inmersión temporal en el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Guadua angustifolia* y su posterior aclimatación.

Los resultados obtenidos en esta investigación mostraron que la utilización de un sistema de cultivo por inmersión temporal (RITA®) facilita considerablemente la multiplicación de callos embriogénicos de arroz y reduce el tiempo invertido en esta fase. Esto al compararlo con la multiplicación de los callos en medio semi-sólido, la cual conlleva períodos muy largos para obtener una cantidad significativa de callos y requiere subcultivos constantes al haber un contacto permanente con el explante. Además, el sistema en medio semi-sólido es laborioso y poco rentable en términos del tiempo invertido en labor manual y uso de reactivos. Por ello el uso del RITA® para la multiplicación de callos embriogénicos de arroz, se considera muy valioso para investigaciones posteriores de transformación genética (Anexo 1) o de propagación masiva de plantas.

## CONCLUSIONES

1. El sistema de inmersión temporal permitió aumentar considerablemente las tasas de multiplicación en relación con el método de cultivo en medio semi-sólido, ya que este último siempre mostró incrementos de biomasa menores a los obtenidos en los RITA® (hasta 1000 veces menores).
2. Después de cuatro semanas en multiplicación en el RITA®, la exposición de los callos embriogénicos de arroz a tres inmersiones por día (una cada 8 horas), permitió obtener casi el triple de biomasa que cuando fueron sometidos a sólo dos inmersiones por día (cada 12 horas).
3. Una inmersión de dos minutos en los callos embriogénicos de arroz, mostró un incremento de biomasa tres veces mayor que el obtenido con tres minutos, y hasta diez veces mayor que el de un minuto de inmersión.
4. La necrosis observada en el RITA® nunca llegó a ser tan alta como la observada en el medio semi-sólido, en donde a las dos semanas ya se observaban callos hasta con un 40% de su totalidad necrosada y a las seis semanas alcanzaron el 100% de necrosis.
5. El daño mecánico que sufrieron las raíces de algunas plántulas al tratar de retirarlas de las espumas que poseen los RITA® pudo ser un factor fundamental que afectó el proceso de aclimatación de las mismas.

## RECOMENDACIONES

1. Los resultados sugieren que el cambio en la frecuencia de inmersión entre el proceso de multiplicación y el de regeneración puede generar algún estrés en los callos embriogénicos y esto afecta su capacidad para regenerar plántulas. Por ello se considera que se debería probar el mantener en la etapa de regeneración, los mismos tratamientos de inmersión utilizados en multiplicación, para así determinar si esto mejora la posibilidad de regeneración de plántulas.
2. Se deberían realizar estudios de desecación de los callos embriogénicos producidos en el RITA®, para así determinar si se requiere un proceso de pre-regeneración que mejore las posibilidades de regeneración de plántulas a partir de los callos.
3. Debido a que la espuma del RITA® dificulta la extracción de las raíces de plantas regeneradas y les provoca un daño mecánico, se hace necesario realizar ensayos con soportes con espumas que tengan diámetros de poros más pequeños o extraer las plántulas de la RITA® cuando hayan crecido poco, para así mejorar las posibilidades de una aclimatación exitosa.
4. Sería importante realizar estudios histológicos durante el proceso de multiplicación de los callos en el RITA® para así ir seleccionando sólo los callos que sean completamente embriogénicos, lo cual podría aumentar los porcentajes de regeneración de plántulas a partir de ellos.

## LITERATURA CITADA

- Akimoto, M., Y. Shimamoto y H. Morishima. 1998. Population genetic structure of wild rice *Oryza glumaepatula* distributed in the Amazon flood area influenced by its life-history traits. *Molecular Ecology* 7: 1371-1381.
- Akita, M. y S. Takayama. 1994. Stimulation of potato (*Solanum tuberosum* L.) tuberization by semicontinuous liquid medium surface level control. *Plant Cell Reports* 13:184-187.
- Alvard, F. y C. Teisson. 1993. Comparison of methods of liquid medium culture for banana micropropagation, effects of temporary immersion of explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 32: 55-60.
- Arnao, E., N. Rodríguez, P. Hinrinsen, Y. Jayaro, C. Ramis y I. Pérez-Almeida. 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatelitales y AFLP. *Agronomía Tropical* 57: 45-50.
- Cabasson, A., D. Alvard, D. Dambier, P. Ollitrault y C. Teisson. 1997. Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 50: 33-37.
- Cabezas, E. y A.M. Espinoza. 2000. El arroz en América: su introducción y primeras siembras. *Revista de Historia de América* 126: 1-18.
- Cao, J., X. Duan, D. McElroy y R. Wu. 1992. Regeneration of herbicide resistant transgenic rice plants following microprojectile-mediated transformation of suspension culture cells. *Plant Cell Reports* 11: 586-591.
- Castro, D. y J. González. 2001. Control de condiciones ambientales y medio de cultivo para la propagación de *Eucalyptus grandis* en el sistema de inmersión temporal. *Actualidades Biológicas* 23: 13-18.
- Chan, J.R. 2001. Regeneración de callos de arroz (*Oryza sativa* L.) por medio de la técnica de inmersión temporal automática (RITA®). Informe presentado a la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. 31p.
- Charpantier, F. 1988. Aspectos Agroclimáticos y zonificación del cultivo del arroz (*Oryza sativa* L.). Secretaría Ejecutiva de Planificación Sectorial Agropecuaria y de Recursos Naturales Renovables. San José, Costa Rica. 23p.
- Chen, L.Y., A. Snow, F. Wang y B.R. Lu. 2006. Effects of insect-resistance transgenes on fecundity in rice (*Oryza sativa*, Poaceae): a test for underlying costs. *American Journal of Botany* 93: 94-101.

- CIRAD (2001). RITA®, temporary immersion system. <http://www.cirad.fr/produits/rita/es/contact.html>. Consultado el 12 de enero del año 2010 a las 8:00 pm.
- CNP. 2001. Información de mercados. <http://web.cnp.go.cr/index.php/informacion-de-mercados>. Consultado el 15 de enero del año 2010 a las 9:00pm.
- Colmenares, M. y C. Giménez. 2003. Multiplicación *in vitro* de *Musa* spp. mediante sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad Agronomía* 20: 468-477.
- Comisión Nacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria (CONITTA). 1991. Arroz (*Oryza sativa*). Serie ITTA N° 1. San José, Costa Rica. EUNED. 44p.
- Cordero, A. 1993. Fertilización y nutrición mineral del arroz. San José, Costa Rica. Editorial de la Universidad de Costa Rica. 100p.
- Corporación Arroceras Nacional (CONARROZ). 2004. Oficio CONARROZ ORHN-112-2004 del lunes 22 de noviembre del 2004. San José, Costa Rica.
- Corporación Arroceras Nacional (CONARROZ). 2010. Servicio Integrado de Información Arroceras. San José, Costa Rica.
- Dale, J. y M. von Schantz. 2002. From genes to genomes. Sussex, UK, John Wiley and Sons. 360p.
- Díaz, M. 2002. Optimización de la técnica de inmersión temporal en arroz (*Oryza sativa* L. var. CR-5272) para la regeneración de plántulas a partir de callos embriogénicos. Informe final de práctica de especialidad sometido a consideración ante la Escuela de Biología del Instituto Tecnológico de Costa Rica como requisito parcial para optar por el título de Bachiller en Ingeniería en Biotecnología. Cartago, Costa Rica. 81p.
- Escalona, M., J. Lorenzo, B. González, M. Daquinta, C. Barroto, J. González y Y. Desjardines. 1999. Pineapple (*Ananas comosus* Merr) micropropagation in temporary immersion systems. *Plant Cell Reports* 18: 743-748.
- Etienne, H. y M. Berthouly. 2002. Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 215-231.
- Etienne, H; Lartand, M; Michaux-Ferriere, N; Carron, P; Berthouly, M y Teisson, C. 1997. Improvement of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis* using the temporary immersion technique. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 33:81-87.

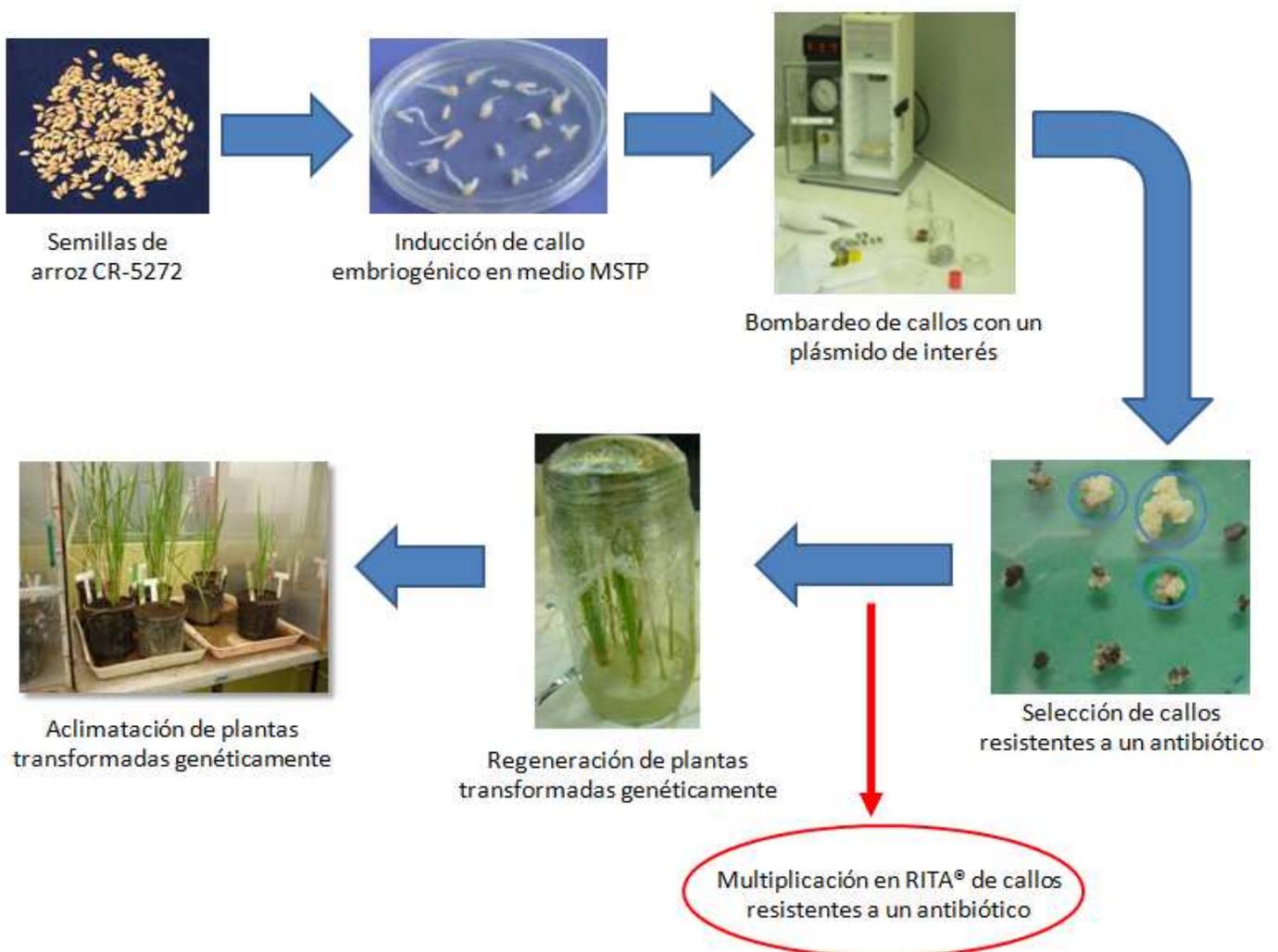
- Etienne-Barry, D., B. Bertrand, N. Vasquez y H. Etienne. 1999. Direct sowing of *Coffea arabica* somatic embryos mass-produced in a bioreactor and regeneration of plants. *Plant Cell Reports* 19: 111-117.
- Gahan, P.B. y E.F. George. 2008. Adventitious regeneration. In: E.F. George, M.A. Hall y G. De Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3<sup>rd</sup> ed. Springer. 355-401.
- García-Arias, A.C. 2011. Transformación del genoma de arroz (*Oryza sativa* L.) con el gen *vip3A* de *Bacillus thuringiensis* para conferir tolerancia a *Spodoptera frugiperda* (J.E. SMITH). Tesis sometida para optar por el título de Maestría Universidad de Costa Rica. San José, Costa Rica. 135p.
- Ge, S., T. Sang, B. Lu y D. Hong. 1999. Phylogeny of rice genomes with emphasis on origins of allotetraploid species. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA* 96: 14400-14405.
- González, K. 2003. Respuesta de tres explantes de vainilla (*Vanilla planifolia*) a diferentes frecuencias de inmersión temporal. Informe de práctica de especialidad, Instituto Tecnológico de Costa Rica, Cartago. 56p.
- Hancock, J.P. 2004. *Plant evolution and the origin of crop species*. CABI. 313p.
- Hanhineva, K., H. Kokko y S. Kärenlampi. 2005. Shoot regeneration from leaf explants of five strawberry (*Fragaria x Ananassa*) cultivars in temporary immersion bioreactor system. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant* 41: 826-831.
- Hempfling, T. y W. Preil. 2005. Application of a temporary immersion system in mass propagation of *Phalaenopsis*. In: Hvoslef-Eide A.K. y W. Preil (eds.), *Liquid Culture Systems for in vitro Plant Propagation* (pp 231-242). Springer, Netherlands.
- Hoa, T., S. Al-Babili, P. Schaub, I. Potrykus y P. Beyer. 2003. Golden indica and japonica rice lines amenable to deregulation. *Plant Physiology* 133:161-169.
- Holst, A. 2010. Efecto del sistema de inmersión temporal (RITA®) sobre el desarrollo de plántulas *in vitro* de *Guadua angustifolia* Kunth (Poaceae: Bambusoideae) y su posterior aclimatación. Tesis presentada para optar por el grado académico de Licenciado en Ingeniería Agronómica. Universidad de Costa Rica, San José. 52p.
- Kiefer-Meyer, M., A. Reddy y M. Delseny. 1995. Characterization of a dispersed repetitive DNA sequence associated with the CCDD genome of wild rice. *Genome* 38: 681-688.
- Lentini, Z., I. Lozano, E. Tabares, L. Fory, J. Domínguez, M. Cuervo y L. Calvert. 2003. Expression and inheritance of hypersensitive resistance to rice hoja blanca virus mediated by the viral nucleocapsid protein gene in transgenic rice. *Theoretical and Applied Genetics* 106: 1018-1026.

- León, J. 1987. Botánica de los cultivos tropicales. Editorial del Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA). Segunda Edición. Coronado, San José, Costa Rica. pp 120-126.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. IICA, San José, Costa Rica. 522p.
- Lorenzo, J.C., B.L. Gonzalez, M. Escalona, C. Teisson, P. Espinosa y C. Borroto. 1998. Sugarcane shoot formation in an improved temporary immersion system. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54: 197–200.
- Martínez, C.P. y J. Tohmr. 1997. Estado actual del mejoramiento del arroz mediante la utilización de especies silvestres de arroz en CIAT 1. X Conferencia Internacional de Arroz para América Latina y el Caribe. Acarigua, Venezuela 3-5 Marzo. 97p.
- Martre P., D. Lacan, D. Just y C. Teisson. 2001. Physiological effects of temporary immersion on *Hevea brasiliensis* callus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 67: 25-35.
- Medina, R., M. Faloci y L. Mroginski. 2001. Efecto del genotipo y de diferentes auxinas en la obtención de embriones somáticos primarios de mandioca (*Manihot esculenta* Crantz). Corrientes, AR, IBONE (Instituto de Botánica del Nordeste) y UNNE (Universidad Nacional del Nordeste). VI Reunión de Comunicaciones Científicas y Tecnológicas.
- Méndez, P. 2010. Informativo mensual del mercado mundial del arroz. InfoArroz noviembre 2010, No. 81.
- Meneses, A., D. Flores, M. Muñoz, G. Arrieta y A.M. Espinoza. 2005. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Revista de Biología Tropical* 53: 361-368.
- Monge, V.L. 1989. Cultivo del Arroz. Fascículo N° 6. Cultivos básicos en Costa Rica 2° ed. UNED. San José, Costa Rica. 299p.
- Multani, D.S., G. Khush y B.G. de los Reyes. 2003. Alien genes introgression and development of monosomic alien addition lines from *O. latifolia* Desv. to rice, *Oryza sativa*. *Theoretical and Applied Genetics* 107: 395-405.
- Murashige, T y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15: 473-497.
- Murch, S., C. Liu, R. Romero y P. Saxena. 2004. *In vitro* culture and temporary immersion bioreactor production of *Crescentia cujete*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 78: 63-68.
- Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). 2004. 28ª Conferencia Regional de la FAO para América Latina y el Caribe. Ciudad de Guatemala, Guatemala. 39p.

- Parsons, D. 1982. Arroz: manuales para educación agropecuaria. Editorial Trillas, México. 62p.
- Pérez, M., M. Delgado, C. Hernández y R. Armas. 2007. Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad Incuba-28) resistentes a higromicina. Revista Colombiana de Biotecnología 9: 35-40.
- Quintero, M. 2003. Ajuste del sistema RITA® para la producción de callo embriogénico y regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras de arroz. Tesis (Ingeniero Agrónomo). Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Departamento de Producción Anima, Palmira, Valle del Cauca, CO. 107 p.
- Quintero, M., E. Tabares, R. Escobar, G. Delgado y Z. Lentini. 2004. Increased rice embryogenesis in microspore derived callus using temporary immersion system (RITA®). CIAT, Colombia. 1p.
- Ronald, P.C. 1997. Making rice disease-resistant. Scientific American, 277: 100-105.
- Salazar, R. y R. Hoyos. 2007. Multiplicación y tuberización *in vitro* de ñame (*Dioscorea alata* L.) en sistema de inmersión temporal. Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín 60: 3907-3921.
- Sun, C., X. Wang, Z. Li, A. Yoshimura y N. Iwata. 2001. Comparison of the genetic diversity of common wild rice (*Oryza rufipogon* Griff.) and cultivated rice (*O. sativa* L.) using RFLP markers. Theoretical and Applied Genetics 102: 157-162.
- Tanksley, S.D. y S.R. McCouch. 1997. Seed Banks and molecular maps: unlocking genetic potential from the wild. Science 277: 1063-1066.
- Tascón, E. y E. García. 1985. Arroz: Investigación y producción. CIAT. 696p.
- Teisson, C., B. Alvard, F. Berthouly, J. Cote, H. Escalant y M. Lartaud. 1996. Simple apparatus to perform plant tissue culture by temporary immersion. Acta Horticulture 440: 521-526.
- Tsukahara, M. y T. Hirosawa. 1992. Retention and revival of regenerating ability by osmotic adjustment in long-term culture of four varieties of rice. Plant Cell Reports 11: 550-553.
- Valdez, M., M. Muñoz, J. Vega y A. Espinoza. 1996. Plant regeneration of *indica* rice (*Oryza sativa*) cultivars from mature embryo-derived calli. Revista de Biología Tropical 44: 13-21.
- Vargas, E. 1991. Arroz: *Oryza sativa* (Gramineae). Comisión Nacional de Investigación y Transferencia de Tecnología Agropecuaria (CONITTA). Serie ITTA N° 1. Ministerio de Agricultura y Ganadería. UNED. San José, Costa Rica. 44p.
- Vaughan, D.A. 1994. The wild relatives of rice: a genetic resources handbook. Manila, Filipinas, International Rice Research Institute. 137p.

- Vega, J. 1999. Embriogénesis somática en arroz (*Oryza sativa* L. Cultivar CR 5272): Anatomía e histología de los procesos embriogénicos. Tesis de Maestría. Sistema de Estudios de Posgrado. Escuela de Biología UCR. 98p.
- Vega, R., N. Vásquez, A.M. Espinoza, A. Gatica y M. Valdez-Melara. 2009. Histology of somatic embryogenesis in rice (*Oryza sativa* cv. 5272). *Revista de Biología Tropical*. 57: 141-150.
- Vilchez, J., O. Ferrer y N. Albany. 2007. Multiplicación *in vitro* de zabila en sistema de inmersión temporal. *Revista Facultad de Agronomía (LUZ)* 24: 78-82.
- von Arnold, S. 2008. Somatic Embryogenesis. In: E.F. George, M.A. Hall y G. De Klerk (eds.), *Plant Propagation by Tissue Culture*. 3 ed. Springer. 335-354.
- Wang, Z., Q. Shu, G. Ye, H. Cui, D. Wu, I. Altosaar y Y. Xia. 2002. Genetic analysis of resistance of Bt rice to the rice stem borer (*Chilo suppressalis*). *Euphytica* 123: 379-386.
- Watanabe, Y. 1997. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: Matsuo, T; Futsuhara, Y; Kikuchi, F; Yamaguchi, H. eds. *Science of the Rice Plant: Genetics*. Tokio, JP, FAPCR. pp. 29-39.
- Ye, X., S. Al-Babili, J. Zhang, P. Lucca, P. Beyer y I. Potrykus. 2000. Engineering the provitamin A ( $\beta$ -carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid free) rice endosperm. *Science* 287: 303-305.

# **ANEXOS**



**Anexo 1.** Implementación del proceso de multiplicación en RITA® de callos de arroz en la transformación genética. Tomado de García-Arias (2011).

**Anexo 2.** Análisis de variancia (ANOVA) factorial para determinar el efecto del número de inmersiones diarias sobre el peso seco promedio de los callos embriogénicos en el RITA® a las dos, cuatro y seis semanas comparado con el testigo.

Dos semanas		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
frec	2	1789344,9	894672	3,3019	0,0600
Error	18	4877231,1	270957		
C. Total	20	6666576,0			

Cuatro semanas		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
frec	2	1593553,5	796777	4,8885	0,0202*
Error	18	2933811,8	162990		
C. Total	20	4527365,2			

Seis semanas		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
frec	2	4520585	2260293	5,1873	0,0166*
Error	18	7843278	435738		
C. Total	20	12363863			

\*Probabilidades estadísticamente significativas por ser menores de 0,05

**Anexo 3.** Análisis de variancia (ANOVA) factorial para determinar el efecto de la duración de las inmersiones por día sobre el peso seco promedio de los callos embriogénicos en el RITA® a las dos, cuatro y seis semanas comparado con el testigo.

Dos semanas		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
tiempo	3	3525771,8	1175257	6,3612	0,0043*
Error	17	3140804,2	184753		
C. Total	20	6666576,0			

Cuatro semanas		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
tiempo	3	2400603,1	800201	6,3963	0,0042*
Error	17	2126762,2	125104		
C. Total	20	4527365,2			

Seis semanas		Sum of			
Source	DF	Squares	Mean Square	F Ratio	Prob > F
tiempo	3	6140220	2046740	5,5907	0,0074*
Error	17	6223643	366097		
C. Total	20	12363863			

\*Probabilidades estadísticamente significativas por ser menores de 0,05