

ORGANOGENESIS INDIRECTA A PARTIR DE MERISTEMOS APICALES CAULINARES DE LA VARIEDAD CUBANA DE ARROZ REFORMA

Maylin Pérez-Bernal[✉], Magalis Delgado, C. A. Hernández y R. Armas

ABSTRACT. Shoot meristem culture is a potential alternative to the more commonly used methods for *in vitro* cereal regeneration, as they are less genotype-dependent, and more efficiently established seedbeds can be used as donor material. In the present work, *de novo* morphogenesis processes were induced by indirect organogenesis in apical meristems from *in vitro* rice plantlets of Reforma cultivar germinated on a MS basal medium. Shoot meristems were obtained when cutting three 2.0-cm segments from the bottom portion of seedling stem. At callus phase, different concentrations of 2,4-D were trialed in the culture medium, also testing the effect of stem segment position on callus formation. In general, two types of calli were observed: morphogenic and nonmorphogenic ones, which differed in their structure and growth. The highest proportion of morphogenic calli was obtained at the bottommost stem segment, using 2.0 mg/L 2,4-D. These calluses were subcultured for 10 days under light or dark conditions, to study their effect on shoot regeneration. At the regeneration media, macro and microelements from MS and N6 media were evaluated separately. From subcultured calluses in dark regenerated more shoots at the regeneration medium with MS macro and microelements rather than with N6, whereas in subcultured calluses in the light, shoot regeneration efficiency diminished radically in both media tested.

Key words: rice, apical meristems, organogenesis, stems, meristem culture

RESUMEN. El cultivo de meristemos apicales es una alternativa de interés para la regeneración *in vitro* de cereales, debido a su menor dependencia del genotipo y a que puede utilizarse material donante de fácil establecimiento como los semilleros. En este trabajo se indujeron procesos de morfogénesis *de novo*, vía organogénesis indirecta, en meristemos apicales caulinares de arroz de la variedad Reforma, provenientes de plántulas *in vitro* germinadas en medio basal MS. Los meristemos apicales se obtuvieron realizando cortes de tres segmentos de 2.0 cm en la porción inferior del tallo de las plántulas. En la fase de callo se ensayaron diferentes concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo y se probó el efecto sobre la calogénesis de la posición del segmento tomado del tallo. En general, se observaron dos tipos de callos: morfogénicos y no morfogénicos, diferentes en su estructura y crecimiento. La mayor proporción de callos morfogénicos se logró a partir del segmento más inferior del tallo y utilizando 2.0 mg/L de 2,4-D. Estos callos se subcultivaron 10 días en luz u oscuridad, para investigar su efecto en la regeneración de brotes. En el medio de regeneración se probaron los macro y microelementos de los medios MS y N6 por separado. De los callos subcultivados en la oscuridad regeneraron más brotes en el medio de regeneración con los macro y microelementos de MS que de N6, mientras que en los subcultivados en la luz disminuyó drásticamente la eficiencia de regeneración de brotes en ambos medios ensayados.

Palabras clave: arroz, meristemas apicales, organogénesis, tallos, cultivo de meristemas

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos y la regeneración de plantas constituyen etapas determinantes en las estrategias de mejoramiento genético de especies y variedades de gran valor nutricional y comercial. Estos procedimientos pretenden lograr, en un tiempo mínimo, la obtención de plantas con características genéticas y morfológicas deseadas (1).

En el cultivo *in vitro* de cereales importantes como el trigo (*Triticum aestivum*), la cebada (*Hordeum vulgare*)

y el arroz (*Oryza sativa* L.), se han usado ampliamente los embriones cigóticos maduros e inmaduros para desarrollar líneas de callos, suspensiones celulares y protoplastos. Sin embargo, la incompetencia de estos explantes en algunas variedades elites ha sido una barrera que dificulta el cultivo *in vitro* y su regeneración, debido a la dependencia del genotipo y a la trabajosa manipulación de algunos de ellos, como los embriones inmaduros. Durante la pasada década, se manejaron exitosamente *in vitro* los meristemos apicales de plantas obtenidas en semilleros de maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare* Pers.), trigo y cebada, para desarrollar procedimientos de regeneración rápidos e independientes del genotipo (2). A partir de estos puede ocurrir una organogénesis indirecta que incluya primeramente una fase de callos y a continuación la formación de brotes en un medio con una baja relación auxina/citoquinina (3).

Ms.C. Maylin Pérez y Ms.C. R. Armas, Investigadores Agregados, Magalis Delgado, Técnico en Control Biológico y Ms.C. C. A. Hernández, Investigador Auxiliar del Departamento de Investigaciones, Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de Sancti Spiritus (CIGB), Apartado Postal 83, Código Postal 60200, Sancti Spiritus, Cuba

✉ maylin.perez@cigb.edu.cu

La organogénesis constituye una de las posibles vías morfogénicas para la diferenciación de plantas *de novo*. Consiste en la formación de raíces o brotes adventicios en los explantes cultivados *in vitro* (4), que puede ocurrir en forma directa a partir de células, tejidos u órganos vegetales iniciadores del cultivo *in vitro*, o indirecta a partir de callos (3, 5, 6). Existen varios factores que deben ser considerados para la manipulación exitosa de la organogénesis. Entre ellos se mencionan el tamaño y la edad fisiológica de los explantes, pues se ha comprobado que los tejidos juveniles presentan una mayor aptitud para la organogénesis que los tejidos que provienen de órganos adultos o senescentes (7). También la luz, temperatura, consistencia del medio de cultivo, el pH y los reguladores del crecimiento desempeñan un papel fundamental en el desarrollo de la respuesta organogénica (8).

La organogénesis es un proceso bifásico, según los estudios de inducción de la formación de órganos a partir del cultivo de callos. Sus dos fases son la citodiferenciación, que da lugar a un primordio, y la organogénica, que determinará el tipo de órgano que se formará a partir del primordio (9). La naturaleza bifásica de la organogénesis podría explicar el amplio espectro de tratamientos efectivos para la inducción de órganos a partir del callo.

La variedad cubana de arroz Reforma es muy fácil de manipular en condiciones *in vitro*; por tanto, sería un modelo para establecer un sistema de organogénesis indirecta en arroz, no informado hasta el momento, que pueda ser aplicado a protocolos de mejoramiento genético y de propagación *in vitro*.

En este trabajo se describe el proceso de organogénesis indirecta, que tiene lugar a partir de meristemos apicales del tallo de plantas de la variedad Reforma germinadas *in vitro*. Para ello se evalúa el efecto de diferentes concentraciones de 2,4-D y de la posición del segmento seleccionado en el tallo para inducir la callogénesis. También se valora la incidencia del subcultivo de los callos en luz u oscuridad en la respuesta organogénica, así como el empleo de diferentes micro y macroelementos en el medio de regeneración de brotes.

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación del material vegetal. Se utilizaron semillas maduras de arroz (*Oryza sativa* L.) de la variedad Reforma, obtenidas en la Estación Experimental del Arroz "Sur del Jíbaro", La Sierpe, Cuba. Las semillas se descascararon manualmente y se esterilizaron mediante inmersión y agitación en etanol al 70 % por dos minutos, y posteriormente en lejía (hipoclorito de sodio 2.5 %) durante 20 minutos. A continuación se lavaron tres veces con agua destilada estéril, se secaron sobre papel absorbente y se sembraron para su germinación en frascos de vidrio con medio de cultivo semisólido, consistente en sales y vitaminas de MS (10), 30 g/L de sacarosa y 3.0 g/L de Phytigel®.

Se utilizaron 250 semillas, a razón de 10 por frasco, que se ubicaron durante siete días en un cuarto climatizado con un régimen de fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente y ocho de oscuridad y temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$.

Transcurrido este tiempo, se seleccionaron plantas de tamaño uniforme para obtener los meristemos apicales caulinares. Se utilizó un bisturí no.20 para cortar cuidadosamente tres segmentos de tallo de 2.0 cm cada uno a partir de la base, que se denominaron segmentos 1, 2 y 3 de abajo hacia arriba.

Gradiente de 2,4-D para la formación de callos. El medio de formación de callos consistió en sales y vitaminas del N6 (11), 30 g/L de sacarosa y 1.0 g/L de hidrolizado de caseína. Con estos constituyentes en común se incluyeron cuatro tratamientos con 2,4-D en las siguientes concentraciones: 2.0, 3.0, 4.0 y 5.0 mg/L. En cada tratamiento se ajustó el pH del medio a 5.7 y se utilizó como gelificante 3.0 g/L de Phytigel®.

Los segmentos caulinares, clasificados de acuerdo con su posición en el tallo, se colocaron en estos medios de cultivo, a razón de 14 por placa Petri, durante 21 días en condiciones de oscuridad a $28\pm 1^\circ\text{C}$. Al cabo de este tiempo, se evaluó la formación de callos morfogénicos y no morfogénicos, atendiendo a su estructura y crecimiento. En las cinco réplicas realizadas se cuantificó la eficiencia de formación de callos, como el cociente del número de callos morfogénicos formados respecto al total de segmentos en cada caso.

Subcultivo de los callos en luz y oscuridad. Los callos formados en la variante más eficiente se transfirieron a placas Petri para un subcultivo de 10 días en el medio de formación de callos descrito anteriormente, pero solamente con 2.0 mg/L de 2,4-D. Un grupo de ellos fue colocado bajo luz fluorescente y el resto se mantuvo en la oscuridad, todos a $28\pm 1^\circ\text{C}$.

Regeneración de brotes. Se diseñaron dos tratamientos para el medio de regeneración, a los cuales se les denominó: medio RMS, con la mezcla de macro y microelementos del medio MS (10) (Duchefa®), y medio RN6, con la mezcla correspondiente al medio N6 (11) (Duchefa®). Ambos medios de regeneración tuvieron en común los reguladores de crecimiento siguientes: 6-bencilaminopurina (0.5 mg/L), kinetina (3.0 mg/L) y ácido naftalenacético (1.0 mg/L). Además, se incluyeron las vitaminas B5 (0.103 mg/L) y como principal fuente de carbono a la maltosa a 30 g/L. Se ajustó el pH a 5.7 y como agente gelificante se utilizó el Phytigel® a 4.5 mg/L.

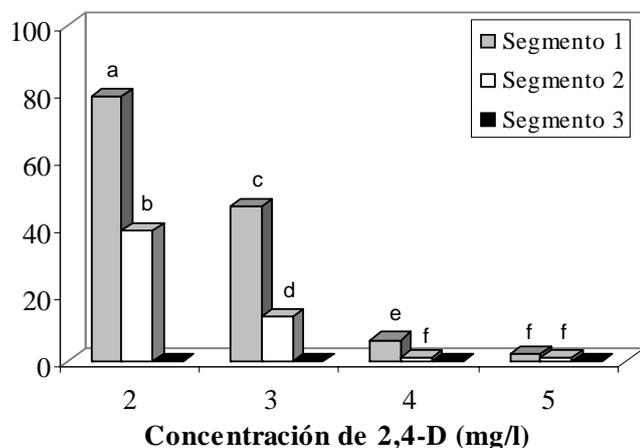
Los callos morfogénicos se transfirieron para estos medios de regeneración, a razón de 10 por placa Petri, y se colocaron bajo un sistema de fotoperíodo de 16 horas de luz fluorescente y 8 de oscuridad, y temperatura de $28\pm 1^\circ\text{C}$, hasta la formación de brotes.

Se trabajó con cuatro réplicas por tratamiento y en cada uno se determinó el total de callos con brotes y el número de brotes por callo.

Análisis estadístico de los resultados. La eficiencia de formación de callos, el total de callos con brotes y número de brotes regenerados por callo fueron estudiados mediante respectivos análisis de varianza bifactoriales completamente aleatorizados, haciendo uso del paquete estadístico SPSS versión 11.5. Se efectuó la comparación de múltiple de medias con la prueba de Tukey (HSD).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Formación de callos. En la Figura 1 se observa una relación entre la posición del segmento de tallo utilizado para la callogénesis y su eficiencia. En el segmento 1, el más próximo a la base del tallo, la formación de callos fue significativamente diferente ($p \leq 0.05$) en todos los tratamientos con 2,4-D, y se logró la mayor eficiencia de formación de callos morfogénicos con la mínima concentración ensayada. Los callos morfogénicos (Figura 2A) mostraron una coloración amarillo-blanquecina y rápida proliferación, a diferencia de los no morfogénicos, que presentaron menor tamaño, coloración parda y lento crecimiento. Resulta ventajoso que para el éxito de la callogénesis, haya sido suficiente la mínima concentración ensayada de 2,4-D, considerando que niveles altos de esta auxina en el medio de cultivo inducen variaciones somaclonales en los explantes cultivados *in vitro* (12). Otros estudios sobre callogénesis en arroz han coincidido en que 2 mg/L de 2,4-D es la concentración adecuada para lograr una mejor respuesta, no solo en la formación de callos sino también en la regeneración de brotes (13).



Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Prueba de Tukey, $p \leq 0.05$)

Figura 1. Eficiencia de formación de callos de arroz de la variedad Reforma en los tres segmentos de 2.0 cm de longitud, seccionados a partir de la base del tallo de plántulas germinadas *in vitro*. En el medio de formación de callos se incluyeron tratamientos con cuatro concentraciones de 2,4-D. La evaluación se realizó a los 21 días de cultivo en este medio. Los resultados mostrados son las medias aritméticas de la eficiencia en cinco réplicas

La tendencia decreciente de la eficiencia de formación de callos, al incrementarse las concentraciones de 2,4-D, puede deberse a un efecto del genotipo de la variedad en estudio, cuya respuesta en la callogénesis se afecta a concentraciones de 2,4-D por encima de 2 mg/L, según los resultados de este estudio.

La eficiencia de callogénesis a partir del segmento 2 mostró una reducción significativa ($p \leq 0.05$) respecto a la lograda con el segmento 1 y se verificó el mismo comportamiento decreciente a medida que aumentaron las concentraciones de 2,4-D (Figura 1). No se formaron callos a partir del segmento 3, lo que indica que en esta parte del tallo no queda ningún resto del meristemo apical, sino solamente la envoltura foliar, la cual presentó en todos los segmentos un cambio del color verde al pardo oscuro (Figura 2A).

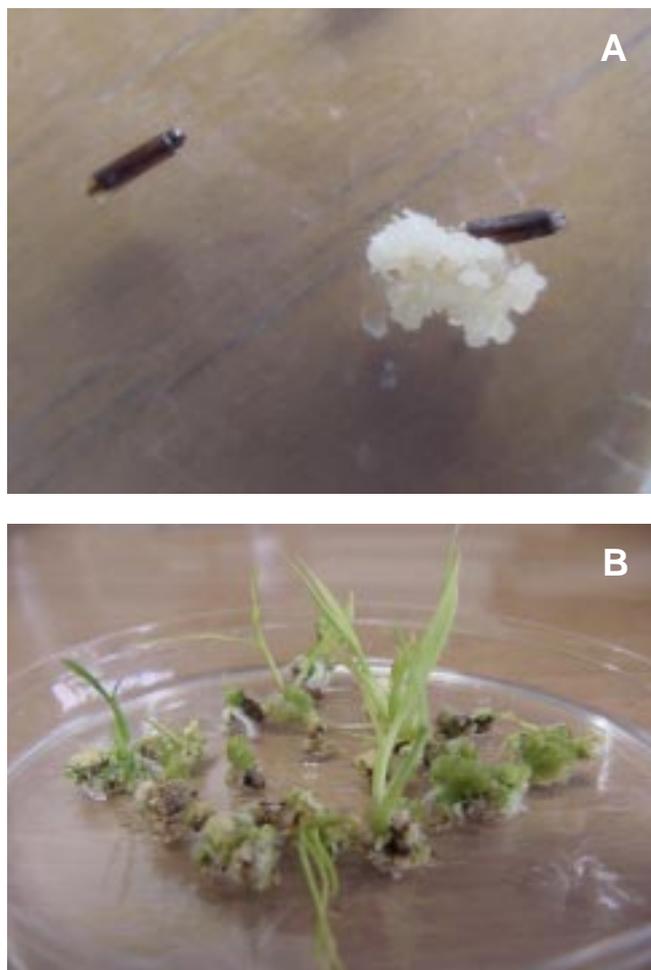


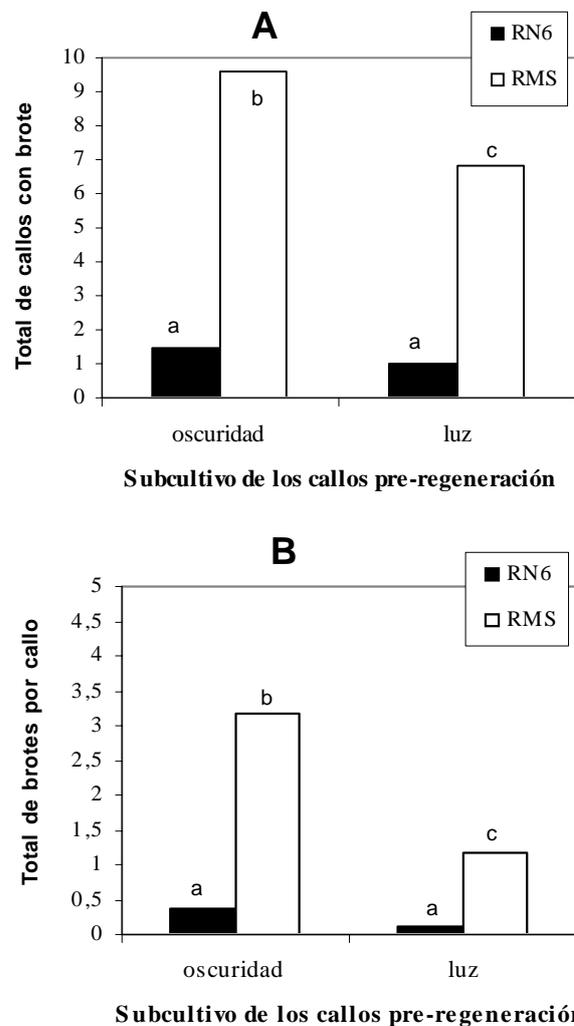
Figura 2. (A) Formación de callos a partir del meristemo apical del tallo de plántulas de arroz (variedad Reforma) germinadas *in vitro*. Fotografía tomada a los 21 días de cultivo en medio de formación de callos con 2 mg/L de 2,4-D. (B)-Regeneración de brotes *de novo* a partir de callos morfogénicos en medio RMS. Fotografía tomada a los 51 días de cultivo en medio de regeneración

El meristemo apical de los cereales es una estructura microscópica altamente compleja, formada por dos capas celulares denominadas L1 y L2 (14, 15). Debido a su reducido tamaño e incómoda localización, los procedimientos para identificar y aislar el meristemo apical caulinar del arroz son muy imprecisos. Algunas veces puede ser dañado o seccionado, pero se ha descrito que el meristemo puede restaurarse con relativa facilidad, debido a la regenerabilidad y plasticidad de la región del ápice meristemático (16). De los tres segmentos utilizados en este caso para la organogénesis indirecta, se seleccionó el segmento 1, debido a que en esa zona más cercana a la base del tallo se manipula con mayor precisión el meristemo apical. De este tejido se forman los callos en presencia del 2,4-D, que es una auxina fuerte. En el segmento 3, es decir, a una altura aproximada de 4 cm a partir de la base del tallo, ya no está accesible el meristemo apical, sino que permanece solamente el tallo hueco típico de las gramíneas, por lo que no existe el tejido idóneo para la formación de callos en las condiciones empleadas.

Subcultivos de callos en luz y oscuridad. Los callos morfogénicos formados en el medio de cultivo con 2.0 mg/L de 2,4-D se dividieron en dos grupos, para ser subcultivos durante 10 días en la luz u oscuridad. Transcurrido ese tiempo, no se detectaron diferencias visibles en la morfología externa de los callos de ambos subcultivos. Se mantuvieron sin alteraciones en su coloración ni en el ritmo de crecimiento durante todo el tiempo de subcultivo.

Varios autores refieren la importancia del manejo de la iluminación durante el cultivo de callos. Se ha descrito un eficiente pre-tratamiento con auxina y posterior subcultivo en la oscuridad a los explantes de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) antes de transferirlos a la regeneración (17). Otros comprobaron que la presencia de luz u oscuridad no ocasionó diferencias en la estructura externa de callos de arroz subcultivos antes de la regeneración y que aparecieron zonas de coloración verdosa sobre los callos (18). También se ha verificado que en la oscuridad se estimulan los procesos de embriogénesis en arroz cuando el 2,4-D está presente y que en la organogénesis el régimen de cultivo en luz y oscuridad puede afectar la tasa de diferenciación de brotes, dando prioridad al tiempo de exposición del tejido a la oscuridad (19).

Regeneración de brotes. A pesar de no observarse cambios externos entre los callos subcultivos en luz u oscuridad, mientras permanecieron en el medio de subcultivo, se detectaron diferencias significativas ($p \leq 0.05$) en la formación de brotes cuando fueron transferidos al medio de regeneración, independientemente de los macro y microelementos que se utilizaron. El subcultivo previo de los callos en la luz incidió de forma negativa en la regeneración de brotes; el número de callos con brotes fue 1.4 veces menor al logrado en los subcultivos en la oscuridad (Figura 3A) y disminuyó el promedio de brotes por callo (Figura 3B).



Letras diferentes indican que existen diferencias significativas entre las medias de los tratamientos (Prueba de Tukey, $p \leq 0.05$)

Figura 3. Regeneración de brotes de arroz (variedad Reforma) a partir de callos inducidos de meristemos apicales caulinares y subcultivos 10 días en luz u oscuridad. En el medio de regeneración se ensayaron dos tratamientos: RMS, con los macro y microelementos del medio MS, y RN6 con los del N6. (A)- Total de callos con brotes por tratamiento. (B)- Promedio de brotes por callo por tratamiento. Evaluación realizada a los 52 días de cultivo en medio de regeneración. Los resultados mostrados son las medias aritméticas de la eficiencia en cuatro réplicas

Por otro lado, en los callos provenientes del subcultivo en la oscuridad y que se transfirieron al medio de regeneración con los macro y microelementos del MS (medio RSM), se encontró la mayor cantidad de callos con brotes y, a su vez, se generó el más alto promedio de brotes por callo. El medio basal MS se caracteriza por su gran contenido de nitrógeno, que marca la diferencia respecto al medio N6; es posible que el nitrógeno sea un elemento

importante para la diferenciación de los brotes *de novo* en estas condiciones. De ahí la significativa disminución ($p \leq 0.05$) que se observa en el total de callos con brotes y en el número de brotes por callos regenerados en presencia de los micro y macroelementos del medio N6 (RN6). Este resultado coincide con los presentados para la regeneración de brotes vía organogénesis indirecta en la variedad de arroz BRS 7 "Taim" (3).

El cambio de coloración de amarillo-blanquecino a verde fue la primera modificación que se distinguió en los callos, cuando se cultivaron en el medio de regeneración (Figura 2B). No se visualizaron estructuras globulares, como se ha descrito en caña de azúcar (*Saccharum* spp. híbridos), sino que los callos mostraron una estructura más compacta y seca que en el medio de subcultivo (17). Estudios recientes realizados en arroz explicaron que durante la etapa de regeneración ocurren cambios estructurales y metabólicos en las células del callo, entre los que se destaca la acumulación de carbohidratos para satisfacer la alta demanda energética de la organogénesis (20).

La emisión de primordios foliares comenzó después de 30 días de cultivo en medio de regeneración. A los 52 días se determinó que la altura promedio de los brotes regenerados fue de 3.0 cm, con tallos y hojas normales, y no se encontraron brotes albinos.

Se ha informado que en la morfogénesis *in vitro* del arroz existe interacción entre la luz, las auxinas y la producción de brotes (21); por tanto, las condiciones de iluminación pueden determinar el programa morfogénico en este cereal (19). Los resultados del presente trabajo han demostrado el efecto positivo de la oscuridad en el subcultivo de callos, para lograr una respuesta organogénica eficiente en la variedad de arroz Reforma. Unido a esto, la morfogénesis puede favorecerse con la utilización de los macro y microelementos del medio basal MS (10) en el medio de regeneración de brotes *de novo*.

Además del contenido de macro y microelementos, el balance de auxina/citoquinina es importante, porque determina la vía morfogénica del tejido *in vitro*; por otra parte, se ha visto que para inducir la formación de brotes, debe incrementarse la concentración de citoquininas sobre las auxinas (22). En este caso, las concentraciones utilizadas de kinetina y 6-bencilaminopurina propiciaron la formación de brotes, a partir de los callos que previamente habían sido inducidos con 2,4-D, coincidiendo con los resultados para la regeneración de plantas de arroz vía embriogénesis somática en otras variedades cubanas, donde se utiliza un balance análogo de estos reguladores de crecimiento (1, 23, 24). Esto sugiere que dicho balance podría aplicarse de forma general para la regeneración *in vitro* de variedades nacionales de arroz, ya sea por embriogénesis somática u organogénesis. Es una hipótesis que debe comprobarse en estudios posteriores y que permitiría disponer de un medio de regeneración versátil para las variedades cubanas.

REFERENCIAS

1. Pérez-Bernal, M.; Delgado, M.; Hernández, C. A. y Armas, R. Evaluación morfológica de brotes regenerados de callos de arroz (variedad IACuba-28) resistentes a higromicina. *Rev. Colomb. Biotechn.*, 2007, vol. 9, no.1, p. 35-40.
2. Sticklen, M. B. y Oraby, H. F. Shoot apical meristem: a sustainable explant for genetic transformation of cereal crop. *In Vitro Cellular and Developmental Biology*, 2005, vol. 41, no. 3, p.187-200.
3. Tavares, L. F.; Magalhaes, J. R.; Ariano, M. P. y José, A.R. Indirect organogenesis of rice explants from meristematic region of shoot tips. *Bras. Agrociência*, 2004, vol.10, no.2, p. 203-207.
4. Pérez, E. M.; Ramírez, R.; Núñez, H. G. y Ochoa, N. Introducción al cultivo de tejidos vegetales. Universidad Autónoma de Aguas Calientes, Apoyado por el Fondo para la Modernización de la Educación Superior, FOMES, 1999, p. 179.
5. Huang, T.; Shaolin, P.; Gaofeng, D.; Lanying, Z. y Gengguang, L. Plant regeneration from leaf-derived callus in *Citrus grandis* (pummelo): Effects of auxins in callus induction medium. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 2002, vol. 69, p.141-146.
6. Popielarska, M.; Slesak, H. y Goralski, G. Histological and SEM studies on organogenesis in endosperm-derived callus of kiwifruit. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*, 2006, vol. 48, no. 2, p. 97-104.
7. Arinucci, L. M.; Uscitti, M. R. y Bedini, W. A. Morfogénesis *in vitro* de leguminosas forestales nativas de la República Argentina. *Revista de la Facultad de Agronomía de La Plata*, 2004, vol. 105, no. 2, p. 27-35.
8. Montero, C.; Macías, E. y Wong-Vega, L. Organogénesis directa y múltiple en tejidos juveniles de guandú o gandul (*Cajanus cajan* (L.) Millsp.). *Invet. Pens. Crit.*, 2006, vol. 4, p. 20-31.
9. Appezzato, B. y Machado, S.R. Ultrastructural analysis of *in vitro* direct and indirect organogenesis. *Revista Brasil. Bot.*, 2004, vol. 27, no. 3, p. 429-437.
10. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue culture. *Plant Physiology*, 1962, vol. 15, p. 473-479.
11. Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Hsu, C.; Chu, C. Y. y Bin, F. Y. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiment on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 1975, vol. 18, p. 659-668.
12. Carmona, E. R.; Rodriguez, M.; Borroto, J. y Arencibia, A. D. Somaclonal variation in transgenic sugarcane plants: practical implications. En: *Developments in Plant Genetics and Breeding*. Ed.: A. Arencibia, Elsevier, 2000, p. 62-67.
13. Islam, M.; Ahmed, M. y Mahaldar, D. *In vitro* callus induction and plant regeneration in seed explants of rice (*Oryza Sativa* L.). *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 2005, vol. 1, no. 1, p. 72-75.
14. Maqbool, S.; Zhong, H.; El-Maghraby, Y.; Wang, W.; Ahmad, A.; Chai, B. y Sticklen, M. B. Competence of oat (*Avena sativa* L.) shoot apical meristems for integrative transformation, inherited expression and osmotic tolerance of transgenic lines containing *hva1*. *Theor. Appl. Genet.*, 2002, vol. 105, p. 201-208.

15. Chandra, A. y Pental, D. Regeneration and genetic transformation of grain legumes: an overview. *Curr. Sci.*, 2003, vol. 84, p. 381–387.
16. Irish, E. E. Additional vegetative growth in maize reflects expansion of fates in preexisting tissue, not additional divisions by apical initials. *Dev. Biol.*, 1998, vol. 197, p. 198–204.
17. Franklin, G.; Arvinth, S.; Sheeba, C.; Kanchana, M. y Subramonian, N. Auxin pretreatment promotes regeneration of sugarcane (*Saccharum* spp. hybrids) midrib segment explants. *Plant Growth Regulation*, 2006, vol. 50, no. 2 y 3, p. 111-119.
18. Meneses, A.; Flores, D.; Muñoz, M.; Arrieta, G. y Espinoza, A. M. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on *indica* rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis *Rev. Biol. Trop.*, 2005, vol. 53, no. 3 y 4, p. 361-368.
19. Duong, T. N.; Bui, V. L.; Tran, T. V. Somatic embryogenesis and direct shoot regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) using thin cell layer culture of apical meristematic tissue. *Journal of Plant Physiology*, 2000, vol.157, p. 559-565.
20. Wen-Lii, H. y Li-Fei, L. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 2002, vol. 43, p. 107-113.
21. Padua, V. L. M.; Fernández, L. D.; Oliveira, D. E. y Mansur, E. Effect of auxin and light treatments of donor plants on shoot production from indica-type rice (*Oryza sativa* L.). *In Vitro Dev. Biol. Plant.*, 1998, vol. 34, p. 285-288.
22. Barcelo, P.; Rasco-Gaunt, S.; Thorpe, C. y Lazzeri, P. Transformation and gene expression. En: *Advances in botanical research*, vol. 34: Biotechnology of cereals. Ed. P. R. Shewry, P. A. Lazzeri and K. J. Edwards. Academic Press, London, 2001, p. 59–126.
23. Pérez-Bernal, M.; Coll, Y.; González, A.; Alfonso-Rubí, J.; Armas, R.; Hernández, C.A. y Pujol, M. Influencia de la fuente de carbono y el agente gelificante sobre la regeneración de arroz Indica variedad IACuba-28. *Bioteconología Vegetal*, 2002, vol. 2, no. 3, p. 163-166.
24. Pérez-Bernal, M.; Cabrera, Y.; Delgado, M.; Hernández, C. A. y Armas, R. Empleo de reguladores de crecimiento para la formación de cloroplastos en callos de arroz (var. Jucarito-104) cultivados en luz y oscuridad. *Bioteconología Vegetal*, 2007, vol. 7, no. 1, p. 3-8.

Recibido: 1 de octubre de 2007

Aceptado: 10 de abril de 2008

DIPLOMADOS

Precio: 2000 CUC

Incremento en la producción de las áreas afectadas por la sequía

Coordinador: Dra.C. María C. González Cepero
Duración: 1 año

SOLICITAR INFORMACIÓN

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