

ARTÍCULO DE INVESTIGACIÓN/RESEARCH ARTICLE

# ESTABLECIMIENTO DE UN SISTEMA DE SELECCIÓN *IN VITRO* DE VARIEDADES VENEZOLANAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) RESISTENTES AL HONGO *Pyricularia grisea*

## Establishment of an *in vitro* Selection of Venezuelan Cultivars of Rice (*Oryza sativa* L.) Resistant to the Fungus *Pyricularia grisea*

Rafael FERNÁNDEZ DA SILVA<sup>1</sup>, Pedro RAMÍREZ<sup>1</sup>, Jorge SILVA<sup>1</sup>, Vincenzo STORACI<sup>1</sup>, Liaska CUAMO<sup>1</sup>, Zoraya DE GUGLIELMO<sup>2</sup>, Gunta SMITS<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología (Facyt), Centro de Biotecnología Aplicada (CBA), Universidad de Carabobo. Barbola, Mun. Naguanagua. Valencia, Venezuela.

<sup>2</sup> Instituto de Oncología y Hematología, MPPS-UCV. Urb. Los Chaguaramos-Distrito Capital. Caracas, Venezuela.

<sup>3</sup> Instituto de Biología Experimental (IBE), Universidad Central de Venezuela. Calle Suapure, Colinas de Bello-Distrito Capital. Caracas, Venezuela.

**For correspondence.** rafaelfer2103@hotmail.com

**Received:** 15<sup>th</sup> May 2016, **Returned for revision:** 3<sup>rd</sup> October 2016, **Accepted:** 11<sup>th</sup> December 2016.

**Associate Editor:** Leonardo Galindo.

**Citation/Citar este artículo como:** Fernández Da Silva R, Ramírez P, Silva J, Storaci V, Cuamo L, De Guglielmo Z, Smits G. Establecimiento de un sistema de selección *in vitro* de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.) resistentes al hongo *Pyricularia grisea*. Acta biol. Colomb. 2017;22(1):85-100. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/abc.v22n1.56933>

### RESUMEN

El arroz, luego del trigo, es el cereal más importante del mundo, sin embargo, es susceptible al ataque de numerosos patógenos, siendo *Pyricularia grisea*, el más dañino. Este trabajo estableció un sistema de selección *in vitro* de variedades venezolanas a *P. grisea*, optimizando el sistema de regeneración por embriogénesis somática (inducción, regeneración y estrés por desecación), sometiendo el callo embriogénico (E) a presión de selección del filtrado crudo "FC" a través de cambios a la misma concentración "MC" o por incrementos progresivos en la concentración "IPC", obteniendo plantas tolerantes al fitopatógeno. El máximo porcentaje de inducción de callo embriogénico osciló entre 30-65 %, en las cuatro variedades (Araure-4 y Venezuela 21: 1 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> K; Cimarrón: 3 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> K; Centauro: 1 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> BAP), mientras que la regeneración estuvo entre 44 y 52 % con 0.5 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> BAP a 48 h de desecación para Centauro y 24 h para las otras tres variedades. La frecuencia regenerativa de los callos E disminuyó a medida que se incrementó la concentración del FC, independientemente del método de presión selectiva. El promedio de plantas diferenciada por variedad, dependió del método de presión usado, siendo el sistema IPC (25 % para Centauro y 50 % para las otras tres variedades) el que mostró los resultados más favorables, evidenciándose que para las condiciones de los sistemas selectivos de FC evaluados, la resistencia expresada a nivel de planta *in vivo* no corresponde a la encontrada *in vitro*.

**Palabras claves:** embriogénesis somática, estrés hídrico por desecación, presión de selección de filtrado crudo *in vitro*.

### ABSTRACT

Rice after wheat is the most important cereal in the world, however, it is susceptible to attack by many pathogens, which *Pyricularia grisea* being the most harmful. In the current study we established an *in-vitro* selection system of *P. grisea* on Venezuelan rice varieties. A somatic embryogenesis regeneration system was optimized (induction, regeneration and desiccation) to expose embryogenic callus (E) to crude filtrate "CF" selection pressure through changes at the same concentration "SC" or progressive concentration increments "PIC" of *P. grisea*, and thus obtain plants tolerant to the pathogen. The maximum percentage of embryogenic callus induction ranged between 30-65 % in the four varieties (Araure-4 and Venezuela- 21: 1 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> K; Cimarron: 3 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> + 2 K; Centauro: 1 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> BAP) while regeneration was between 44 and 52 % with 0.5 mg.L<sup>-1</sup> + 2 mg.L<sup>-1</sup> BAP 48 h of desiccation for Centauro and 24 h for the other three varieties. The regeneration frequency of embryogenic callus decreased as the concentration of FC increased, regardless of the method of selective pressure. The average differentiated plants per variety, depended on the pressure method used, with the PIC system being the most favorable (25 % for Centauro and 50 % for the other three varieties).

The result demonstrated, to resistance expressed for plants *in vivo* does not correspond to the *in vitro* conditions.

**Keywords:** selection pressure of crude filtrate *in vitro*, somatic embryogenesis, water stress by desiccation,.

## INTRODUCCIÓN

El arroz es una Angiosperma del grupo de las monocotiledóneas gramíneas cultivables, muy importante agroalimentariamente, ya que es el alimento básico para más de la mitad de la población mundial, principalmente con las variedades de la especie asiática (*Oryza sativa* L.), cuyo cultivo comenzó hace casi 10.000 años, en muchas regiones húmedas de Asia tropical y subtropical (Acevedo, 2006). No obstante, el incremento exponencial de la población en el mundo y el pronóstico a corto plazo de un estancamiento de áreas de cultivo de arroz, determinaría necesariamente de un aumento en la producción global de este cultivo, a través de nuevas variedades de alto rendimiento que no afecten el medioambiente, y que sean eficientes en el uso de los recursos agua y tierra (Brookes y Barfoot, 2003). En la actualidad, Asia es el continente con la mayor producción de este cereal, con más del 90 % de la producción de arroz a nivel mundial, siendo China el principal productor (FAO, 2016). En América Latina y el Caribe, la producción para el año 2015 se registró en alrededor de 28,5 millones toneladas, un 3 % por encima del año anterior. La recuperación estuvo encabezada por Brasil, el mayor productor de la zona, sin embargo, se redujo considerablemente la producción en Argentina y Venezuela (FAO, 2016).

El nivel de producción puede verse mermado por distintos factores abióticos o bióticos. En el primer caso, podemos encontrar la poca disponibilidad de agua (estrés hídrico), temperaturas extremas y salinidad, entre otros, mientras que en el segundo caso, tenemos la afectación por parte de bacterias, hongos, insectos, ácaros y virus (Agrios, 1991). En este sentido, se han buscado distintos procedimientos con el fin de desarrollar cultivares de arroz más resistentes a estas enfermedades o plagas, las cuales causan a nivel mundial una reducción de casi el 50 % de la producción total (Agrios, 1991). Entre las enfermedades más nocivas a escala mundial se encuentra el añublo del arroz o piriculariosis producida por un hongo filamentoso conocido como *Pyricularia grisea*, (Cooke) Sacc (estado anamorfo) o *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr (estado telomorfo), el cual puede disminuir los niveles de producción en un 35 a 45 % (Agrios, 1991), reportándose en más de 70 países altamente productores de este cereal (Cordero y Rivero, 2001). Asimismo, este organismo fúngico se considera un complejo de la especie *Pyricularia grisea*, ya que presenta una alta variabilidad genética, encontrándose entre 15 y 70 cepas por país, no conociendo totalmente el mecanismo que facilita dicha diversidad genética, a fin de establecer las eficientes estrategias de control de la devastadora enfermedad que causa este patógeno fúngico (Zhang et

*al.*, 2015), encontrándose por ejemplo 267 y 162 cepas de distinto grado de virulencia respectivamente en Bangladesh (Khan *et al.*, 2016) y Brasil (D'Ávila *et al.*, 2016).

El hongo afecta todas las partes aéreas de la planta de arroz, los nudos del tallo, el cuello de la panícula y la panícula misma. Cuando el ataque es en las hojas, se producen lesiones en forma de diamante de color blancuzco en el centro, órgano más propenso a la infección, mientras que si el ataque ocurre en la fase de plántula o de macollamiento, las plantas quedan totalmente destruidas (Correa y Guimaraes, 1995; Talbot *et al.*, 2001).

La biotecnología vegetal, abarca el mejoramiento tradicional por cultivo de tejidos y el mejoramiento vanguardista mediante técnicas del ADN recombinante, teniendo como objetivo el desarrollo de nuevos cultivares de plantas, con novedosas características agronómicas. Así se han ejecutado diferentes programas de mejoramiento de arroz por cultivo de tejidos (mediante variación somaclonal y presión de selección) e ingeniería genética (*Agrobacterium*, biobalística, electroporación entre otros), en los que se han descrito eficientes protocolos de regeneración *in vitro*, tanto por organogénesis como por embriogénesis somática, siendo esta última la de mayor potencial regenerativo (Raemakers *et al.*, 1995). El mejoramiento genético a través de la presión selectiva con agentes bióticos como las toxinas, determina cambios complejos a nivel genómico, proteómico y metabolómico (Pérez-Clemente *et al.*, 2013). El estrés oxidativo como resultado del daño de los tejidos en condiciones *in vitro* determinan un incremento de radicales libres que inducen hiper o hipo metilación del ADN, cambios en el número de cromosomas, re arreglos cromosómicos, sustitución y/o delección de secuencias de ADN (Krishna *et al.*, 2016).

En la República Bolivariana de Venezuela, el INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas), Fundación para la Investigación Agrícola DANAC y otras instituciones universitarias (UCV, UCLA, UNELLEZ), han llevado a cabo distintas investigaciones enmarcadas en la producción de nuevas líneas de arroz, con 17 características genéticas favorables (resistencia a plagas, mejores niveles de rendimiento, calidad culinaria, entre otras) para las condiciones de producción, procesamiento y consumo de este cereal en el país (DANAC, 2009). En este sentido, en Venezuela, el arroz es un rubro de suma importancia en las costumbres alimenticias de la población en general, donde forma parte transcendental de la dieta diaria, aunado a que su cultivo genera una importante cantidad de puestos de trabajo (directo e indirecto) en el país y el mundo. De tal manera, es imperante el desarrollo de cultivares de arroz

tolerantes o resistentes a distintos tipos de enfermedades, particularmente la devastadora piriculariosis causada por el hongo *P. grisea*, que presenta una gran variabilidad genética, debido a la aplicación de diversos productos fungicidas tóxicos al ambiente. Así, en un estudio con 11 variedades de arroz venezolanas generadas desde la década de los 50 hasta el 2005, se encontró que a pesar del uso de fungicidas, las mismas se vieron afectadas en su rendimiento por los daños ejercidos por *P. grisea*, particularmente a nivel foliar, lo cual ratifica la rápida variabilidad genética del patógeno fúngico (Pieters *et al.*, 2011).

Este proceso es costoso y lento a través de metodologías tradicionales de mejoramiento genético, a diferencia de las técnicas biotecnológicas de última generación, que representan una alternativa viable, siendo la técnica de cultivo de tejidos basada en la presión de selección de filtrado crudo de toxinas de *P. grisea* en callos embriogénicos de arroz, una metodología factible a la hora de desarrollar cultivares resistentes a dicha enfermedad, lo cual derivaría en una mayor producción de este cereal al disminuir la incidencia del padecimiento causado por este patógeno sobre el cultivo. Asimismo, se evidenciaría un impacto positivo en la agroindustria, al no aplicar productos químicos costosos y tóxicos al ambiente, dado a que se contaría de una manera eficiente y rápida de obtener nuevas variedades resistentes a nuevas razas del hongo, reduciendo el costo final al consumidor de este importante rubro. Por lo cual, el objetivo fundamental de esta investigación fue el establecimiento de un sistema de selección *in vitro* de cultivares venezolanos de arroz (*Oryza sativa* L.) tolerantes al hongo *P. grisea*.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Sistema de regeneración por variedad de arroz; inducción, regeneración, estrés por desecación

Se utilizaron como explantes semillas maduras descascaradas de cuatro variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.), suministradas por el INIA-Portuguesa e INIA-Maracay; altamente productivas (6-7 Kg.ha<sup>-1</sup>) y de alta calidad de grano (56-59 % de granos enteros): Araure-4, Centauro y Venezuela-21 poseen alto rendimiento granífero y son resistentes al hongo *Pyricularia grisea*, mientras la variedad Cimarrón es de menor rendimiento y alta susceptibilidad (pero de alta recuperación) al hongo (Montoya *et al.*, 2007). La desinfección de las semillas se realizó en una cámara de flujo laminar horizontal (Telstar AH-100), primero lavando superficialmente en agua destilada estéril con jabón líquido (Brisol) y Tween 20 (3 gotas/100mL) durante 10 min en agitación continua; seguidamente se aplicó alcohol isopropílico al 70 % durante 1 min, seguido de cloro comercial (Nevex 5 % hipoclorito de Sodio; sin diluir) al 30 % más Tween 20 (1 gota.10mL<sup>-1</sup>) por 5 min, finalizando con tres lavados con agua destilada estéril por

5 min cada uno. Luego los explantes fueron sembrados *in vitro* en diferentes medios de cultivo, siguiendo un sistema de dos etapas (inducción y regeneración), establecido para el cultivo del arroz (Vasil, 1987). Se utilizó el medio salino de Murashige y Skoog (1962), suplementado con 2 mg.L<sup>-1</sup> de glicina, 1 mg.L<sup>-1</sup> de tiamina-HCl y 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de piridoxina-HCl (Zhuang y Jia, 1983), mioinositol 10 mg.L<sup>-1</sup> y sacarosa al 3 % para los medios de inducción y 5 % para los medios de regeneración, con Agar Powder al 1,6 %, esterilizándose a 15 lb y 121 °C (15 min). En la primera etapa (4-8 semanas), se indujo la formación del callo, utilizando medios con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) solo o combinado (1, 2, 3, 4 y 5 mg.L<sup>-1</sup>) con 2 mg.L<sup>-1</sup> de las citocininas, 6-Furfuril-aminopurina (K) o 6-Benzil-aminopurina (BA), mientras que la segunda etapa consistió en regenerar plantas a partir de callos con capacidad regenerativa (embriogénicos) inducidos en la primera fase, remplazándose el 2,4-D por 0.5 mg.L<sup>-1</sup> de ácido indolacético (AIA), combinado con 2 mg.L<sup>-1</sup> de K o BA, colocando las semillas con el escutelo (zona embrionaria) sobre el medio de cultivo de inducción en placas de Petri (diez semillas por placa; 300 semillas por tratamiento), a 30 °C, en oscuridad continua, y a luz continua (120μE/m<sup>2</sup>s<sup>-1</sup>) en la etapa de regeneración siguiendo lo establecido por Fernández y Cardona (2010) y Fernández (2012). Luego a partir de los medios óptimos de inducción y de regeneración por variedad, se optimizó el proceso regenerativo por embriogénesis somática mediante el estrés hídrico u osmótico por desecación, seleccionando callos embriogénicos (E), que se sometieron a un tratamiento de desecación (0, 24, 48 y 72 h), de acuerdo a lo planteado por Fernández (2010), sub cultivando 30 callos E por tratamiento en placas Petri estériles (diez por placa) con papel de filtro #1 en oscuridad continua y 30 °C, para luego ser repicados en los medios de regeneración respectivos en luz continua y a 30 °C.

Para determinar los medios óptimos de inducción y de regeneración por variedad, luego de cada etapa de cultivo, se calculó las frecuencias de inducción de callo total (T), callo embriogénico (E), callo no embriogénico (NE) y callo rizogénico (R), y la frecuencia de regeneración de plantas, empleando las formulas planteadas por Zaidi *et al.* (2006): Frecuencia de callo T= (# callos / #semillas sembradas) x 100; Frecuencia de callo E= (# callos E/ #semillas sembradas) x 100; Frecuencia de callo NE= (# callos NE/#semillas sembradas) x 100; Frecuencia de callo R= (# callos R/#semillas sembradas) x 100; Frecuencia de regeneración= (#callos regenerados/#callos embriogénicos cultivados) x 100.

### Caracterización morfológica y anatómicamente el proceso regenerativo por embriogénesis somática

Los estudios morfológicos e histológicos de los distintos callos desarrollados (no embriogénico, rizogénico, caulogénico y embriogénico), en particular el embriogénico que fue el sometido a la presión selectiva, se realizaron en el Centro

de Biotecnología Aplicada (CBA) del Departamento de Biología de la Universidad de Carabobo (Naguanagua-Edo. Carabobo), empleando una Lupa Leika MZ75 y un microscopio de luz Leika DM1000 acoplados con una cámara digital Canon Powershot S70. Los cortes de 0,25  $\mu\text{m}$  de las muestras de callos previamente deshidratadas en batería creciente de alcohol etílico (10, 30, 50, 70, 90 y 100 %) e incluidas parafina sintética “paraplas” (1 hora en xilol, 1 hora en 1:1 xilol-parafina, 24 horas en parafina a 63 °C), se realizaron con el micrótopo de rotación automático Leica RM2265 del CBA, tiñéndose con hematoxilina-eosina (1:1) al 1 %, efectuando el montaje semi permanente, sellando los cortes con gelatina glicerina (Johansen, 1940).

### **Sistemas de selección del filtrado crudo (FC) de *Pyricularia grisea* por variedad de arroz: incremento progresivo (IPC) y ciclo de intercambio a la misma concentración (MC)**

El cultivo de *Pyricularia grisea* se realizó primero en un medio sólido compuesto por sacarosa al 3 %, cáscaras de arroz (13g.L) y agar al 1,3 %, 2 mg.L de glicina, 1 mg.L de tiamina-HCl y 0,5 mg.L de piridoxina-HCl, a temperatura ambiente y luz continua, durante un mes. Luego se tomó mediante un asa de platino, el micelio del cultivo original después de observar un crecimiento micelial en toda la placa, removiendo cuadros de la zona periférica (micelio joven y activo con conidióforos), para cultivarse en medio líquido modificado Czapek, en un agitador continuo (P-SELECTA) a 80 rpm en oscuridad y a temperatura ambiente por dos semanas, a partir del cual se obtuvo el filtrado crudo (FC) con las toxinas fúngicas de *P. grisea*, filtrando el líquido resultante colocando sobre las fiolas tres capas de gasa clínica estéril, para eliminar en lo posible restos celulares. Posteriormente al filtrado se le aplicó un tratamiento de desproteinización adicionando Metanol en un volumen (1:1) mantenido a 5 °C, eliminando los residuos mediante papel de filtro Whatman # 40. Seguidamente para concentrar el filtrado este se colocó en un concentrador para Eppendorf al vacío a 60 °C por un periodo de 4 h hasta obtener un equivalente al 50 %. El último paso, consistió en esterilizar el filtrado mediante un milipore de 0.45 $\mu\text{m}$ , en campana de flujo laminar horizontal, almacenándose en frascos ámbar y guardándose en nevera para su subsiguiente uso en los medios de cultivo, siguiendo así el protocolo de Narayan *et al.* (1995) y Guimaraes *et al.* (1996).

La presión de selección se ejerció inoculando los callos embriogénicos en el FC, a oscuridad continua y a temperatura ambiente, en medio de inducción líquido (120 callos E; 15 por fiola de 100 ml) óptimo según la variedad, para así asegurar el mayor contacto de la toxina a las células. Tal protocolo se aplicó en dos direcciones como lo planteo El-kazzaz *et al.* (2009), estableciéndose primero la concentración mínima inhibitoria del FC, en función de la variedad de arroz, a través del porcentaje de callos embriogénicos

supervivientes (no necróticos) al estrés fúngico. En ambos protocolos se estableció un ciclo de intercambio de medio con o sin el FC (5, 10, 25, 50, 75 y 100% y el control sin filtrado), a fin de facilitar la selección y recuperación de células potencialmente resistentes, realizándose para cada cambio lavados de los callos con agua destilada estéril con el objeto de remover la toxina. En el primer sistema se evaluó el porcentaje de callos embriogénicos resistentes al filtrado fúngico crudo en función del incremento progresivo de la concentración del mismo “IPC” (siete días expuestos al FC y 15 días sin el mismo), mientras que en el segundo se determinó el porcentaje de callos embriogénicos resistentes al filtrado fúngico crudo en función del ciclo de intercambio a la misma concentración del mismo “MC” (un mes expuestos al FC, un mes sin FC y un mes con FC).

Se determinó la frecuencia de formación de callo embriogénico, necrosis y plantas regeneradas para todas las variedades estudiadas, mediante fórmulas de Zaidi *et al.* (2006): Frecuencia de callo embriogénicos  $E = (\# \text{ callos } E / \# \text{ semillas sembradas}) \times 100$ ; Frecuencia de callo E necróticos  $= (\# \text{ callos } E \text{ necróticos} / \# \text{ Callos } E \text{ cultivados}) \times 100$ ; Frecuencia de plantas regenerada  $s = (\# \text{ plantas diferenciadas} / \# \text{ callos embriogénicos cultivados}) \times 100$ .

Tanto para lo optimización del sistema regenerativo (inducción, regeneración, desecación), la caracterización morfo anatómica, así como de la presión selectiva con el FC, se utilizó un diseño completamente aleatorizado, tomando el número de muestras indicado para cada fase. Los análisis estadísticos de los procesos de inducción y regeneración, influencia de la desecación y de la toxina de *P. grisea*, se basaron en la aplicación del modelo lineal aditivo, junto con el Análisis de Varianza (ANOVA) mediante el programa estadístico Statistic v 17.0.

### **RESULTADOS**

En la etapa de inducción, al ensayar medios suplementados con 2,4-D sólo o combinado con K o BA, se encontraron distintas frecuencias de callogénesis para las cuatro variedades de arroz. Las de callo total (T) oscilaron entre 10-75 % para Araure-4 y 45-74 % para Cimarrón (Tabla 1), mientras que para Centauro y Venezuela-21, estuvieron entre 52-90 % y 51-86 % respectivamente (Tabla 2). Para callo no embriogénico (NE), en Araure-4 estuvo entre 5-64 % y en Cimarrón entre 26-96 % (Tabla 1), a diferencia de Centauro con 40-76 % y en Venezuela-21 con 44-85 % (Tabla 2). Con el callo rizogénico (R) se observó una tendencia similar, con una frecuencia de 4-33 % para Araure-4 y 25-89 % para Cimarrón (Tabla 1), mientras en Centauro fue 14-81 % y en Venezuela-21 fue de 15-86 % (Tabla 2). Por último, la frecuencia de callo embriogénico (E) estuvo entre 5-64 % para Araure-4 y 4-58 % para Cimarrón (Tabla 1), a diferencia de Centauro y Venezuela-21, que presentaron una frecuencia de 20-65 % y 20-81 % respectivamente (Tabla 2), resaltándose el hecho que el mayor desarrollo del callo E, se evidenció

en todos las variedades a las menores concentraciones de la auxina 2,4-D (1-3 mg.L-1) solo o combinado con las citocininas K o BA. Así para la variedad Araure-4 se halló un 30 % de callo E en 3 mg.L-1 de 2,4-D, 64 % en el medio con 2,4-D 1 mg.L-1+ K 2 mg.L-1 y 30 % en 2,4-D 1 mg.L-1 + BA

2 mg.L-1 (Tabla 1). Para Cimarrón, se observó un 40 % con 2,4-D 1 mg.L-1, 58 % en 2,4-D 3 mg.L-1+ K 2 mg.L-1 y 39 % en 2,4-D 3 mg.L-1 + BA 2 mg.L-1 (Tabla 1). En la variedad Centauro, se encontró un mayor porcentaje de callo E, en el medio con 2,4-D 1 mg.L-1 combinado con 2 mg.L-1 de K o

**Tabla 1.** Frecuencias de inducción de las variedades Araure-4 y Cimarrón.

Reguladores de crecimiento (mg/l)		Frecuencia (%)							
		Total		NE		R		E	
2,4-D	Citocinina	V1	V2	V1	V2	V1	V2	V1	V2
1		55	60	30	70	25	86	24	40*
2		20	48	22	83	20	89	25	30
3	-	45	45	35	33	33	35	30*	29
4		20	50	25	26	20	38	18	28
5		10	50	11	39	15	25	6	27
1		75	80	72	65	33	70	64*	31
2		75	70	64	54	20	32	30	28
3	2 K	30	74	33	64	21	51	32	58*
4		48	69	31	69	25	57	30	24
5		12	57	5	55	4	40	10	25
1		44	71	41	69	10	70	30*	29
2		43	79	37	84	5	50	18	27
3	2 BA	34	72	34	92	4	82	19	39*
4		37	50	12	96	9	59	18	9
5		11	53	7	93	8	58	5	4

I: medio de inducción; V1: Araure-4; V2: Cimarrón; \*: diferencias significativas  $p < 0,05$ .

**Tabla 2.** Frecuencias de inducción de las variedades Centauro y Venezuela-21.

Reguladores de crecimiento (mg/l)		Frecuencia (%)							
		Total		NE		R		E	
2,4-D	Citocinina	V3	V4	V3	V4	V3	V4	V3	V4
1		80	86	61	79	40	85	40	81*
2		75	85	54	85	39	86	48	40
3	-	88	66	46	59	32	66	59*	43
4		90	73	52	69	20	60	25	44
5		84	72	62	73	19	61	20	40
1		71	70	64	67	65	62	65*	63*
2		80	82	78	72	35	36	39	40
3	2 K	67	66	62	65	61	60	42	43
4		65	68	76	75	53	55	40	40
5		72	70	43	41	30	34	30	32
1		81	83	73	72	69	66	65*	63*
2		80	82	62	59	42	39	40	41
3	2 BA	88	86	72	73	81	80	25	23
4		60	60	52	53	14	15	26	22
5		52	51	40	44	17	16	24	20

I: medio de inducción; V3: Centauro; V4: Venezuela-21; \*: diferencias significativas  $p < 0,05$ .

BA (65 %) y en 2,4-D 3 mg.L-1 (59 %) (Tabla 2). Al final, en la variedad Venezuela-21 se halló que el mayor porcentaje (81 %) de callo E, estuvo en el medio suplementado con 1 mg.L-1 de 2,4-D, seguido por 63 % observado en medios con 1 mg.L-1 de 2,4-D con 2 mg.L-1 de K o BA (Tabla 2).

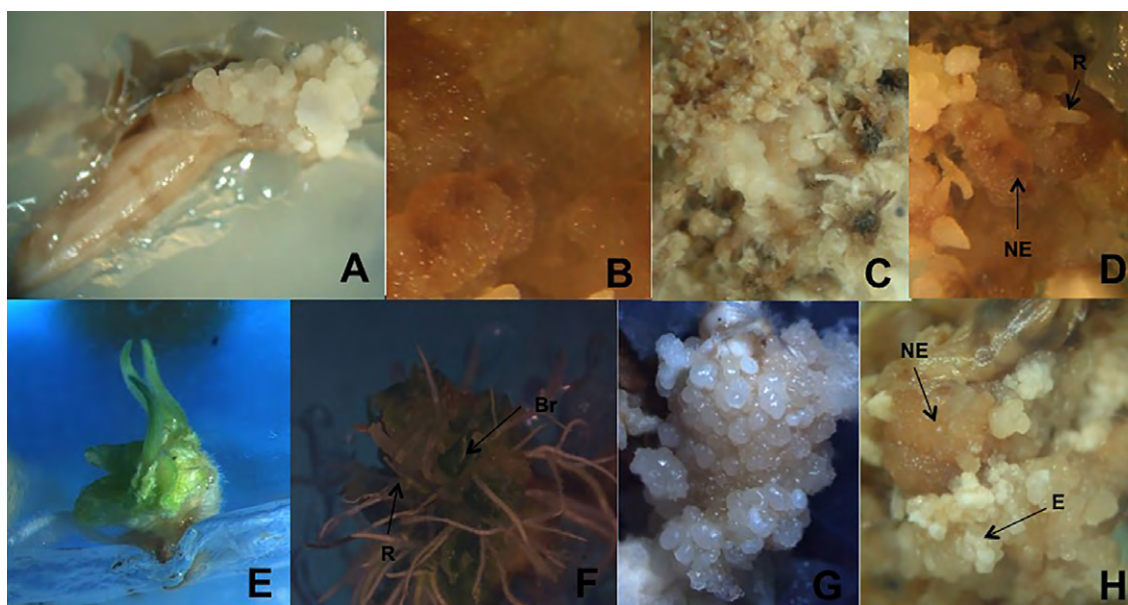
Con respecto a la fase regenerativa, al evaluar los resultados de dos medios de regeneración con o sin estrés hídrico, también se encontró una respuesta diferencial en función de la variedad, evidenciándose la diferenciación de plantas entre 9-52 %, con un promedio de 3.2-22.1 plantas por callo E, siendo mayor ésta en el medio que esta suplementado con 2 mg.L-1 de BA, particularmente con estrés osmótico por desecación. Así con Araure-4 se

regenero un 39 % (15.9 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de K y 49 % (20,0 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de BA, Cimarrón un 38 % (15.7 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de K y 52 % (22.1 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de BA y Venezuela-21 un 34 % (15.4 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de K, 48 % con 2 mg.L-1 de BA (21.2 plantas/callos), todas a 24 horas de estrés, a diferencia de Centauro que proliferaron plántulas en un 37 % (16.1 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de K y 44 % (19.5 plantas/callos) con 2 mg.L-1 de BA a 48 horas de estrés (Tabla 3). Las plantas regeneradas, son producto de la germinación de embriones somáticos desarrollados en callos embriogénicos (Fig. 3A), diferenciándose plántulas completas (Fig. 3B-C), hasta formar macollas (Fig. 3D).

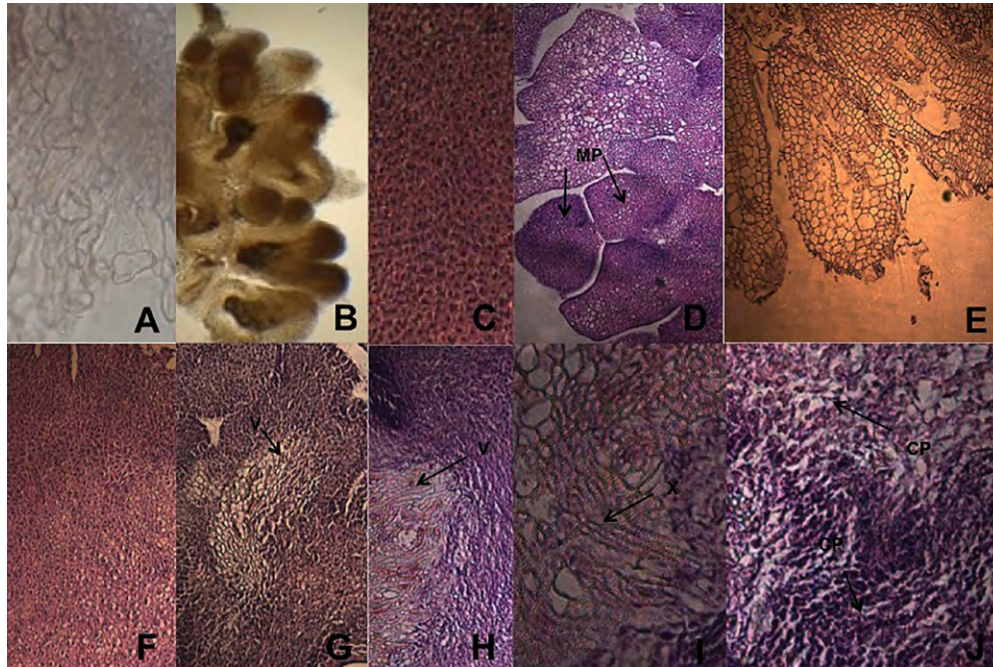
**Tabla 3.** Frecuencias de regeneración de plantas de las variedades Araure-4, Cimarrón, Centauro y Venezuela-21.

Reguladores de crecimiento (mg/l)		Estrés Osmótico (horas)	Frecuencia de regeneración (%)				Promedio de regeneración de plantas (plantas/callos)			
AIA	Citocinina		V1	V2	V3	V4	V1	V2	V3	V4
0.5	2 K	0	30	29	28	10	7,4±0,9	8,2±0,7	7,5±0,5	7,3±0,4
		24	39*	38*	32	34*	15,9±0,5*	15,7±0,6*	8,3±0,3	15,4±0,6*
		48	12	13	37*	11	3,3±0,5	3,4±0,5	16,1±0,5*	3,2±0,4
		72	-	-	-	-	-	-	-	-
	2 BA	0	35	26	28	20	7,5±0,8	8,3±0,4	8,1±0,3	8,5±0,5
		24	49*	52*	36	48*	20,0±0,3*	22,1±0,2*	8,3±0,3	21,2±0,8*
		48	13	9	44*	10	3,3±0,2	3,4±0,4	19,5±0,1*	3,2±0,6
		72	-	-	-	-	-	-	-	-

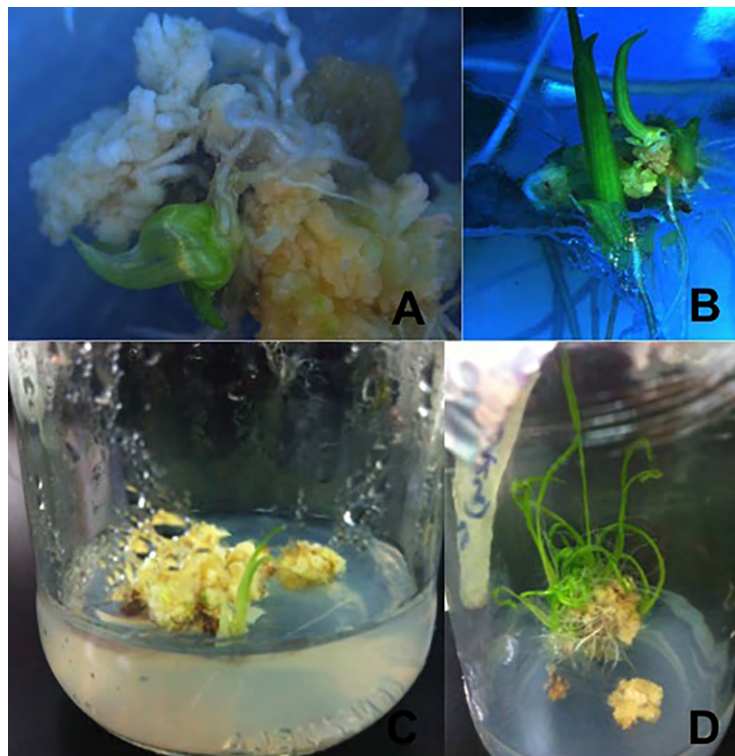
R: medio de regeneración; V1: Araure-4; V2: Cimarrón; V3: Centauro; V4: Venezuela-21; (-) sin diferenciación; \*Diferencia significativa con  $p < 0,05$ .



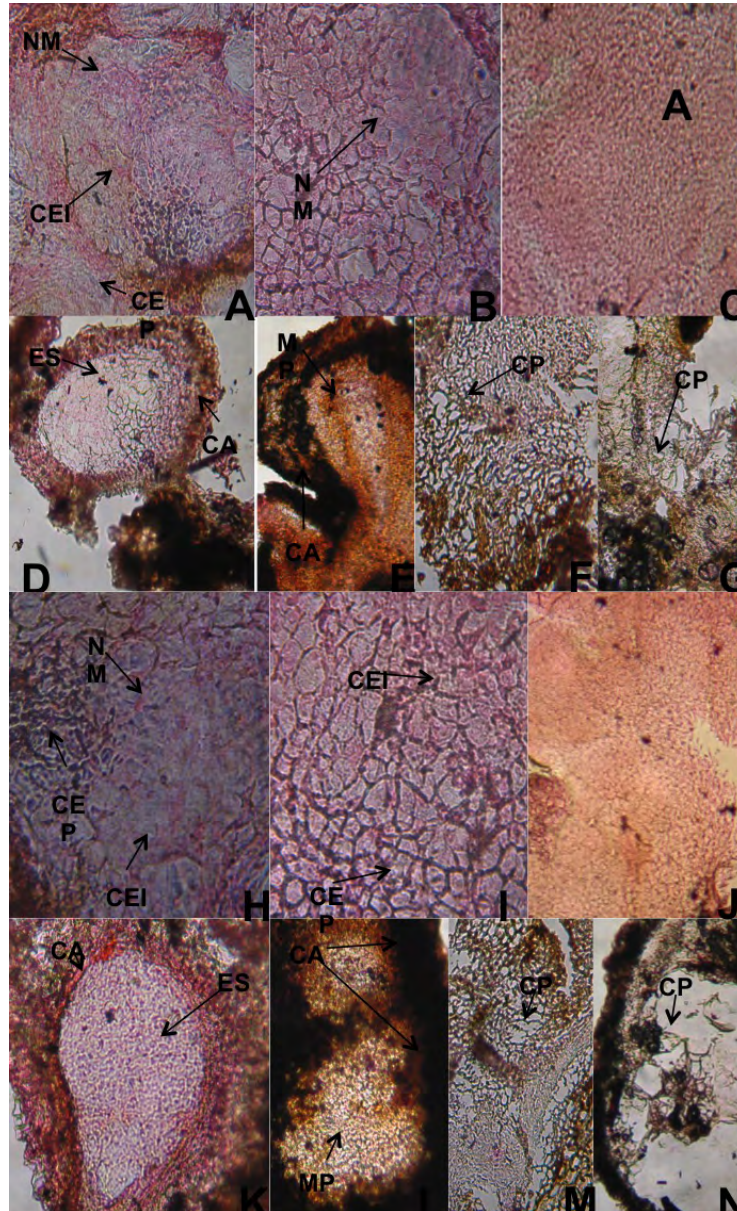
**Figura 1.** Estudio morfológico de la inducción de callo a partir de semillas maduras de arroz (*Oryza sativa* L.). A. Desarrollo de callo en la zona escutelar de la semilla. B. Callo no embriogénico (NE). C. Callo rizogénico (R). D. Callo mixto (Ne y R). E. Callo caulogénico (con brotes). F. Callo mixto (Brotos y R). G. Callo embriogénico (E). H. Callo mixto (E y NE).



**Figura 2.** Estudio histológico de la inducción de callo y el estrés hídrico por desecación. **A.** Células irregulares y alargadas del callo no embriogénico (NE) (400X). **B.** Múltiples primordios del callo rizogénico (R) (200X). **C.** Células embriogénicas típicas (400X). **D.** Masas pro embriogénicas del callo (E) (200X). **E.** Embriones somáticos aislados del cuerpo proembriogénico (400X). **F.** Callo embriogénico a 0 estrés hídrico (200X). **G.** Callo embriogénico a 24 h de estrés hídrico (200X). **H.** Callo embriogénico a 48 h de estrés hídrico (200X). **I.** Vasos xilemáticos en callos sometidos a desecación. **J.** Callo embriogénico a 72 h de estrés hídrico (200X). **CP:** Células plasmolizadas. **MP:** Masas pro embriogénicas. **V:** tejido vascular. **X.** Vasos xilemáticos.



**Figura 3.** Regeneración de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) por embriogénesis somática. **A.** Germinación de embrión somático en callo E. **B.** Plántulas completas, distinguiendo el vástago y las raíces. **C.** Planta diferenciada en el callo E. **D.** Macolla de plantas desarrolladas en el callo E.



**Figura 4.** Estudio histológico del estrés ejercido por el del filtrado crudo (FC) de *Pyricularia grisea*, en callo embriogénico (E) de la variedad Araure-4 (A-G) y Cimarrón (H-N). A-H. 0 % del FC. B-I. 5 % del FC. C-J. 10 % del FC. D-K. 25 % del FC. E-L. 50 % del FC F-M. 75 % del FC. G-N. 100 % del FC. (400X). CEP. Células embriogénicas periféricas. CEI. Células embriogénicas internas. NM. Nódulo meristemático. CA. Capa de células necróticas. MP. Masa proembriogénica. ES. Embrión somático. CP. Células plasmolizadas.

Con respecto a la caracterización morfo anatómica del proceso regenerativo, se observó que este fue indirecto, ya que las plantas se diferenciaron a partir de callo. Esta masa celular sin diferenciación alguna, se desarrolló de la zona embrional de la semilla, en particular del escutelo (Fig. 1A). Se distinguió un heteromorfismo callogénico, ya que se encontraron diferentes tipos de callo: callo no embriogénico (NE), callo rizogénico (R), callo caulogénico o con brotes (Br) y callo embriogénico (E), siendo común hallar callos de naturaleza mixta, producto de la combinación de dos o

más tipos de callo. Los callos NE, fueron “friables” (término clásico que representa una consistencia suave de fácil disgregación), de superficie irregular y de color amarillo claro, pudiendo en su mayoría estar acompañados en menor proporción por callo E (Fig. 1B), histológicamente está conformado por células pequeñas de forma irregular y alargada, de citoplasma poco denso (Fig. 2A). Los callos R, de apariencia compacta, con variada coloración, desde blanco, amarillo hasta marrón claro, con una superficie conformada por raíces alargadas, densamente cubiertas de



pelos radiculares (Fig. 1C), combinado muchas veces con callo NE (Fig. 1D), observándose anatómicamente como un agrupamiento de primordios radiculares, conformados por células irregulares pequeñas (Fig. 2B). El callo caulogénico es compacto, de apariencia foliosa y de coloración verdosa (Fig. 1E), combinado algunas veces con callo R (Fig. 1F). Los callos E, fueron compactos, de superficie lisa, de apariencia globular y de color blanco crema (Fig. 1G), combinado muchas veces por callo NE (Fig. 1H), anatómicamente presenta células de forma isodiamétrica pequeñas, densas en citoplasma, núcleo prominente y gran cantidad de gránulos de almidón (Fig. 2C), constituyendo grandes masas proembriónicas (Fig. 2D), a partir de las cuales se diferencian en la mayoría de los casos, embriones somáticos individuales con una epidermis uniestratificada, denotándose el origen unicelular de los mismos (Fig. 2E). Al someter los callos embriónicos al estrés hídrico, las células meristemáticas típicas del mismo ya descritas (Fig. 2F), se tornaron más densas en su contenido citoplasmático (en particular en gránulos de almidón), a medida que era mayor el tiempo de desecación, aunado a incremento de densidad de tejido vascular a 24 (Fig. 2G) y 48 h (Fig. 2H), particularmente vasos xilemáticos (Fig. 2I), y agrupaciones de células plasmolizadas en 72 h (Fig. 2I).

Al evaluar el efecto de la presión de selección del filtrado crudo (FC) de *P. grisea* en el desarrollo de callo E, se encontró

que a medida que se incrementaba la concentración del FC disminuía la frecuencia de callo E viable (sin necrosis, con crecimiento continuo, de células embriónicas), dado que el estrés ejercido por las toxinas fúngicas afectan las células del callo, generando gran cantidad de compuestos fenólicos que tornan el callo de consistencia compacta y de color blanco crema a uno laxo de fácil disgregación y de color marrón a negro, facilitando así la necrosis del mismo. Así se observó que en el sistema selectivo a la misma concentración de FC (MC), la disminución de callo E estuvo entre 65 y 25 % para Araure-4, 73 y 23 % para Cimarrón, 56-24 % para Centauro y 53-13% para Venezuela-21, no desarrollándose callo E, a partir de 50 % en todas las variedades, excepto para Centauro que fue desde de 25%, mientras que para el sistema selectivo por incremento progresivo de concentración del FC (IPC), la merma fue de 68 y 11 % para Araure-4, 65 y 15 % para Cimarrón, 62-25 % para Centauro y 65-5 % para Venezuela-21, sin proliferación de callo E, a partir de 75% a excepción de Centauro que fue a 50 %. De tal manera, que esta respuesta se dio independientemente de la variedad de arroz y sistema de selección, no obstante, el efecto fue mayor con el método MC, donde la concentración mínima inhibitoria (CMI) estuvo en 50 % del FC, a diferencia del método IPC que la CMI fue a 75 % del FC, menos Centauro que fue a 25 y 50 % respectivamente (Tabla 4). De igual forma, hay que destacar que las variedades susceptibles

**Tabla 4.** Frecuencia de proliferación de callo embriónico (E) y promedio de plantas regeneradas por callo E por variedad, en función del tipo de presión selectiva.

Presión de selección	Concentración FC (%)	Frecuencia de callo E (%)				Promedio de regeneración de plantas			
		V1	V2	V3	V4	V1	V2	V3	V4
MC	0	65	73	56	53	14±0,1	13.3±0,2	13.1±0,3	13.4±0,2
	5	39	41	32	34	14±0,2	13.5±0,1	12.7±0,2	12.2±0,3
	10	29	36	24*	21	13±0,3	13.2±0,3	1.6±0,4	2.0±0,1
	25	25*	23*	-	13*	2.5±0,2*	2.4±0,3*	-	1.5±0,4
	50	-	-	-	-	-	-	-	-
	75	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-
IPC	0	68	65	62	65	13.2±0,2	13.0±0,2	12.9±0,5	13.6±0,5
	5	49	54	35	44	13.7±0,3	13.6±0,1	12.8±0,6	12.6±0,4
	10	39	48	34	36	13.7±0,4	13.4±0,4	12.5±0,3	12.5±0,2
	25	38	39	25*	19	3.6±0,1	3.4±0,5	1.6±0,2*	2.6±0,3
	50	11*	15*	-	5*	2±0,5*	1.5±0,3*	-	1±0,2*
	75	-	-	-	-	-	-	-	-
	100	-	-	-	-	-	-	-	-

**MC: Cambios** a la misma concentración del FC (Filtrado crudo de *P. grisea*); **IPC:** Incrementos progresivos en la concentración del FC. V1: Araure-4; V2: Cimarrón; V3: Centauro; V4: Venezuela-21; \*: diferencias significativas  $p < 0,05$ : en comparación a la misma concentración y misma variedad.

Araure-4 y Cimarrón demostraron una mejor respuesta al registrar mayores frecuencias de desarrollo de callos E y por ende menor porcentaje de necrosis, con respecto a Venezuela-21 y Centauro para ambos sistemas aplicados.

Con respecto al promedio de plantas regeneradas, la respuesta es similar a la descrita con el desarrollo de callo E, en función de los sistemas de presión de selección de FC, donde la diferenciación de plantas disminuye a medida que se incrementa la concentración del FC. Por lo cual, con el método MC, el descenso de plantas regeneradas por callo E oscilo de 4 y 2.5 plantas/callos para Araure-4, 3.3 y 2.4 plantas/callos para Cimarrón, 3.1-1.6 plantas/callos para Centauro y 3.4-1.5 plantas/callos para Venezuela-21, no regenerándose plantas, a partir de 50 % en todas las variedades, excepto para Centauro que fue desde 25 %, mientras que para el método IPC, el declive fue 3.2 y 2 plantas/callos para Araure-4, 3 y 1.5 plantas/callos para Cimarrón, 2.9-1.6 plantas/callos para Centauro y 3.6-1 plantas/callos para Venezuela-21, sin diferenciación de plantas, a partir de 75 % a excepción de Centauro que fue a 50 %. Así, La respuesta regenerativa fue independiente a la variedad de arroz y metodología de selección, con un grado de significancia de  $p < 0,05$ , ratificando el hecho que para Araure-4, Cimarrón y Venezuela-21, la CMI fue 50 % y 75 % para el método MC y IPC respectivamente, a diferencia de Centauro que fueron menores, 25 % para MC y 50 % para IPC respectivamente (Tabla 4). Es importante resaltar, que las variedades resistentes, Centauro y Venezuela-21,

mostraron una menor respuesta regenerativa, al tener los promedios regenerativos más bajos, en relación a Araure-4 y Cimarrón para ambos sistemas aplicados.

Al analizar la comparación entre la concentración del FC y la proliferación de callo E con respecto al método de presión selectiva, se evidencia un mayor porcentaje de callos regenerativos, al realizar exposiciones de los mismos a incrementos progresivos con y sin la toxina (IPC), encontrándose diferencias significativas con un  $p < 0,05$ , para Araure-4, Cimarrón y Venezuela-21 al 50 % y Centauro al 25 % (Tabla 5).

Al realizar los análisis histológicos en callos embriogénicos de las cuatro variedades de arroz, sometidos al FC de *P. grisea*, con ambos sistemas selectivos, se evidenció una leve diferencia en las características e integridad de las células de los cuerpos pro embriogénicos o embriones somáticos diferenciados. De tal manera, se observó que las células embriogénicas se ubicaron en la parte externa del callo, mientras que en la parte interna las células fueron más grandes y con poco contenido citoplasmático, resaltándose el hecho que a bajas dosis del FC, las células meristemáticas se tornaban más densas en su contenido citoplasmático, particularmente en gránulos de almidón (Figs. 4AB-5HI), mientras que si la concentración del FC era mayor (a partir de 10 %), dichas células se observaban necróticas en la parte externa del callo, conformando una capa que encapsulaba las masas proembriogénicas, nódulos meristemáticos y embriones somáticos, pareciendo un mecanismo anatómico de

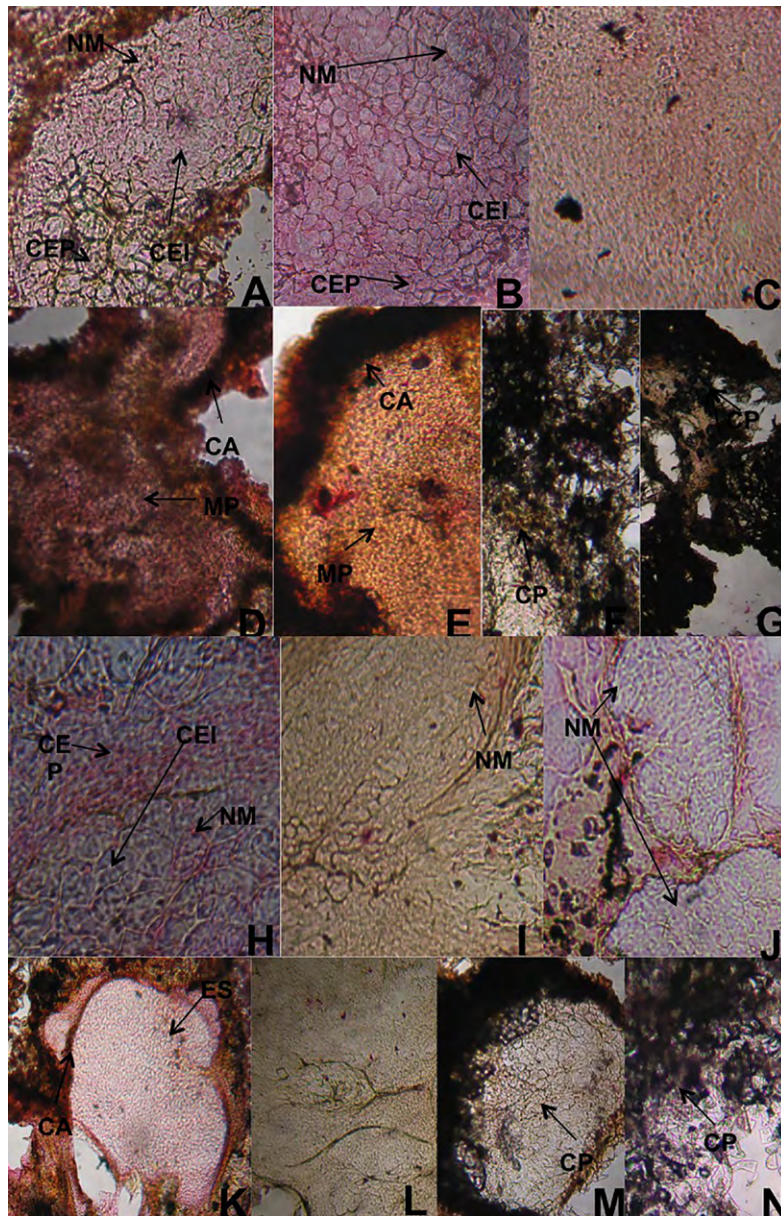
**Tabla 5.** Comparación entre la concentración del FC y la producción de callo regenerativo en relación al método de presión de selección.

Variedad	Comparación entre concentraciones	P
V1	5% (MC) y 5% (IPC)	0,05
	10% (MC) y 10% (IPC)	0,04
	25% (MC) y 25% (IPC)	0,03
	50% (MC) y 50% (IPC)	0,001*
V2	5% (MC) y 5% (IPC)	0,03
	10% (MC) y 10% (IPC)	0,04
	25% (MC) y 25% (IPC)	0,25
V3	50% (MC) y 50% (IPC)	0.011 *
	5% (MC) y 5% (IPC)	0,07
	10% (MC) y 10% (IPC)	0,05
	25% (MC) y 25% (IPC)	0,003*
V4	50% (MC) y 50% (IPC)	-
	5% (MC) y 5% (IPC)	0,06
	10% (MC) y 10% (IPC)	0,08
	25% (MC) y 25% (IPC)	0,37
	50% (MC) y 50% (IPC)	0,004*

**V1:** Araure-4; **V2:** Cimarrón; **V3:** Centauro; **V4:** Venezuela-21; **MC:** Cambios a la misma concentración del FC; **IPC:** Incrementos progresivos en la concentración del FC (Filtrado crudo de *P. grisea*). \* Diferencia significativa: donde  $p < 0,05$ .

protección, aunado a la mayor presencia de tejido vascular en la zona interna del callo (Figs. 4CD-5JK), necrosándose y plasmolizándose parcialmente a partir de 50 % y totalmente en 100 % (Figs. 4EFG-5LMN). Este hecho es más notable a partir de 10 % del FC en ambos sistemas de presión de selección evaluados, no obstante, es mucho más evidente con el sistema MC. Asimismo, a medida que se incrementa la concentración del FC en los dos sistemas aplicados, se detalló una mayor degradación celular independientemente del método de presión de selectiva, siendo ésta más evidente y

rápida en las variedades resistentes (Centauro y Venezuela-21), aspectos no observados en los tratamientos sin FC (control) (Figs. 4AH-5AH). De igual manera, se encontró un mayor desarrollo de tejido vascular, particularmente agrupaciones de vasos xilemáticos, a partir de 10 % o 25 % del FC. También se pudo observar la presencia de abundantes gránulos de almidón en las células de las masas proembriogénicas de los callos, sometidos al contacto con el FC desde 10 % hasta a 50 % en la variedad Cimarrón y en menor proporción en Araure-4 (ambas susceptibles) (Figs. 4CDEJKL), siendo



**Figura 5.** Estudio histológico del estrés ejercido por el del filtrado crudo (FC) de *Pyricularia grisea*, en callo embriogénico (E) de la variedad Centauro (A-G) y Venezuela-21 (H-N). A-H. 0 % del FC. B-I. 5 % del FC. C-J. 10 % del FC. D-K. 25 % del FC. E-L. 50 % del FC F-M. 75 % del FC. G-N. 100 % del FC. (400X). CEP. Células embriogénicas periféricas. CEI. Células embriogénicas internas. NM. Nódulo meristemático. CA. Capa de células necróticas. MP. Masa proembriogénica. ES. Embrión somático. CP. Células plasmolizadas.

estas variedades las que expresaron la mayor resistencia y frecuencia de regeneración de plantas en comparación a las variedades resistentes Venezuela-21 y Centauro.

## DISCUSIÓN

El establecimiento de un eficiente sistema de regeneración *in vitro* en cereales, consta de dos fases, la primera de inducción de la competencia embriogénica y la segunda consiste en la regeneración de plantas (Fernández y Cardona, 2010; Fernández, 2012). En este sentido se indujo la producción de callos embriogénicos (primera fase), a partir de la zona escutelar de las semillas de arroz, ya que se ha demostrado que es un excelente explante por su alta totipotencia en la producción de embriones somáticos (Fernández y Cardona, 2010; Fernández, 2012). Entre los factores fundamentales más importantes en la inducción de callo embriogénico, está el genotipo y la concentración, tipo y combinación de reguladores de crecimiento, en particular el balance auxina/citocinina (Shahsavari *et al.*, 2010; Kadhim *et al.*, 2014). Así por lo general en la primera fase se emplean una auxina sola (Shahsavari, 2010; Ghobeishavi *et al.*, 2015) o combinada con otra auxina (Roly *et al.*, 2014) o una citocinina (Dissanayaka y Dahanayake, 2014), mientras que en la segunda etapa se utiliza una baja dosis de auxina combinada con una citocinina (Ghobeishavi *et al.*, 2015) o dos (Mahajan y Sharma, 2015).

La respuesta fisiológica diferencial en la producción de callos en función de las diferentes variedades, ya ha sido reportado en estudios anteriores, señalando la principal influencia de reguladores del crecimiento como el 2,4-D, solo o combinado con citocininas, hormonas esenciales en la inducción callogénica en cereales y en particular en arroz (Kadhim *et al.*, 2014), aunado al balance exógeno y endógeno de auxinas y citocininas (Ilahi *et al.*, 2005). De tal manera, que es típico en variedades de arroz Indica, el favorecimiento de la embriogénesis somática a bajas dosis de auxinas, en particular entre 1-3 mg. L<sup>-1</sup> (Fernández y Cardona, 2010; Fernández, 2012). Además, de esto la edad o vigor del explante en conjunto con el linaje genético, son uno de los principales factores que pueden incrementar la inducción de callos embriogénicos (Joyia y Khan, 2012), determinando que la alta variabilidad genotípica está relacionada a la amplia y diversa respuesta de inducción entre las variedades, tal como lo describieron Fernández y Cardona (2010) y Fernández (2012).

Como en la mayoría de los cereales, bajo condiciones similares de cultivo *in vitro*, en arroz, se observan distintos tipos de callos: Embriogénico (E), No embriogénico (NE) y organogénico (rizogénico y caulogénico), así como combinaciones de ellos, representando una extensa heterogeneidad morfológica, que puede estar relacionada con la capacidad regenerativa, tal como lo ha descrito, Fernández y Cardona (2010) y Fernández (2012). Asimismo, las elevadas y diferenciales respuestas regenerativas en

función del cultivar, ratifican los hallazgos encontrados por diferentes investigadores, que evidencian altas frecuencias de regeneración en cultivares de arroz indica, al emplear medios suplementados con BA entre 2 mg.L<sup>-1</sup> (Jan *et al.*, 2001) y 2,5 mg.L<sup>-1</sup> (Tariq *et al.*, 2008) en callos embriogénicos, caracterizados por presentar una gran cantidad de masas proembriogénicas (Ge *et al.*, 2006), las cuales exhiben centros meristemáticos, como nódulos o sacos de células pequeñas con mayor contenido citoplasmático, que son capaces de originar embriones somáticos (Bevitori *et al.*, 2014).

Cualquier estrés biótico o abiótico, afecta el grado de desarrollo del callo embriogénico, y con ello su capacidad regenerativa tanto en organogénesis como de embriogénesis somática, pudiendo esto estar relacionado con el estatus hídrico fisiológico a nivel celular, aumentando la acumulación de gránulos de almidón, previa a la transferencia a medio de regeneración. Dicho almidón posiblemente será fuente de energía para el desarrollo de plantas, ya que éste desaparece en esa fase, aumentando la actividad de enzimas hidrolíticas y el nivel de glucosa libre (Huang y Liu, 2002). Asimismo, la presencia de elementos vasculares, indica que el callo se está citodiferenciando, siendo importantes para el transporte de los nutrientes necesarios para el desarrollo del mismo, así como de estructuras regenerativas tales como embriones somáticos, brotes y raíces (Sangduen y Klamsomboon, 2001). En este orden de ideas, nuestros resultados reafirman el planteamiento anteriormente descrito, aunado al hecho que los callos embriogénicos sometidos a estrés hídrico por desecación, presentaron incremento en el número de embriones somáticos diferenciados, tal como se ha descrito en trabajos previos de nuestra autoría (Fernández, 2010; Fernández y Cardona, 2010).

La presión de selección por cultivo de tejidos es una herramienta sencilla, rápida y económica de obtener líneas celulares resistentes y/o tolerantes a algún estrés biótico o abiótico, utilizando para ello agentes selectivos relacionados al mismo. Esta metodología se fundamenta en la inducción de variaciones genéticas estables conocida como variación somaclonal, ya sea a nivel de células, como de tejido, órgano o planta completa. No obstante, su limitación es la poca correlación entre la capacidad regenerativa y los mecanismos que operan en la adquisición de la tolerancia al estrés, de tal manera, que es factible la aparición en células no tolerantes, del fenómeno de adaptación epigenética (principalmente originado por cambios en la metilación del ADN) que solo es heredable por mitosis, que enmascara las variaciones deseables, realmente estables y heredables tanto por mitosis como por meiosis. Para evitar la aparición de estas células adaptadas epigenéticamente, se debe recurrir a intervalos de estrés cortos o una sola fase con el agente selectivo (Rai *et al.*, 2011). Asimismo, se plantean que existen algunos mecanismos de resistencia a toxinas fúngicas pueden basarse en la capacidad de un gen *R*, para inactivar

una toxina, la cual generalmente induce los síntomas de la enfermedad o inhibe la inducción de la respuesta de defensas activas a nivel de la planta, ya sea a través de la expresión de proteínas relacionadas a la patogénesis, péptidos antifúngicos o fitoalexinas. Es importante resaltar que algunas variedades metabolizan más toxinas (como el ácido picolínico) que otras. Por otra parte, la elección del nivel de la planta apropiada, juega un papel importante en el desarrollo óptimo del sistema de regeneración previamente establecido y en la correlación entre la resistencia expresada *in vivo* e *in vitro* (Slavov, 2005; Rai *et al.*, 2011). Aunado a ello, Barreto (1993), señala que callos de tabaco (*Nicotiana tabacum*) sometidos a un filtrado tóxico de *S. rolfsii*, mantuvieron sus características, crecimiento y capacidad regenerativa, mientras que Ganesan y Jayabalan (2006), indican que incrementos en la concentración de un filtrado de *Fusarium oxysporum*, promueve una disminución en la viabilidad de callos de algodón (*Gossypium hirsutum*) los cuales se tornaron de un color marrón oscuro y se necrosaron, disminuyendo los promedios regenerativos, a diferencia de Fernández *et al.* (2000), que sugieren la habituación o escape de los efectos del FC de *Colletotrichum lindemuthianum*, a bajas concentraciones del mismo, en callos embriogénicos de *Phaseolus vulgaris*.

Las diferencias de respuesta al estrés entre las cuatro variedades de arroz evaluadas en este trabajo, puede deberse al genotipo y las condiciones fisiológicas de los explantes, los cuales son factores que inciden directamente en la regeneración, así como a un desbalance exógeno y/o endógeno de las concentraciones de reguladores de crecimiento como las auxinas y citocininas, (Michaux-Ferriere y Carrión, 1989). Asimismo, nuestros resultados concuerdan con los obtenidos por Chand *et al.* (2008) en *Hordeum vulgare*, donde señalan la existencia de una correlación lineal entre las concentraciones de fitotoxinas parcialmente purificadas y la mortalidad de los cultivos de embriones somáticos. De igual manera se relaciona la necrosis a la producción de etileno en respuesta a la toxina fúngica, particularmente en variedades susceptibles, mientras que en las resistentes es minimizado por mecanismos moleculares de neutralización (Chand *et al.*, 2008). En este sentido, desde el punto de vista morfológico la capacidad regenerativa de los callos y la concentración de la toxina están inversamente relacionados, donde se visualiza un menor porcentaje de callos embriogénicos por el aumento de la necrosis de los mismos a medida que se incrementa la dosis de toxina, siendo mayor este fenómeno en variedades susceptibles, en particular a concentraciones superiores al 50 %, tal como lo indicaron Bay *et al.* (1997) en variedades de arroz de Vietnam. No obstante, en las células tolerantes al estrés, a nivel molecular se observa la activación de mecanismos génicos de resistencia dada la aparición de patrones enzimáticos relacionados, como Esterasas y Alcohol deshidrogenasas, tal como lo indicaron

El-Banna y Khatab (2012) al caracterizar somaclones de arroz resistentes a la *P. grisea*, derivados del cultivo de tres semanas en filtrado crudo del hongo.

La respuesta diferencial en el proceso regenerativo se podría deber a que la resistencia a *P. grisea* en arroz, podría estar relacionado con la presencia de un par de genes heterocigotos y dichas variaciones pueden ser atribuidas a la inducción de mutaciones (variaciones somaclonales), dentro de las células del callo, encontrándose un mosaicismo en el mismo, los cuales están conformados por células resistentes y sensibles, coincidiendo nuestros hallazgos a lo descrito por El-Kazzaz *et al.* (2009), al aplicar el método de presión de selección paso a paso, basado en la exposición de los callos a ciclos de presión con concentraciones iguales (MC) y concentraciones crecientes (IPC) del filtrado fúngico, intercalados por periodo de recuperación de los explantes en medios libres del FC, en dos variedades de arroz (Giza 176 y Riho). Con respecto al tratamiento MC, no obtuvieron resultados a concentraciones mayores al 5% para ambos genotipos estudiados, mientras que con el IPC obtuvieron callos regenerativos a concentraciones de 50 y 100 %, concluyendo que este segundo método es más efectivo y rápido en inducir la producción de callos que no se adaptan al cultivo filtrado, pero que son tolerantes a ellos, lo que disminuye el mosaicismo celular, permitiendo así un mayor desarrollo de células potencialmente resistentes al medio selectivo, lo cual garantizaría en mayor medida la estabilidad de la resistencia de los callos o plantas. De igual manera, nuestros resultados se asemejan a los obtenidos por Uchiyama *et al.* (1984) en arroz, señalando que la respuesta de los callos de variedades resistentes y susceptibles cultivados con ácido tenuazonico (producto de un cultivo filtrado), fue distinta a la respuesta expresada en las hojas de plantas maduras, no siendo igual la resistencia expresada *in vivo* en plantas y en *in vitro* en callos, debido la expresión diferencial de los genes *R*. Así mismo, Cornide *et al.* (1995), señalan que la metabolización y la posterior inactivación de las toxinas producidas por *P. grisea*, se produce como consecuencia de la desintegración por parte de la planta de componentes tóxicos contenidos en los filtrados, en un periodo de tiempo de 4 a 5 días, debido a la conversión de estas toxinas en un éster metílico no tóxico, explicándose el hecho de la no correlación entre la resistencia al FC a nivel de la planta y no del callo. Otros investigadores como Prabhu y Rush (1997), señalan que el efecto estimulador del ácido picolínico de *P. grisea*, en el crecimiento de callos de cultivares de arroz altamente susceptibles, muestran una alta resistencia a la toxina, en contraste con cultivares altamente resistentes que expresan baja sensibilidad, lo que señala una ausencia de correlación entre la resistencia a la toxina en callos y la planta hospedadora resistente al patógeno, lo cual, podría estar relacionado al mecanismo de defensa, que en plantas de arroz se conoce como inhibición respiratoria, sin embargo, es poco conocido si esto ocurre a

nivel de callos, por lo que se infiere que el efecto letal de la toxina depende de la variedad.

Las distintas respuestas entre variedades resistentes y susceptibles a nivel de callo y planta no sólo se evidencian en arroz, también se ha encontrado en otras especies. En tabaco se observó que callos de variedades susceptibles a la enfermedad de la mancha negra (*Phytophthora parasitica* var. *nicotianae*), expuestos a los efectos de las toxinas del patógeno, sobrevivieron mejor en comparación a los callos originados de variedades resistentes a dicha enfermedad (Slavov, 2005). Del mismo modo, Diez y Gil (2002), en callos de Olmo con FC de *Ophiostoma novo-ulmi*, no encuentran relación con el nivel de resistencia de los clones, disminuyendo un 40 % el crecimiento de callos resistentes, no afectándose los callos susceptibles, explicándose que las toxinas fúngicas se producen únicamente en la planta intacta, por lo que, tal resistencia vendría ligada a mecanismos que no implican tolerancia hacia toxinas *in vitro*, sino a características anatómicas y fisiológicas diferenciales entre individuos susceptibles y resistentes. Por último, podemos sintetizar que la supervivencia de los cultivos celulares en presencia de toxinas de patógenos, no siempre refleja la resistencia de la planta intacta a la correspondiente enfermedad, ya que se ha reportado que los callos de cultivares resistentes son en cierta medida resistentes a la colonización por patógenos comparado con los callos de cultivares susceptibles. Sin embargo, esto no está del todo claro y depende en gran medida de ciertas variables como las condiciones del cultivo y el genotipo (Daub, 1986).

Finalmente, el estrés ejercido por el filtrado crudo (FC) del patógeno se evidencia a nivel molecular y no morfológico, pudiendo detallarse específicamente a nivel anatómico, ya sea estructural como ultraestructural, en particular a elevadas concentraciones del FC, donde se observa degeneración de la estructura celular, por plasmólisis, ruptura de la plasmalema y vacuolación de la mitocondria (Wei *et al.*, 1999), así como la hiperplasia del parénquima, todo ello más notorio en las variedades susceptibles (Flores *et al.*, 2012). De tal forma, que nuestros resultados reafirman el hecho que la plasmólisis celular se presenta en tratamientos con altas dosis de FC.

## CONCLUSIONES

El sistema de regeneración *in vitro*, tanto en inducción, regeneración como de estrés hídrico por desecación, está influenciado por el genotipo. Encontrando la mejor respuesta de inducción a bajas concentraciones de 2,4-D combinado con cinetina (K) y bencil-aminopurina (BA), mientras que la regeneración fue mayor con BA a 24 de h de desecación en todas las variedades, excepto Centauro que fue a 48 h. La respuesta callogénica y regenerativa a la presión de selección con FC, dependió de la variedad, siendo el sistema de incremento progresivo de la concentración del FC (IPC) el que mostro los mejores resultados, en particular con el

promedio de plantas regeneradas por variedad, siendo el CMI 25 % para Centauro y 50 % para las otras tres variedades. Asimismo, se evidencio que bajo las condiciones experimentales de este trabajo, la resistencia expresada a nivel *in vitro* no corresponde a la encontrada *in vivo*.

## AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue subvencionado por el Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo (CDCH-UC) a través de un proyecto de investigación (PI-G) N° 2014-001, según oficio N° CDCH-445-2014 del 28/10/2014.

## CONFLICT OF INTEREST

The authors declare that they have no conflict of interest.

## REFERENCIAS

- Acevedo M, Castrillo W, Belmonte U. Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agronomía Trop.* 2006;56(2):151-170.
- Agrios G. *Fitopatología*. México: Limusa; 1991. 756 p.
- Barreto T. Caracterización de los filtrados tóxicos de *Sclerotium rolfsii* Sacc. y su efecto sobre callos de tabaco (*N. tabacum* L.). *Rev Fac Agron.* 1993;19:99-100.
- Bay P, Muoi L, Thanh N. *In vitro* screening of Indica rice cultivars for resistance to blast disease using phytotoxin. Institute of Biotechnology. National Center for Natural science and technology:Vietnam; 1997. p. 10-15
- Bevitori R, Popielarska M, dos Santos E, Grossi M, Petrofeza S. Morpho-anatomical characterization of mature embryo-derived callus of rice (*Oryza sativa* L.) suitable for transformation. *Protoplasma.* 2014;251(3):545-54.
- Brookes G, Barfoot P. Will this lead the way for global acceptance of GM crop technology? Cornell University, USA: ISAAA Briefs; 2003. 62 p.
- Chand R, Sen D, Prasad K, Singh A, Bashyal B, Prasad I, Joshi A. Screening for disease resistance in barley cultivars against *Bipolaris sorokiniana* using callus culture method. *Indian J Exp Biology.* 2008;46(4):249-253.
- Cornide M, Lima H, Gálvez G, Sigarroa A. Mecanismo de resistencia a las enfermedades: Genética Vegetal y Fitomejoramiento. Editorial Científico-Técnica, Cuba. 1995;400-414.
- Cordero V, Rivero L. Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba. *Boletín Técnico del Arroz, IIA, Minagri,* 2001;3-7.
- Correa F, Guimaraes E. Utilización del concepto de linaje genético de *Pyricularia grisea* en un programa de selección recurrente. Primer Taller Internacional de Selección Recurrente en Arroz, Goiania, Brasil. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 1995;19.
- DANAC. Fundación DANAC. Informe de gestión 2005-2006. [On line]. 2009. Available at: [www.danac.org.ve/areas\\_disciplinarias/index.php](http://www.danac.org.ve/areas_disciplinarias/index.php). [Accessed: 2010, diciembre 18].

- Daub M. Tissue culture and the selection of resistance to pathogens. *Ann Rev Phytopathology*. 1986;24:159-186.
- D'Ávila L, Lehner M, Filippi M, Scheuermann K, Del Ponte E. Genetic structure and mating type analysis of the *Pyricularia oryzae* population causing widespread epidemics in southern Brazil. *Trop Plant Pathol*. 2016;1-9. Doi:10.1007 / s40858-016-0101-9
- Diez J, Gil L. Efecto de los filtrados de cultivos de *Ophiostoma novo-ulmi* Brasier sobre el crecimiento de callo de olmos con diferente susceptibilidad a la grafiosis. *Invest Agr Sist Recur For*. 2002;11(1):67-76.
- Dissanayaka D, Dahanayake N. Effect of plant growth regulators on micro-propagation of selected Sri Lankan traditional and improved rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Sabaragamuwa University J*. 2014;13(1):33-41.
- El-Banna A, Khatab I. Biochemical characterization of rice somaclones resistant to blast. *Curr Res J Biological Sci*. 2012;4(2):137-142.
- El-Kazzaz A, Hanafy M, Andel-Kader M. *In vitro* selection of resistant rice plants against rice blast caused by *Pyricularia oryzae* via tissue cultura technique. *Arch Phyto Plant Protection*. 2009;42(9):847-856. Doi:10.1080/03235400701492715
- FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. Seguimiento del mercado del arroz. [On line]. 2015. Available at: [<http://www.fao.org/economic/est/publications/publicaciones-sobre-el-arroz/seguimiento-del-mercado-del-arroz-sma/es/>]
- Fernández R. Influencia del estrés hídrico inducido por desecación en la regeneración *in vitro* de variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Acta Biol Venez*. 2010;30 (1-2):63-74.
- Fernández R. Sistema de regeneración *in vitro* por embriogénesis somática indirecta en variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Científica UDO Agrícola*. 2012;12(1):55-68.
- Fernández R, Cardona A. Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de cultivares venezolanos de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista Faraute de Ciencia y Tecnología*. 2010;5(1):5-17.
- Fernández M, Fernández M, Centeno I, Cañal M, Rodríguez R. Reaction of common bean callus to culture filtrate of *Colletotrichum lindemuthianum*: Differences in the composition and toxic activity of fungal culture filtrates. *Plant Cell Tiss Organ Cult* 2000;61:41-49. Doi:10.1023/A:1006486203315
- Flores P, Otoni W, Dhingra O, Diniz S, dos Santos T, Bruckner C. *In vitro* selection of yellow passion fruit genotypes for resistance to *Fusarium* vascular wilt. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2012;108:37-45. Doi:10.1007/s11240-011-0009-5
- Ganesan M, Jayabalan N. Isolation of disease-tolerant cotton (*Gossypium hirsutum* L. cv. SVPR 2) plants by screening somatic embryos with fungal culture filtrate. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 2006;87:273-284. Doi:10.1007/s11240-006-9164-5
- Ge X, Chu Z, Lin Y. A tissue culture system for different germplasm of indica rice. *Plant Cell Rep*. 2006;25:392-402. Doi:10.1007/s00299-005-0100-7
- Ghobeishavi H, Dorani E, Siamak S, Valizadeh M. Study of factors influencing somatic embryogenesis in rice (*Oryza Sativa* L.). *Int J Adv Biol Biom Res*. 2015;3(1):43-50.
- Guimaraes E, Ospina Y, Correa- Victoria F. Empleo del concepto de linajes de *Pyricularia grisea* para escoger germoplasma de arroz resistente. *Fitopatología Venezolana*. 1996;9(1):2-6.
- Huang W, Liu L. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Bot Bull Acad Sin*. 2002;43:107-113.
- Ilahi I, Bano S, Jabeen M, Rahim F. Micropropagation of rice (*Oryza sativa* L. CV Swat-II) through somatic embriogénesis. *Pak J Bot*. 2005;37(2):237-242.
- Jan Q, Hassan M, Fatima T, Hasnai T. Tissue culture response of local varieties of rice (*Oryza sativa* L.) of NWFP. *J Biol Sci*. 2001;1:387-390.
- Johansen D. *Plant Microtechnique*. McGraw-Hill:New York; 1940. 523 p.
- Joyia F, Khan M. Reproducible and expedient rice regeneration system using *in vitro* grown plants. *Afr J Biotechnol*. 2012;11(1):138-144.
- Kadhimi A, Naji A, Isahak A, Farshad M, Mohamad A, Doni F, Mohtar W, Radziah C. Effect of genotype and growth regulators in induction of embryogenic callus in rice. *J. Pure App Microb*. 2014;8(6):1-6.
- Khan M.A.I., Ali M.A., Monsur M.A., Kawasaki-Tanaka A., Hayashi N., Yanagihara S., Obara M., Mia M. A. T., Latif M. A., Fukuta Y. Diversity and Distribution of Rice Blast (*Pyricularia oryzae* Cavara) Races in Bangladesh. *Plant Disease*. 2016;100(10):2025-2033. Doi:<http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-15-1486-RE>
- Krishna H., Alizadeh M., Singh D., Singh U., Chauhan N., Eftekhan M., Sadh R. Somaclonal variations and their applications in horticultural crops improvement. *3 Biotech*. 2016;6(1):54. Doi:10.1007/s13205-016-0389-7
- Mahajan R, Sharma S. Comparison of regeneration efficiency of three different genotypes of basmati rice under *in vitro* condition. *IJBTT*. 2015;11(1):16-24.
- Murashige T, Skoog, F. A revised medium for rapid growth and biassars with tobacco culture. *Plant Physiol*. 1962;15:473-497.
- Michaux-Ferrière N, Carrón M. Histology of early somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. The importance of the timing of subculturing. *Plant Cell Tiss Organ Cult*. 1989;19:243-256.
- Montoya M., Rodríguez N., Perez-Almeida I., Cova J., Aleman L. Caracterización morfológica de 13 variedades de arroz venezolanas. *Agronomía Trop*. 2007;57(4):299-311.

- Narayan R, Singburadom N, Sommartya T, Sarobol E. Pathogenicity determination of crude extract toxin produced by the fungus (*P. oryzae* Cav). The causal agent of rice blast. *Nat Sci.* 1995;29:498-507.
- Pérez-Clemente E., Vives V., Zandalinas S., López-Climent M., Muñoz V., Gómez-Cadenas A. Biotechnological Approaches to Study Plant Responses to Stress. *BioMed Res Int.* 2013;1-9. Doi:10.1155/2013/654120
- Pieters A., Graterol E., Reyes E., Álvarez R., González A. Cincuenta años de mejoramiento genético del arroz en Venezuela. ¿Qué se ha logrado?. *Interciencia.* 2011;36(12):943-948.
- Prabhu A, Rush M. Differential sensitivity of callus derived from immature panicles of rice cultivars to the non-specific toxin of *Pyricularia grisea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult.* 1997;50:13-18.
- Raemakers C, Jacobsen E., Visser G. Secondary somatic embryogenesis and application in plant breeding. *Euphytica.* 1995;81:93-107.
- Rai M, Kalia R, Singh R, Gangola M, Dhawan. Developing stress tolerant plants *in vitro* selection- An overview of the recent progress. *Envir Exp Bot.* 2011;71:89-98.
- Roly Z, Islam M, Shaekh P, Arman S, Shahik S, Das D, Haamem M, Khalekuzzaman M. *In vitro* induction and regeneration potentiality of aromatic rice (*Oryza sativa* L.) cultivars in differential growth regulators. *Int J Appl Sci Biotechnol.* 2014;2(2):160-167.
- Sangduen N, Klamsomboon P. Histological and scanning electron observations on embryogenic and non-embryogenic calli of aromatic Thai rice (*Oryza sativa* L. cv. Khao Daw Mali 105). *Kasetsart J. Nat. Sci.* 2001;35:427-432.
- Shahsavari E. Evaluation and optimizations of media on the tissue culture system of Upland rice. *International J Agric Biol.* 2010;12(4):537-540.
- Shahsavari E, Maheran A, Akmar A, Hanafi M. The effect of plant growth regulators on optimizations of tissue culture system in Malaysian upland rice. *African J Biotechnology.* 2010;9(14):2089-2094.
- Slavov S. Phytotoxinas and *in vitro* screening for improved diseased resistant plants. *Biotechnol. Biotechnol.* 2005;40-45.
- Talbot N, Mccafferty H, Kershaw M, Dixon K. Identification of pathogenicity determinants in the rice blast fungus *Magnaporthe grisea*. In *Mayor Fungal Diseases of rice.* Netherlands: Springer; 2001. 21-34 p. Doi:10.1007/978-94-017-2157-8\_3
- Tariq M, Ali G, Hadi F, Ahmad S, Ali N, Shah A. Callus induction and *in vitro* plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. *Pak J Biol Sci.* 2008;11(2):255-259.
- Uchiyama T, Ogasawa N. Disappearance of cuticle and wax in outermost layer of callus cultures and decrease of protective ability against microorganisms. *Agric Biol Chem.* 1977;41:1401-1405.
- Vasil I. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J Plant Physiol.* 1987;128:193-218.
- Wei S, Liu W, Yu Y. Effects of *Pyricularia grisea* toxin on the survival and ultrastructure in the calli of rice. *J Shenyang Agric University.* 1999.
- Zaidi M, Narayanan M, Sardana R, Taga I, Postel S, Johns R, McNulty M, Mao J, Loit E, Altosar I. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. *Agronomy Res.* 2006;4(2):563-575.
- Zhang H, Zheng X, Zhang Z. The *Magnaporthe grisea* species complex and plant pathogenesis. *Mol Plant Pathol.* 2015;17(6):796-804. Doi:10.1111/mpp.12342
- Zhuang J, Jia X. Increasing differentiation frequencies in Wheat pollen callus. In: *Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Proceedings of a workshop. Responsores by Institute of Genetic Academic Sinica: Science press; 1983. p. 453-459.*