

INFLUENCIA DEL ESTRES HÍDRICO INDUCIDO POR DESECACIÓN EN LA REGENERACIÓN *IN VITRO* DE VARIEDADES VENEZOLANAS DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L.)

INFLUENCE OF DESICCATION- INDUCED HYDRIC STRESS DURING *IN VITRO* REGENERATION OF VENEZUELAN RICE (*ORYZA SATIVA* L.) VARIETIES

Rafael Fernández Da Silva

Laboratorio de Biotecnología Aplicada, Departamento de Biología, Facultad Experimental de Ciencias y Tecnología, Universidad de Carabobo. Valencia-Estado Carabobo-Venezuela
rfernandez2@uc.edu.ve

RESUMEN

Con el objetivo de optimizar la etapa de regeneración de plantas de arroz indica por embriogénesis somática, se evaluó el estrés hídrico por desecación en callos embriogénicos desarrollados de semillas maduras, en cuatro variedades de arroz venezolanas: Araure-4, Centauro, Cimarrón y Venezuela-21. Las frecuencias regenerativas y los promedios de diferenciación de plantas por callo embriogénico, se determinaron luego de aplicado un tratamiento de desecación (0, 24, 48 y 72 h). Se observó de manera significativa que tanto en la frecuencia de regeneración como en el promedio de plantas diferenciadas por callo, tres de los cuatro cultivares respondieron favorablemente a 24 h (Araure-4:45% y 16,8; Cimarrón: 50% y 16,15; Venezuela-21:47% y 16,9), mientras que Centauro, respondió a 48 h (44% y 17,19), con el mayor porcentaje de plantas regeneradas.

ABSTRACT

The aim of this study was the optimization of regeneration stages by somatic embryogenesis in four Venezuelan varieties of indica rice plants (Araure-4, Centauro, Cimarrón and Venezuela-21). The hydric stress was evaluated by desiccation of embryogenic calluses of mature seeds. The regeneration frequencies and average differentiation of plants from embryogenic callus were determined after the treatments of 0, 24, 48, and 72 h of desiccation. The treatment improved the frequency of regeneration and the average of plants differentiated by each callus; three of four cultivars reacted favorably to the 24 h treatment: Araure (-4:45% and 16,8, respectively); Cimarrón (50% and 16,15, respectively), Venezuela-21 (47% and 16,9, respectively). The Centauro cultivar reacted better to the 48 h treatment (44% and 17,19, respectively) producing the highest percentage of regenerated plants.

Palabras clave: *Oryza sativa*, estrés hídrico, desecación, embriogénesis somática.

Keywords: *Oryza sativa*, hydric stress, desiccation, somatic embryogenesis.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es un cultivo importante en el mundo, siendo el segundo cereal en consumo luego del trigo, proveyendo más del 50% de las calorías diarias a más de la mitad de la población mundial (Abreu y col., 1993). En Venezuela se produce, procesa y comercia, concentrándose su cultivo en los Llanos Centrales (Estado Guárico) y Occidentales (Estados Portuguesa, Cojedes y Barinas), (Abreu y col., 1993). Venezuela representa un 0,12 % de la producción mundial del cultivo, siendo los estdos Guárico y Portuguesa los de mayor producción (80%) del país (Danac, 2004).

El arroz pertenece a la Familia Poaceae, género *Oryza*, siendo *Oryza sativa* la especie más importante, con tres grupos: javánica, japónica e índica, los dos últimos son los de mayor rendimiento y comercialización mundial (85%) (Hill, 1965).

El arroz como todo cultivo es susceptible a numerosas y diversas plagas y enfermedades, las cuales afectan significativamente la productividad tanto en calidad como en cantidad. *Pyricularia grisea* es el patógeno fúngico más devastador del cultivo de arroz en el mundo y Venezuela, siendo causante del anublo del arroz, cuya más grave afectación es la dobladura o ruptura de la panícula, trayendo como consecuencia la no formación de los granos. La capacidad destructiva de este patógeno se fundamenta en el rápido desarrollo de variabilidad genética, haciéndolo adaptable a nuevos cultivares y resistente a fungicidas específicos (Kransz y col., 1978).

En arroz se han realizado múltiples estudios para lograr su mejoramiento; así, se han descrito protocolos eficientes de regeneración *in vitro*, marcadores moleculares, bancos genéticos y de

germoplasma e ingeniería genética. Como sistemas de regeneración, se han establecido la organogénesis y la embriogénesis somática indirecta, siendo esta última la de mayor potencial regenerativo, tanto por la formación de embriones somáticos primarios como secundarios (Raemakers y col., 1995). Estos sistemas regenerativos se han iniciado de distintos explantes, tales como: embriones sexuales inmaduros (Heyser y col., 1983), embriones sexuales maduros (Rueb y col., 1994), semillas maduras (Nakano y Maeda, 1979), secciones nodales (Dun-Yi y Krikorian, 1981), hojas (Bhattacharya y Sen, 1980), coleótilos (Sahrawat y Chand, 2001), epicótilos (Khatun y Desamero, 2005), raíces (Kawata y Ishihara, 1968; Kabir y col., 1968), ovarios (Rongbai y col., 1998), proembriones cigóticos (Zhao y col., 1999), polen (Bajaj, 1984) y anteras (Lee y col., 2000). De estos procesos de regeneración se han obtenido cultivares tolerantes al estrés salino (Belyanskaya y col., 1994) y conjuntamente con técnicas de ingeniería genética se han logrado diversos tipos de plantas transgénicas, como plantas resistentes a herbicidas, a hongos, a insectos y al estrés hídrico (Repellin y col., 2001), asimismo se han obtenido plantas de interés alimentario como el famoso arroz de oro, cuyos granos están enriquecidos con vitamina A (Ye y col., 2000).

La obtención de un mayor número de plantas élite a través de los diferentes procesos regenerativos *in vitro*, está influenciada por numerosos y diversos parámetros físicos, químicos y biológicos, tales como: la luz, el fotoperiodo, composición del medio de cultivo y genotipo. El sistema de regeneración más eficiente en los cereales, incluyendo el arroz, es la embriogénesis somática, la cual depende de diversos factores, siendo el genotipo y el medio de cultivo los más relevantes, estableciéndose en dos etapas, una de inducción del callo y la segunda de regeneración

de las plantas (Khanna y Raina, 1998). Los medios de cultivo de inducción están suplementados con solo 2,4-D, mientras que en la etapa de regeneración se suprime dicha hormona y se utilizan otras auxinas combinadas con citoquininas (Bannikova y Barabanova, 1990). La fase de regeneración es la más importante, ya que de ella depende el desarrollo de un mayor número de plantas con las características agrónomicamente deseadas para el fitomejorador, en este sentido es relevante mejorar los parámetros que permitan lograr el desarrollo morfogénico de numerosas plantas viables en dicha etapa, optimizando la misma, en el logro de una mayor frecuencia regenerativa a partir de callos embriogénicos. Dicha optimización puede ser lograda mediante distintos tratamientos de estrés osmótico, subcultivando los callos de capacidad regenerativa en medios de cultivo suplementados con agentes que generen un estrés hídrico, tales como altas concentraciones de los azúcares, manitol, sorbitol, sacarosa, maltosa, sales como NaCl o agentes solidificantes como el phytigel o el agar. Así tenemos que en arroz se ha empleado 1% de sorbitol o manitol (Rubi y col., 1999), 3-6% de sacarosa (Higuchi y Maeda, 1991; Krishnaraj y Sreerangasamy, 1993; Grewal y col., 2005), 2-3% de maltosa (Grewal y col., 2005; Geng y col., 2008) y 0.2-0.6% de phytigel (Jan y col., 2001; Ali y col., 2004; Meneses y col., 2005).

También pueden inducirse condiciones de estrés hídrico por desecación, cuyo óptimo puede oscilar de 24-144 h de incubación del callo en oscuridad (Binh y col., 1993; Wenzhong, 1994; Jain y col., 1996; Saharan y col., 2004). No obstante, la incubación prolongada bajo el estrés, puede regenerar plantas con variaciones genéticas o ploidías diversas, tal como lo indicó Yoshida y col. (1998) con manitol, Phong y col. (2001) con un tiempo de desecación prolongado y Krishnaraj y Sreerangasamy (1993) empleando 0.5% de NaCl.

Finalmente, debido al incremento de la población a nivel mundial en el siglo XXI, es imperante satisfacer la demanda alimentaria, y para ello, es importante obtener cultivares resistentes a diversas enfermedades y plagas, como en el caso de *Pyricularia grisea*, así como aumentar el rendimiento y calidad nutricional del grano, por lo cual la utilización de técnicas de cultivo de tejido y/o ingeniería genética, son una manera eficaz de seleccionar variantes a corto plazo y a bajo costo, omitiéndose así los métodos tradicionales de selección de linajes en el campo. Para el logro de dicho proceso, se hace necesario contar con un sistema eficiente de regeneración *in vitro* por embriogénesis somática, optimizando la fase regenerativa a través del estrés hídrico por desecación. El objetivo del presente trabajo fue optimizar el protocolo basado en el estrés hídrico para obtener un alto porcentaje de plantas viables en variedades venezolanas de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se utilizaron como explantes semillas maduras, descascaradas manualmente, de cuatro variedades venezolanas de arroz (*Oryza sativa* L.): Araure-4, Centauro, Cimarrón y Venezuela-21 suministradas por el INIA-Portuguesa. El protocolo de desinfección se realizó en una cámara de flujo laminar horizontal y consistió en lavar las semillas con agua destilada estéril y jabón líquido comercial durante 15 min. en agitación continua; luego con alcohol isopropílico (70%) por 5 min, seguidamente con cloro comercial sin diluir más Tween 20 (2 gotas/10mL) por 30 min, y por último se realizaron 6 cambios (3 min. c/u) con agua destilada estéril. Se utilizaron 100 semillas por tratamiento (10 por placa de Petri), sembrándose *in vitro*, colocando la zona embrional en contacto con el medio, siguiendo un sistema de dos etapas (inducción y regeneración) típico en

cereales (Nabors *y col.*, 1983; Vasil, 1987). En la etapa I (4-8 semanas), se indujo la formación de los callos, utilizando medios con ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) combinado con la citoquinina 6-Benzil-aminopurina (BA), mientras que la segunda etapa consistió, en regenerar plantas a partir de callos embriogénicos con capacidad regenerativa inducidos en la primera fase, remplazándose el 2,4-D por ácido indolacético (AIA), combinado con BA.

Los medios de cultivo, contenían las sales de Murashige y Skoog (1962), 2 mg.L-1 de glicina, 1 mg.L-1 de tiamina-HCl y 0.5 mg.L-1 de piridoxina-HCl (Zhuang y Jia, 1983) Mioinositol 10 mg.L-1 y sacarosa al 30% para los medios de inducción y 50% para los medios de regeneración (Zaidi *y col.*, 2006). Los reguladores de crecimiento utilizados en inducción fueron: 2,4-D a 1 y 3 mg.L-1; K o BA a 2 mg.L-1, dependiendo del medio de inducción óptimo por variedad (Araure- 4: 1 mg.L-1 2,4-D+2 mg.L-1 de K; Cimarron: 3 mg.L-1 2,4-D+2 mg.L-1 de K; Venezuela-21 y Centauro: 1 mg.L-1 2,4-D+2 mg.L-1 de BA) (Fernández y Cardona, 2010), mientras que en regeneración se utilizó AIA a 0.5 mg.L-1 y BA a 2 mg.L-1. Se ajustó el pH a 5.8, se solidificó con agar (1,6 %), y se esterilizó a 15 lb.plg-2 y 121°C (15 min). se sometió A los callos embriogénicos seleccionados (E: compactos de superficie lisa, de apariencia globular, con una coloración blanco-crema), para el proceso regenerativo a un tratamiento de estrés hídrico por desecación por 0, 12, 24, 48 y 72 h (Saharan *y col.*, 2004), repicándose los mismos en placas Petri estériles con papel (bajo condiciones de oscuridad y 30°C); seguidamente los callos fueron subcultivados en medios de regeneración bajo luz continua (120µE/m2s1) y a 30°C.

Con el fin de visualizar el efecto del tratamiento de estrés hídrico, se calculó la frecuencia de

regeneración de plantas, empleando la fórmula planteada por Zaidi *y col.* (2006) tal como se indica a continuación: Frecuencia de regeneración = (#callos regenerados / #callos regenerativos cultivados) x 100. Asimismo, se determinó el promedio de plantas diferenciadas por callo embriogénico regenerado. Todos los datos se analizaron estadísticamente mediante Análisis de Varianza (ANOVA) de una vía con $p \leq 0,05$, mediante el programa Statistica 6,0 de Statsoft C.A.

Los cortes histológicos se realizaron a los callos embriogénicos, fijados en FAA al 50% (sometido a cada tratamiento), mediante un micrótomo de rotación y teñidos con safranina. Para el registro fotográfico se utilizó una lupa Leika DFC 280 y para los cortes un microscopio de luz Leika DM 1000.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La fase de regeneración es la más importante, ya que de ella depende la frecuencia de diferenciación de las plantas; en este sentido es necesario optimizar los parámetros que permitan lograr el desarrollo morfogénico de las mismas en dicha etapa. Así, este trabajo evaluó fundamentalmente el estrés hídrico por desecación en callos embriogénicos en 4 variedades de arroz, como factor optimizador de la regeneración de plantas por embriogénesis somática indirecta. Dicho proceso regenerativo se dio a partir de callos embriogénicos desarrollados de semillas maduras, en medios de inducción con 2,4-D en 4-8 semanas de cultivo (Figura 1a-d). Se observó que a la semana de cultivo *in vitro*, se produjo la germinación de los embriones somáticos en medios sin auxina, y se evidenciaron plantas completas a las 4 semanas (Figura 1e-f).

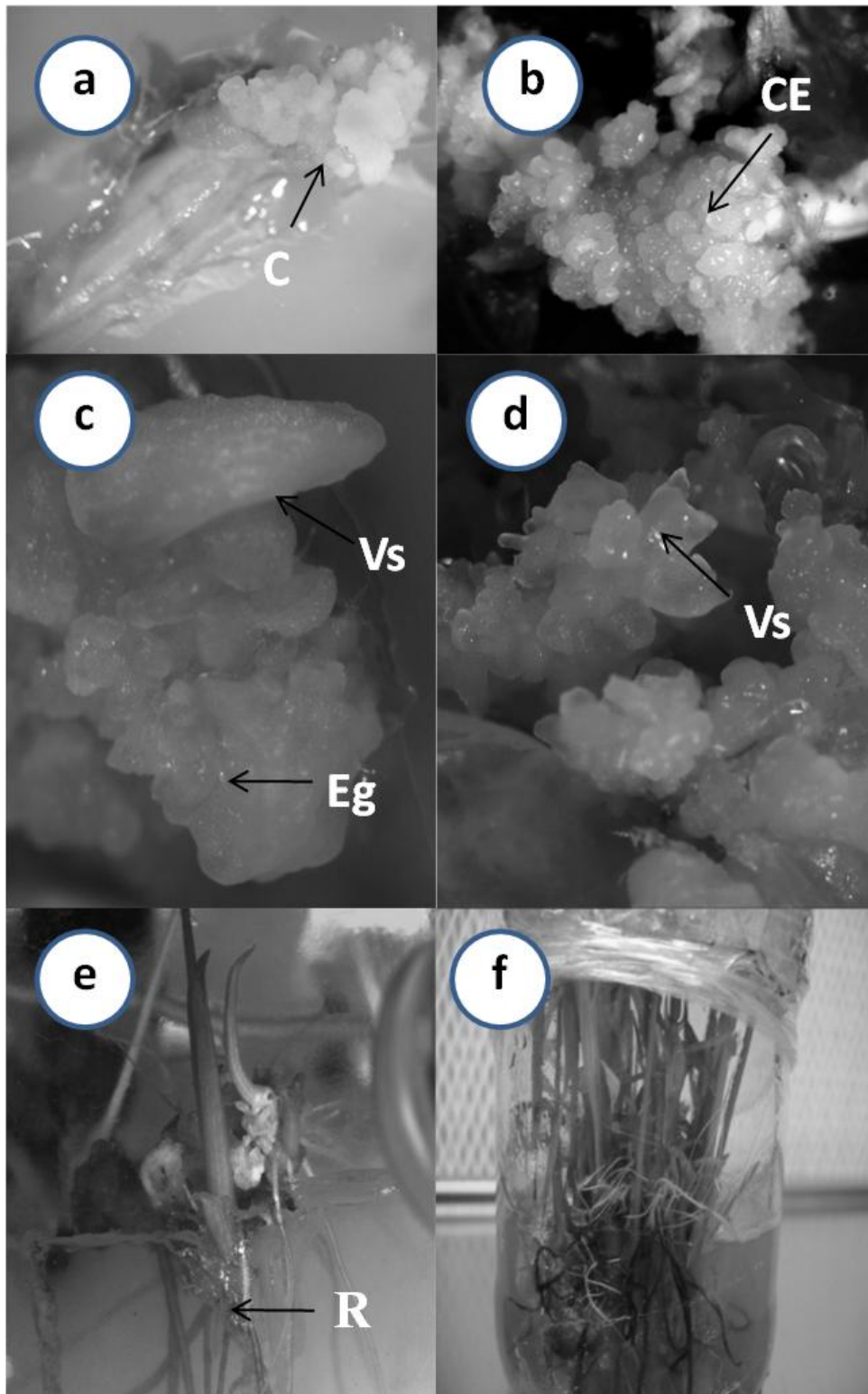


Figura 1. Regeneración de arroz. a. Desarrollo de callo (C) de la zona escutelar de la semilla madura. b. Callo embriogénico (CE). c. Callo E con embriones globulares (Eg) y de mayor desarrollo donde se detalla el vástago (Vs). d. Embriones somáticos germinando donde se observa el vástago. e. Plántulas de arroz donde se evidencian las primeras hojas y la raíz (R). f. Numerosas plantas formando una Macolla.

La optimización de la etapa de regeneración en cereales como el arroz es lograda mediante estrés osmótico, subcultivando los callos embriogénicos en medios de cultivo suplementados con algún agente que ejerza estrés hídrico, tales como polietilenglicol, sacarosa, maltosa, manitol, sorbitol o sales, así como la desecación. Así tenemos que Rubi y col. (1999) obtiene un mayor número de plantas transgénicas (por bombardeo) tratando los callos embriogénicos 4-16 h con 1% de Sorbitol o manitol antes de realizar la transformación por biobalística. También el tratamiento con manitol (0.4 M) puede ser más prolongado, encontrándose una mayor regeneración a las 48 h (Dode, 2005). En el caso de la sacarosa, se indica 3% (Krishnaraj y Sreerangasamy, 1993) o 3-6% (Higuchi y Maeda, 1991; Grewal y col., 2005), mientras que para la maltosa se señala 2-3% (Grewal y col., 2005; Geng y col., 2008). En relación al polietilenglicol, se emplea de 5-30%, siendo óptimo al 5% pero no se reporta regeneración (Al-Bahrany, 2002). Con respecto al agente solidificante, tenemos el phytigel, al 0.2-0.6% (Jan y col., 2001; Ali y col., 2004; Meneses y col., 2005). Por otra parte, al emplear sales como NaCl de 0,5-4,75%, se disminuye el crecimiento del callo y el porcentaje regenerativo, acumulándose mayores concentraciones de prolina en las células a niveles superiores de 1,5% (Cha-Um y col., 2010, Htwe y col., 2011ab), siendo óptimo para una mayor diferenciación de plantas de 0.5-1% de la sal (Tam y Lang, 2003; Saleem y col., 2005). Por último, un tratamiento muy empleado es el estrés hídrico por desecación, basado en la incubación en oscuridad de los callos embriogénicos en placas de Petri con papel de filtro y sin medio, observándose una mayor diferenciación de plantas de 24-144 h (Wenzhong, 1994), siendo el óptimo de 24-72 h (Binh y col., 1993; Jain y col., 1996; Saharan y col., 2004).

En este trabajo se evaluó como tratamiento de estrés osmótico, el de tipo físico por desecación, el cual consistió en someter a los callos embriogénicos a nula exposición al medio de cultivo, no teniendo por ende agua por distintos intervalos de tiempo (12 h, 24 h, 48 h y 72 h), lográndose así evidenciar diferencias significativas tanto en la frecuencia regenerativa como en el promedio de plantas diferenciadas en todas las variedades de arroz probadas; observándose que las frecuencias regenerativas oscilaron entre 16-50% (Tabla 1), mientras que el promedio de diferenciación de plantas estuvo entre 3,12 y 17,19 (Tabla 2).

Tabla 1. Frecuencias de regeneración de plantas en las Variedades: Araure-4, Cimarrón, Venezuela-21 y Centauro.

Estrés hídrico (horas)	Frecuencias			
	Araure-4	Cimarrón	Venezuela2	Centauro
0	35	29	25	30
12	34	32	30	32
24	*45	*50	*47	35
48	18	16	19	*44
72	-	-	-	-

-sin diferenciación *Diferencia significativa con $p \leq 0,05$.

La frecuencia regenerativa fue significativamente mayor a las 24 h de tratamiento por desecación en Araure-4 (45%), Cimarrón (50%) y Venezuela-21 (47%), mientras que a 48 h Centauro regenero 44%, no lográndose diferenciación de planta alguna a las 72 h, debido a que los callos en dicho tratamiento se necrosaron en la primera semana de cultivo (Tabla 1).

Tabla 2. Diferenciación de plantas por callo embriogénico regenerado en las Variedades: Araure-4, Cimarrón, Venezuela-21 y Centauro.

Estrés hídrico (horas)	Promedio de plantas diferenciadas			
	Araure-4	Cimarrón	Venezuela21	Centauro
0	8,50±0,87	8,3±0,77	7,67±0,47	8,93±0,52
12	8,40±0,93	8,20±0,73	8,62±0,78	9,05±0,45
24	*16,80±0,56	*16,15±0,67	*16,90±0,68	9,12±0,33
48	3,80±0,54	3,6±0,53	3,12±0,49	*17,19±0,53
72	-	-	-	-

-sin diferenciación *Diferencia significativa con $p \leq 0,05$.

De igual manera, se encontraron diferencias significativas con el promedio de plantas diferenciadas a 24 h de desecación, donde se obtuvieron 16,8 plantas por callo para Araure-4, 16,15 para Cimarrón y 16,9 para Venezuela-21, al contrario de Centauro donde se observó la mayor diferenciación a 48 h con 17,19 plantas por callo. Por lo cual, la frecuencia de regeneración y el promedio de plantas diferenciadas están en estrecha concordancia. En este sentido, los resultados encontrados ratifican el papel potencial de la desecación en el incremento significativo de la regeneración *in vitro* de plantas de arroz índica, tal como lo han descrito Saharan y *col.* (2004) y Biswas y Maldal (2007), los cuales plantean que el óptimo de regeneración en variedades de arroz está entre 12 a 48 h.

Realizando la evaluación histológica pertinente en los callos embriogénicos de las cuatro variedades de arroz probadas en función del estrés osmótico por desecación, se observó que las células meristemáticas (pequeñas, de forma isodiamétricas y densas en citoplasma) 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 de que a mayor tiempo de exposición a la desecación, las células meristemáticas se tornaban más densas en su contenido citoplasmático, particularmente en gránulos de almidón, a su vez se presentaba una mayor densidad de tejido vascular en la zona interna del callo, particularmente a 24 y 48 h (Figura 2a-d).

El estrés hídrico afecta tanto el grado de desarrollo del callo, como su capacidad regenerativa tanto en organogénesis como de embriogénesis somática, aparentemente esto está relacionado al estatus hídrico fisiológico a nivel celular. En este sentido, en callos de arroz Indica sometido a este tipo de estrés determina una significativa disminución del peso fresco, contenido de agua y el potencial osmótico de callo con capacidad regenerativa, evidenciándose en la gran acumulación de gránulos de almidón en las células de dicho callo, previo a la transferencia a medio de regeneración; dicho almidón posiblemente será fuente de energía para el desarrollo de plantas, ya que este desaparece en esa fase, aumentando la actividad de enzimas hidrolíticas y el nivel de glucosa libre (Huang y Liu, 2002). En este orden de ideas, nuestros resultados corroboran de manera contundente este

hecho, ya que los callos E con mayor capacidad regenerativa de plantas en los tratamientos de desecación, presentaron zonas de células meristemáticas densas en citoplasma, particularmente con gran acumulación de almidón, el cual

juega un papel preponderante en la subsiguiente diferenciación de raíces, brotes o plantas completas en la etapa de regeneración, tal como lo afirman Brisibe y col. (1995).

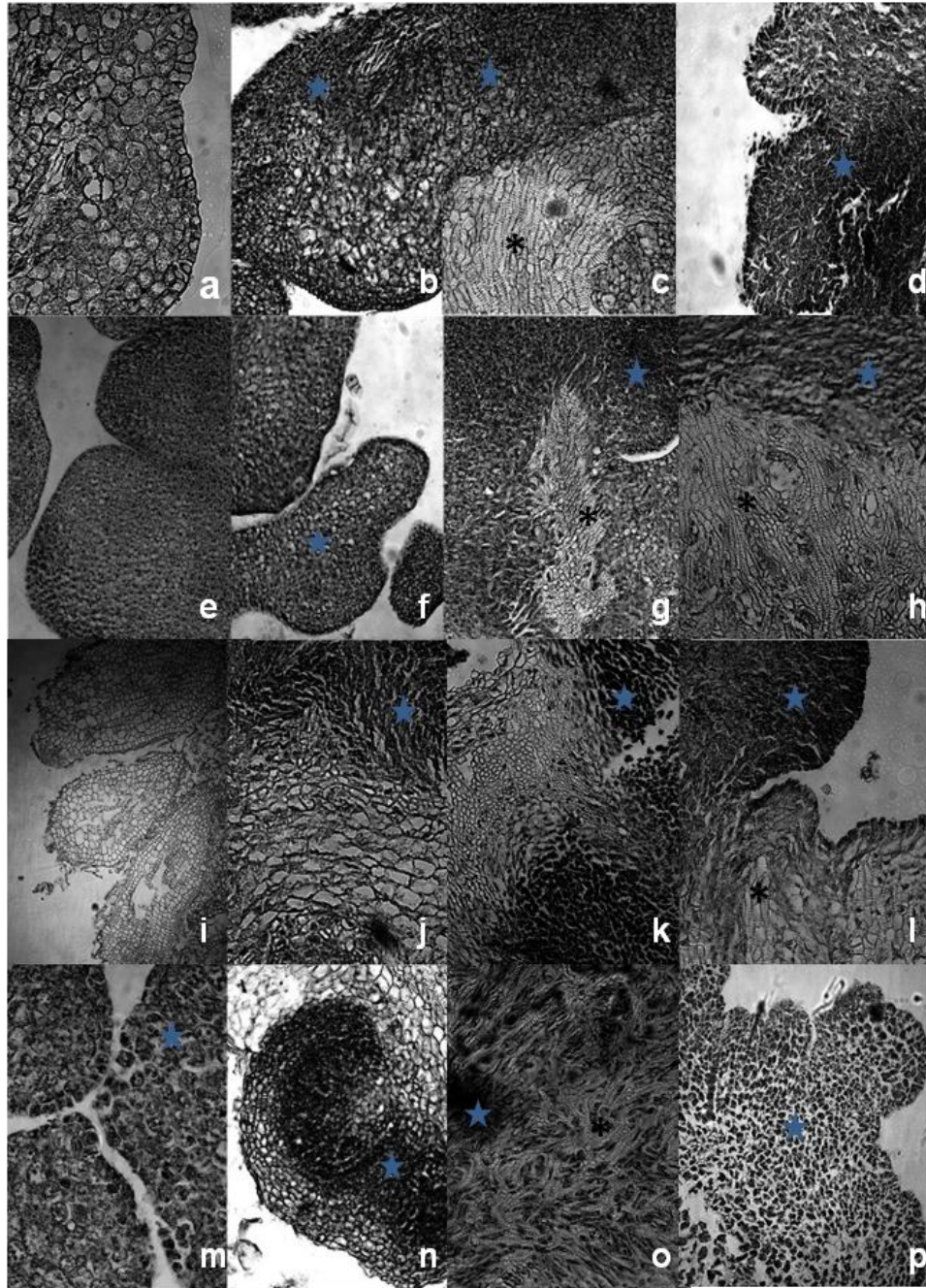


Figura 2. Histología de callos embriogénicos sometidos a estrés osmótico por desecación (400X). Araure-4 (a:0 h, b:12 h c:24 h d:48 h). Centauro (e:0 h, f:12 g:24 h, h:48 h). Cimarron (i:0 h, j:12 h, k:24 h, l:48 h). Venezuela-21 (m:0 h, n:12 h, o:24 h, p:48 h). Células densas en citoplasma, ★ Tejido vascular *.

Por otra parte, es relevante señalar que el grado de compactación y la capacidad regenerativa del callo están asociados al desarrollo de tejido vascular tipo xilema mediante el proceso denominado xilogénesis; dichos vasos al parecer están relacionados al transporte de los nutrientes necesarios para el desarrollo del callo, así como de estructuras regenerativas tales como embriones somáticos, brotes y raíces. Así, cuanto mayor es el potencial embriogénico y por ende de regeneración de un callo, mayor será el área de vasos xilemáticos, particularmente en la parte central del mismo (Sangduen y Klamsomboon, 2001). En este sentido, nuestros resultados reafirman el planteamiento anteriormente descrito, ya que los callos con mayor capacidad regenerativa de plantas en función del estrés ensayado presentaron un abundante desarrollo de vasos de xilema.

De tal forma, al parecer el estrés hídrico favorece la regeneración, ya que induce cambios estructurales y enzimáticos en la conformación de la pared celular (Crosgrovel, 1997), así como en el metabolismo de los carbohidratos, incrementándose el nivel de azúcares solubles (glucosa) a partir de la degradación de almidón (Huang y Liu,

2002). En este sentido, el rol del estrés ya sea físico o químico, es fundamental en el cambio y/o activación del programa genético relacionado a los procesos de desdiferenciación y diferenciación embriogénica, donde de manera preponderante juega un papel esencial la metilación del ADN en el ciclo celular, pudiendo hasta llegar a ser causa de variaciones genéticas irreversibles las cuales conlleven a variantes somaclonales y por ende nuevas variedades (Zavattieri y *col.*, 2010). De tal manera, que los resultados descritos en este trabajo reafirman el hecho que el estrés hídrico y en particular el de desecación, influye en la regeneración por embriogénesis somática, ya que se incrementó la misma en un tiempo óptimo de desecación de 24-48 h, dependiendo fundamentalmente de la variedad, concordando con lo señalado por Saharan y *col.* (2004).

En conclusión, el estrés hídrico por desecación del callo embriogénico durante períodos de 24 a 48 horas, favoreció significativamente la regeneración de plantas por embriogénesis somática indirecta, observándose una respuesta diferencial dependiente del genotipo utilizado y del tiempo del tratamiento.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico de la Universidad de Carabobo

(CDCH-UC) por la subvención de esta investigación a través de la inversión menor CDCH-0402-10.

LITERATURA CITADA

- Abreu, E., Gutiérrez, H., Fontana, R., Cartay, L., Molina, E., Kesteren, A. y Guillory, M. 1993. La Agricultura. Componente básico del sistema alimentario venezolano. Fundación Polar. Caracas-Venezuela, 500 p.
- Al-Bahrany, A. M. 2002. Callus growth and proline accumulation in response to polyethylene glycol-induced osmotic stress in rice, *Oryza sativa* L. *Pak. J. Biol. Sci.*, 5(12):1294-1296.
- Ali, S., Zhong, X. y Xiang-Yin, Z. 2004. Assessment of various factors involved in the tissue system of rice. *Rice Sci.* 11(3):345-349.
- Bajaj, Y. P. 1984. The regeneration of plants from frozen pollen embryos and zygotic embryos of wheat and rice. *Theor. Appl. Genet.*, 67:525-528.
- Bannikova, V. y P. Barabanova, E. A. 1990. Induction and histological characteristics of somatic embryogenesis in cereal tissue cultures. *Tsitologiya i Genetika*, 24(2):61-68.
- Belyanskaya, S. L. Shamina, Z. B. y Kucherenko. L. A. 1994. Morphological in stress-resistant rice clones. *Russian J. of Plant Physiol.*, 41(4):503-506.
- Bhattacharya, P. y Sen. S. K. 1980. Potentiality of leaf sheath cells for regeneration of rice. *Theor. Appl. Genet.*, 58:87-90.
- Binh, D. Q., Fabian, F. y Le, H. 1993. Responses to continuous and discontinuous NaCl stress of long-term cultured rice (*Oryza sativa* L.) cells. *Acta Biol. Hung.*, 44 (2-3):197-210.
- Biswas, A. y Maldal, A. 2007. Plant regeneration in different genotypes of indica rice. *Rev Indian Journal of Biotechnology.* 6:532-534.
- Brisibe, E. A., Nishioka, D. y Miyake, H. 1995. Ultrastructural changes leading to plantlet differentiation in callus cultures of African rice. *Jap. J. Crop. Science.*, 64(1)121-130.
- Cha-Um, S., Nhung, N. y Kirdmanee, C. 2010. Effect of mannitol and salt-induced iso-osmotic stress on proline accumulation, photosynthetic abilities and growth characters of rice cultivars (*Oryza sativa* L. spp. Indica). *Pak. J. Bot.* 42(2):927-941.
- Crosgrove, D. J. 1997. Relaxation in a high-stress environment: The molecular basis of extensible cell walls and cell enlargement. *The Plant Cell.* (9) 1031-1041.
- Danac. 2004. Fundación para la Investigación Agrícola. <http://www.Danac.com> [Consulta: 2004, Octubre 31].
- Dode, L. 2005. Efeito do condicionamento osmótico na regeneração de callus induzidos em sementes maduras de dois genótipos elite de arroz: BRS7 "Taim" e BRS6 "chuí". [Consulta: 2005, Octubre 10]. <http://www.redbio.org/portal/encuentros/enc-2001/poster/01>.
- Dun-Yi, Y. y Krikorian, A. D 1981. Multiplication of rice (*Oryza sativa* L.) from aseptically cultured nodes. *Ann. Bot.* 48:255-259.
- Fernández, R. y Cardona, A. 2010. Establecimiento de un sistema de regeneración *in vitro* de cultivares venezolanos de arroz (*oryza sativa* L.). *FARAUTE* 5(1):en prensa.
- Geng, P., La, H., Wang, H. y Stevens, E. 2008. Effect of sorbitol concentration on regeneration of embryogenic calli in upland rice varieties (*Oryza sativa* L.). *Plan Cell Tiss. Organ Cult.*, 92:303-313.
- Grewal, D., Gill, R. y Gosal, S. S. 2005. Factors enhancing induction of high frequency plant regeneration from somatic embryos of indica rice (*Oryza sativa* L.). *J. Biol. Sci.*, 5(6):697-702.
- Heyser, J. W., Dykes, T. A., DeMott, K. J. Y Nabors, M. W. 1983. High frequency long term regeneration of rice from callus culture. *Plant Sci. Lett.*, 29:175-182.
- Higuchi, N. Z. y Maeda, E. 1991. Effect of pre-treatment with excess sucrose or mannitol on plant regeneration from rice callus. *Jap. J. Crop. Sci.* 60:122-129.
- Hill A. 1965. Botánica Económica. Plantas útiles y productos vegetales. Ediciones Omega, Barcelona-España, 616 p.
- Htwe, N., Maziah, M., Ling, H., Zaman, F. y Zain A. 2011a. Regeneration capacity of cell suspension culture in Malaysian rice genotypes under salinity stress. *Asian J. Biotechnology*, 3(4):1-11.
- Htwe, N., Maziah, M., Ling, H., Zaman, F. y Zain, A. 2011b. Responses of some selected Malaysian rice genotypes to callus induction under *in vitro* salt stress. *Afr. J. Biotechnology*, 10(3):350-362.
- Huang, W. L. y Liu L. F. 2002. Carbohydrate metabolism in rice during callus induction and shoot regeneration induced by osmotic stress. *Bot. Bull. Acad. Sin.*, 43:107-113.
- Jain, R. K., Jain, S. y Wu, R. 1996. Stimulatory effect of water stress on plant regeneration in aromatic indica rice varieties. *Plan Cell Rep.* 15:449-454.
- Jan, A. Q., Hassan, M., Fatima, T. y Hasnai, T. 2001. Tissue culture response of Local Varieties of Rice

- (*Oryza sativa* L.) of NWFP. *Journal Biological Sciences*, 1:387-390.
- Kabir, K., Kawata, S. y Ishihara, A. 1968. The regeneration of rice plant, *Oryza sativa* L., in the callus derived from the seminal root. *Proc. Japan Acad.*, 44(6):549-553.
- Kawata, S. y A. Ishihara. 1968. The regeneration of rice plant, *Oryza sativa* L., in the callus derived from the seminal root. *Proc. Japan Acad.*, 44(6):549-553.
- Khanna, H.K. y Raina, S. K. 1998. Genotype x culture media interaction affects on regeneration response of three indica rice cultivars. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.*, 52:145-153.
- Khatun, M. M. y Desamero, N. V. 2005. Callus induction and plant regeneration from rice epicotyl. *Plant Tissue Cult.*, 15(1):51-56.
- Kranz, J., Schmutterer, H. y Koch, W. 1978. Diseases pests and weeds in tropical crops. John Wile y Sons, Chichester Great Britain, 670 p.
- Krishnaraj, S. y Sreerangasamy S. R. 1993. *In vitro* salt tolerance screening in long-term anther cultures of rice (*Oryza sativa* L.) variety IR50. *J. Plant Physiol.*, 142:754-758.
- Lee, H. J., Seebauer, J. R. y Below, F. E. 2000. An improved technique for culture of rice panicles. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.*, 60:55-60.
- Meneses, A., Flores, D., Muñoz, M., Arrieta, G. y Espinoza, A. 2005. Effect of 2,4-D, hydric stress and light on indica rice (*Oryza sativa*) somatic embryogenesis. *Rev. Biol. Trop.*, 53(3-4):361-368.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Plant Physiol.*, 15:473-497.
- Nabors, M. W., Heyser, J. W., Dykes, T. A. y Demott, K. J. 1983. Long-duration, high- frequency plant regeneration from cereal tissue cultures. *Planta* 157:385-391.
- Nakano, H. y Maeda, E. 1979. Shoot differentiation in callus of *Oryza sativa* L. *Z. Pflanzenphysiol.* B.d. 93:449-458.
- Phong, D. T., Muol, L. T. y Binh, L. T. 2001. RAPD variability in rice (*Oryza sativa* L.) plants derived from desecation-tolerant calli. *Euphytica*, 121:297-303.
- Raemakers, C. J., Jacobsen, E. y Visser, R. G. 1995. Secondary somatic embryogenesis and applications in plant breeding. *Euphytica* 81: 93-107.
- Repellin, A., Baga, M., Jauhar, P. P. y Chibbar, R. N. 2001. Genetic enrichment of cereal crops via alien gene transfer: New challenges. *Plan Cell Tiss. Org. Cult.*, 64:159-183.
- Rongbai, L., Pandey, M. P., Garg, G. K., Pandey, S. K., Dwivedi, D. K. y Ashima, A. 1998. Development of a technique for *in vitro* unpollinated ovary culture in rice, *Oryza sativa* L. *Euphytica*, 104:159-166.
- Rubi, J., Carbonero, P. y Díaz, I. 1999. Parameters influencing the regeneration capacity of calluses derived from mature indica and japonica seeds after microprojectile bombardment. *Euphytica*, 107:115-122.
- Rueb, S., Leneman, M., Schilperoort, R. A. y Hensgens, L. A. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plan Cell Tiss. Org. Cult.*, 36:259-264.
- Saharan, V., Yadav, R. C., Yadav, N. R. y Chapagain, B. P. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza Sativa* L.) *African Journal of Biotechnology*, 3(5):256-259.
- Sahrawat, A. K. y Chand, S 2001. High-frequency plant regeneration from coleoptile tissue of indica rice (*Oryza sativa* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant*, 37:55-61.
- Saleem, M. Y., Mukhtar, Z., Cheema, A. A. y Atta, B. M. 2005. Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Environ. Sci. Tech.*, 2(2):141-145.
- Sangduen, N. y klamsomboon, P. 2001. 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.*, 35:427-432.
- Tam, D. y Lang, N. 2003. *In Vitro* selection for salt tolerance in rice. *Omonrice*, 11:68-73.
- Uno G. Storey R. Moore A. 2001. Principles of Botany. Mc Graw Hill. USA, 552 p.
- Vasil, I. K. 1987. Developing cell and tissue culture systems for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiol.*, 128:193-218.
- Wenzhong, T. 1994. Improvement of plant regeneration frequency *in vitro* in indica rice. *Chinese J. Genetics*, 21(3):1-9.
- Ye, X., Al-Babili, S., Klöti, A., Zhang, J., Lucca, P., Beyer, P. y Potrykus, I. 2000. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 287:303-305.

- Yoshida, S., Watanabe, K. y Fujino, M. 1998. Non-random gametoclonal variation in rice regenerants from callus subcultured for a prolonged period under high osmotic stress. *Euphytica*, 104:87-94.
- Zaidi, M. A., Narayanan, M., Sardana, R., Taga, I., Postel, S., Johns, R., McNulty, M., Mao, J., Loit, E. y Altosar, I. 2006. Optimizing tissue culture media for efficient transformation of different indica rice genotypes. *Agronomy Research* 4(2):563-575.
- Zavattieri, M., frederico, A., Lima, M., Sabino, R. y Arnholdt-Schmitt, B. 2010. Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *E. J. Biotechnology*, 13(1):1-9.
- Zhao, J., Zhou, C. y Yang, H. Y. 1999. *In vitro* developmental of early proembryos and plant regeneration via microculture in *Oryza sativa*. *Plan Cell Tiss. Organ Cult*, 55:167-174.
- Zhuang, J.J. y Jia, X. 1983. Increasing differentiation frequencies in Wheat pollen callus. En: Cell and Tissue culture techniques for cereal crop improvement. Proceedings of a workshop. Responsores by Institute of Genetic *Academic Sinica. Science press.* pp. 453-459.