

Efectividad de medios de cultivo y evidencia histológica de la morfogénesis *in vitro* durante la callogénesis en arroz (*Oryza sativa* L.).

Miriam L. Prede Rodríguez*, José B. Rodríguez Soria**, Lisbet Rodríguez Machado** y Yenexy Coronado Hernández**

*Instituto de Ecología y Sistemática, CITMA

**Dpto. de Biología Vegetal, Facultad de Biología, Universidad de La Habana

RESUMEN

Para la mayoría de las gramíneas, la inducción del callo resulta esencial en la iniciación de los cultivos y en el desencadenamiento de los eventos morfogénicos en condiciones *in vitro*. Semillas maduras de las variedades Jucarito-104 (J-104), Pokkali (Pok) e IACUBA-23 (IAC-23), previamente descascaradas y desinfectadas, constituyeron el explante inicial. Se probaron 4 combinaciones de medios de cultivo a partir de las sales de Murashige y Skoog (1962) (MS) y Chu *et al.*, 1975 (N₆), el ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) 2.0 mg/L y la Kinetina (KIN) 1.0 mg/L y se efectuaron cortes histológicos a los callos R₀ resultantes. Los medios I y II favorecieron la callogénesis y ejercieron una acción diferencial sobre la formación de centros meristemáticos y la diferenciación de elementos traqueales.

Palabras clave: *Oryza sativa* L., callogénesis, medios de cultivo, morfogénesis, histología

ABSTRACT

In most Gramineae, callus induction is essential to culture initiation and unleashing of *in vitro* morphogenetic events. Mature seeds of Jucarito-104 (J-104), Pokkali (Pok) and IACUBA-23 (IAC-23) varieties, previously husking and disinfected, were the initial explant. 4 combinations of culture media were tested, using Murashige and Skoog (1962) (MS) and Chu *et al.*, 1975 (N₆) salts, 2,4 -dichlorophenoxyacetic acid (2,4-D) 2.0 mg/L and Kinetin (KIN) 1.0 mg/L and histologic cuts were performed on the resulting R₀ callus. Callogenesis was enhanced by media I and II which had a differential effect on the formation of meristem centres and differentiation of tracheal elements.

Key words: *Oryza sativa* L., callogenesis, culture media, morphogenesis, histology

INTRODUCCIÓN

La callogénesis constituye el proceso más generalizado para el inicio de los cultivos de gramíneas en condiciones *in vitro*. Su inducción y establecimiento aseguran el desarrollo morfogénico ulterior.

Una vez establecido el cultivo a través de los callos, de acuerdo con la 'determinación' celular, se suceden eventos de rediferenciación que conducen a la formación incipiente de órganos y/o 'embrioides' como primeras manifestaciones morfogénicas (Dodds y Roberts, 1995; López, 1996).

La morfología, color, friabilidad y anatomía de los callos varía mucho, es por ello que las descripciones morfológica e histológica brindan evidencias de la morfogénesis que recién se induce desde dicho estadio. Además, contribuyen a discriminar el carácter órgano y/o embriogénico de los callos, su origen y las células que intervienen en el proceso.

El presente trabajo tiene como objetivos establecer un medio de cultivo adecuado para la iniciación de callos a partir de semillas de las variedades Jucarito 104 (J-104), Pokkali (Pok) e IACUBA 23 (IAC-23) de arroz y caracterizar los callos R₀ resultantes de los medios de inducción promisorios.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se emplearon semillas maduras de las variedades comerciales Jucarito 104 (J-104), Pokkali (Pok) e IACUBA 23 (IAC-23) de arroz (*Oryza sativa* L.), pertenecientes a la subespecie *indica*, obtenidas del Banco de Germoplasma del Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA).

Las semillas previamente descascaradas fueron expuestas a una doble desinfección: sumergidas inicialmente en solución de Hipoclorito de Sodio (NaHOCl) 2.5 % y 0.2 % de Tween 80 y con posterioridad en solución de Bicloruro de Mercurio (HgCl₂) 0.1 %, por espacio de 15 min. en cada una, con agitación ligera e interrumpida. Luego de cada inmersión en las diferentes soluciones, el conjunto de semillas se sometió a tres enjuagues consecutivos con agua destilada (H₂O_d) estéril.

Posteriormente se colocaron, de forma individual, en tubos de ensayo que contenían 15 mL de cada una de las variantes de medio de cultivo probadas (Tabla I). Dichas variantes se confeccionaron a partir de las sales de Murashige y Skoog, 1962 (MS) y Chu *et al.*, 1975 (N₆), el ácido 2,4 -diclorofenoxiacético (2,4-D) 2.0 mg/L y la Kinetina (KIN) 1.0 mg/L, con un total de 16 réplicas por tratamiento. Se añadió sacarosa (azúcar refino comercial) 30 g/L y agar (Agar-Agar, SIGMA) 9 g/L. Se ajustó el pH

de los medios a 5.7 y se esterilizaron en autoclave (120 °C) durante 20 min.

Al cabo de una semana se procedió a la escisión de coleóptilos y radículas brotados, reinoculando las semillas en sus respectivos recipientes, que se mantuvieron en condiciones de oscuridad, a la temperatura de 25 ± 2 °C hasta el término de un mes, momento en el cual fueron evaluados los siguientes parámetros: formación del callo, dimensiones (longitud máxima de expansión celular, en cm), coloración y textura o apariencia.

Para los estudios histológicos se seleccionaron fragmentos (0.5-1.0 cm) de callos de las 3 variedades, obtenidos en fase de cultivo R₀, con 5 semanas en los medios de inducción I y II. Dichos fragmentos se fijaron en solución AFA (Alcohol absoluto-Formaldehído-Ácido Acético Glacial) de acuerdo con Peña y Saralegui (1982), por período de 5.5 meses y se sometieron a un procesamiento mecánico según Borrajero *et al.* (1982 a), a continuación fueron incluidos en parafina quedando conformado un bloque por muestra, al cual se le practicaron cortes seriados mediante el micrótopo de deslizamiento, a 8 μ m de espesor.

La tinción, tipo regresiva, se desarrolló también a través de un procesador mecánico, empleando los colorantes Hematoxilina Alúmina de Harris y Eosina, según la técnica de rutina descrita por Borrajero *et al.* (1982 b).

Las observaciones fueron realizadas con un microscopio óptico complejo de campo brillante Axiolab MC 80, Carl Zeiss, con cámara fotográfica adaptada, a aumentos de 100 X y 400 X de acuerdo con el objeto de observación. Cada tratamiento fue caracterizado a través de 3 preparaciones, sobre las que a su vez se efectuaron un

promedio de 3 observaciones aleatorias dirigidas a evaluar: número de centros meristemáticos, dimensiones de los centros meristemáticos (longitud y amplitud máximas, en μ m) y número de traqueídas (para la medición de este carácter se asumieron 5 rangos o niveles cuantitativos: 0; 1-10; 11-20; 21-30; > 30 traqueídas).

Los datos obtenidos del experimento de inducción se procesaron estadísticamente a través de un ANOVA factorial y la correspondiente prueba de Duncan para la comparación múltiple de medias, mientras que aquellos resultantes de la evaluación histológica se incorporaron a una tabla de contingencia R x C y se les aplicó la prueba G. Todo el procesamiento se realizó según el paquete estadístico TONYSTAT (Sigarroa, 1987).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

1.1- Inducción de callogénesis.

Las mayores frecuencias de inducción de callos así como los valores promedio más elevados de su crecimiento, se obtuvieron en los medios de cultivo I y II (Fig. 1). Las dimensiones de los callos en dichas combinaciones, sobrepasaron los 0.7 cm, mientras que en los medios III y IV se produjo un crecimiento pobre, inferior a los 0.5 cm.

El rango porcentual de las mejores frecuencias se enmarcó en orden similar a aquellas reportadas por Ravi y Minocha (1993) y Rueb *et al.* (1994) al emplear precisamente las sales de MS con 2,4-D 2.0 mg/L y por Ravi, D. y Minocha (1993) al combinar 2,4-D y KIN, pero a iguales concentraciones por valor de 1.5 mg/L. Sin embargo, los resultados de inducción en el caso del tratamiento III, no guardan correspondencia con el 100 % de formación de callos obtenido por Rueb *et al.* (1994) en la propia combinación de medio.

TABLA I

Medios de cultivo para la inducción de callos de arroz.

		I	II	III	IV
Sales	MS	+	+	-	-
Solución de vitaminas	N₆	-	-	+	+
	A	-	+	+	+
	B	+	-	-	-
Fitohormonas	2,4-D (2.0 mg/L)	+	+	+	+
	KIN (1.0 mg/L)	-	+	-	+
Mioinositol	100 mg/L	-	+	+	+
	200 mg/L	+	-	-	-

A: Solución de vitaminas de MS.

B: Solución de vitaminas de MS con Tiamina (1.0 mg/L).

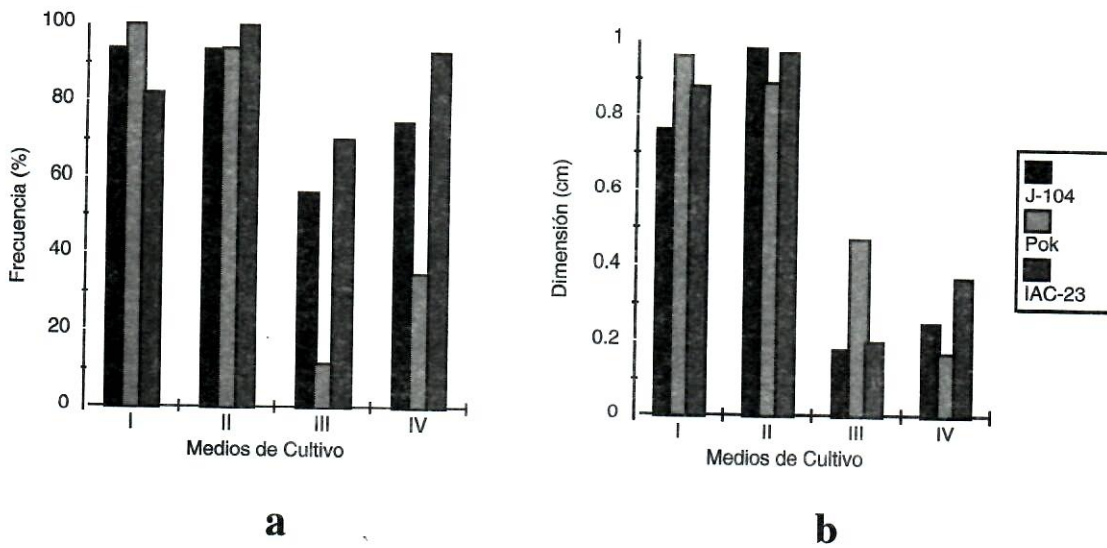


Fig. 1. Frecuencias de inducción (%) y crecimiento promedio (cm) de los callos, al cabo de 30 días de cultivo.

Ahmad *et al.* (1994) exponen un crecimiento menor de 4.0 cm para callos de tres semanas, iniciados en medio semejante al II y sólo dimensiones similares a las alcanzadas en el presente experimento, a concentraciones de 2,4-D superiores a 5.0 mg/L.

Los callos se caracterizaron además por presentar una superficie irregular con textura compacta de aspecto noduloso y globular y una coloración que osciló entre blanquecino y amarillo tal como se describe para cereales, en el caso de aquellos de tipo embriogénico (Nabors *et al.*, 1983; Siriwardana y Nabors, 1983; Meijer *et al.*, 1991; Vasil y Vasil, 1993; Whenzong *et al.*, 1994) y en específico para este cultivo (Ravi, D. y Minocha, 1993; Ravi y Minocha, 1993; Ravi *et al.*, 1993; Rueb *et al.*, 1994; Zhu *et al.*, 1996).

El medio de cultivo, tal como evidenció el análisis de varianza (ANOVA) factorial se convirtió en el factor clave para el crecimiento del callo, resultado que concuerda con el obtenido por Rueb. *et al.* (1994), donde la frecuencia de inducción de callos fue medio de cultivo dependiente.

No existe interacción significativa entre las variedades y el medio de cultivo, independientemente de dichos factores, se va a producir división celular y por consiguiente el crecimiento. De igual forma cualquiera de los tres genotipos es capaz de desdiferenciar el tejido seminal para formar callo, aunque la variedad IAC-23 mostró, ligeramente, mejor crecimiento y mayor respuesta de inducción en los cuatro tratamientos de medios de cultivo (Fig. 1).

Los medios probados difieren muy significativamente entre sí, indicando su influencia directa sobre el crecimiento del callo.

De acuerdo con los resultados de la prueba de Duncan, graficados en la figura 2, no existen diferencias significativas entre los medios I y II para inducir la formación de callo e incrementar su crecimiento, por lo que tratándose la combinación II de un medio menos suplementado, con una composición hormonal balanceada y proporcional de acuerdo con la finalidad a la que se destina y que logra además, para las tres variedades, frecuencias de inducción superiores al 93 %, pudiera emplearse convenientemente como medio inductor y/o de mantenimiento de callos.

En este sentido es apreciable el incremento de biomasa en callos que luego de 1 mes de iniciados (Fase R₀), son subcultivados por otro mes (Fase R₁) en el propio medio II (Fig. 3).

El suplemento fitohormonal empleado, propició la inducción de callos. Se plantea que la adición de 2,4-D es generalmente suficiente para inducir la proliferación celular, imprescindible para la formación de cultivos morfogénicos, relacionándola con el desencadenamiento de la embriogénesis somática (López, 1996; Jain e Ishii, 1997). La concentración de 2.0 mg/L se aprueba como el nivel óptimo para lograr la iniciación de callos en arroz (Ravi y Minocha, 1993). Además, también se aduce que las citoquininas actúan junto con las auxinas para estimular la división celular en los callos (Zhu *et al.*, 1996) y que dicha combinación favorece el proceso de callogénesis en arroz *indica* (Wenzhong *et al.*, 1994). Dodds y Roberts (1995) especifican a la KIN como la citoquinina típicamente añadida.

Las variantes III y IV brindaron los menores niveles de respuesta, a pesar de contar con una composición fitohormonal similar a la contenida en I y II y comúnmente

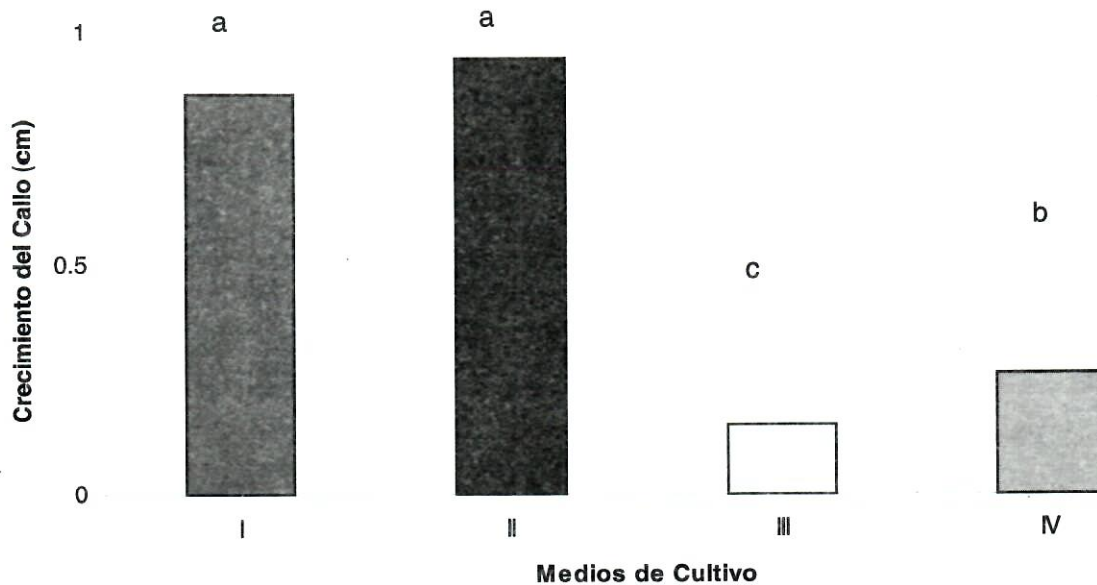


Fig. 2. Influencia de los medios de inducción I, II, III y IV sobre el crecimiento de los callos. $p < 0.05$ (Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos).

propuesta como efectiva para la inducción de callos (Ravi *et al.*, 1993; Ahmad *et al.*, 1994; Dodds y Roberts, 1995). En particular el medio III se destacó como el menos favorable para la calogénesis en las tres variedades. Dichas variantes contienen como medio basal las sales del medio N₆ (1975), propuesto por varios autores para la inducción de calogénesis en arroz, pero a partir de anteras (Ravi, D. y Minocha, 1993; Ravi *et al.*, 1993; Ayres *et al.*, 1995; Sathish *et al.*, 1995) y por unos pocos al emplear semillas (Ravi y Minocha, 1992; Mitsuoka *et al.*, 1994; Rueb *et al.*, 1994). Se ha planteado que su aplicación en arroz *indica*, subespecie a la que pertenecen las semillas probadas, es limitada por lo que se realizan intentos para modificarlo y perfeccionar su utilidad (Reddy *et al.*, 1985), así se han conjugado convenientemente parte de sus elementos con los de otros medios de cultivo conocidos (Rancé *et al.*, 1994; Wenzhong *et al.*, 1994).

El medio antes mencionado, a diferencia del MS (1962) -reconocido como el más utilizado en gramíneas (López, 1996) y constituyente principal de los tratamientos I y II-, excluye a los micronutrientes: NaMoO₄, CuSO₄ y CoCl₂, portadores de iones Cu²⁺ y Mo⁶⁺, esenciales para las células de plantas superiores (Dodds y Roberts, 1995) y de Co⁸⁺, reportado con efectos positivos en la inducción de callos de arroz (Pérez, 1997), por lo que es probable que la composición de microelementos no supla los requerimientos nutricionales necesarios para promover mayor división celular y por consiguiente un crecimiento del callo en mayor magnitud.

1.2- Estudio histológico.

Para una mejor comprensión de los eventos

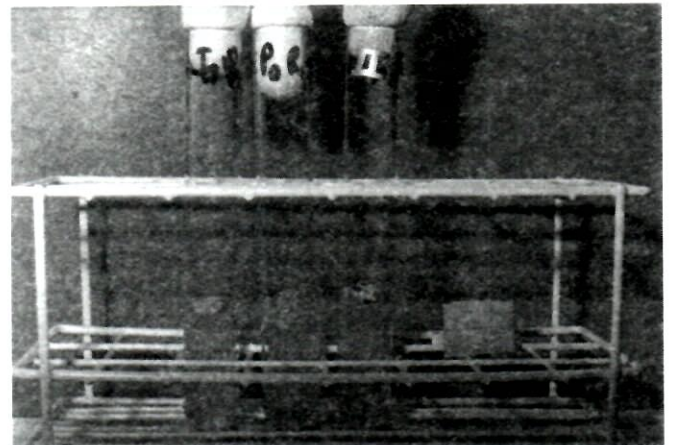


Fig. 3. Callos de las variedades J-104, Pokkali e IAC-23 subcultivados en medio II (Fase R₁) por espacio de 30 días.

morfogenéticos, también es importante conocer los cambios originados en la estructura interna del material vegetal a lo largo del proceso en cuestión. En tal sentido los cortes histológicos practicados, como complemento del experimento de inducción, posibilitaron caracterizar la composición tisular de los callos al cabo de 30 días de cultivo, en las mejores combinaciones de medio y establecer paralelos entre ésta y la descripción morfológica.

Las observaciones definieron una superioridad numérica en cuanto al promedio de centros meristemáticos a favor del medio I (7.44 - 10.00) con relación al II (3.75 - 6.38), sus dimensiones, evaluadas a través de las longitudes y amplitudes máximas fluctuaron entre 5.18 m - 8.02 m y 5.90 m - 8.81 m respectivamente, para las 3 variedades (Tabla II).

TABLA II

Valores medios y de error estándar para las variables N° y dimensiones de los centros meristemáticos (m).

		Variedades						
		J-104		Pokkali		IAC-23		
		x	E.S.	x	E.S.	x	E.S.	
V a r i a b l	N° de Centros Meristemáticos	I	8.78	0.97	7.44	0.67	10.00	0.40
		II	3.75	0.59	4.00	0.67	6.38	0.66
	Longitud Máxima (m)	I	5.31	0.41	7.66	0.49	6.58	0.31
		II	5.18	0.55	5.72	0.74	8.02	0.55
	Amplitud Máxima (m)	I	5.90	0.45	7.21	0.40	7.32	0.34
		II	6.40	0.58	5.92	0.74	8.81	0.60

De forma general se considera que los primordios de los órganos se originan a partir de pequeños grupos de células parenquimáticas que dan lugar a formaciones meristemáticas, las cuáles agrupadas en lo que se ha denominado meristemoides, constituyen los centros de posterior proliferación celular (Cornejo *et al.*, 1984), es por esta razón que prestamos especial atención a la evaluación de los centros meristemáticos formados.

La interacción entre las 3 variedades empleadas y los medios de inducción aplicados, no promovió diferencias significativas en el número de centros meristemáticos, de igual forma, tampoco la variedad determinó la cantidad de centros meristemáticos que se originaron, sino que correspondió al medio de cultivo la definición numérica de estas agrupaciones celulares, las cuáles se incrementaron favorecidas por la combinación de medio I que difirió significativamente de la II.

En arroz se ha descrito la aparición de brotes meristemáticos luego de la formación de cuerpos escutelares y estructuras verdes foliosas (Vasil y Vasil, 1982 a). Dicha formación de brotes meristemáticos asociada con el estadio escutelar se extiende a otras gramíneas como *Zea mays* Linn., *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. y *Triticum aestivum* Linn. (Vasil y Vasil, 1982a) y caracterizan a sus embrioides.

Por lo que la aparición de estos centros meristemáticos, formaciones que de seguro justifican la textura nodulosa y globular de la superficie externa de los callos, unido al resto de las características morfológicas descritas en el epígrafe anterior, pudieran evidenciar la existencia de zonas embriogénicas en el tejido de los callos obtenidos. Dichas zonas, estimuladas por la composición hormonal, podrían desencadenar el inicio de la organización de embrioides desde esta primera etapa de inducción del callo. Embrioides que a su vez, continuarían su desarrollo en los medios de regeneración ulteriores.

Tal como plantea Cornejo *et al.* (1984) los callos pueden desarrollar diferentes grados de organización si se varían

adecuadamente las condiciones del medio, principalmente en lo que se refiere a su contenido hormonal.

El medio de inducción I, como ya se ha comentado en otros epígrafes del presente documento, contiene como único suplemento fitohormonal a la auxina 2,4-D, declarada como esencial para la inducción y el temprano desarrollo de los embrioides hacia el estadio globular en *Pennisetum americanum* (Vasil y Vasil, 1982 a) y en *Zea mays* (Lu *et al.*, 1983), elementos que apoyan la superioridad numérica de centros meristemáticos encontrada en este medio I (Fig. 4).

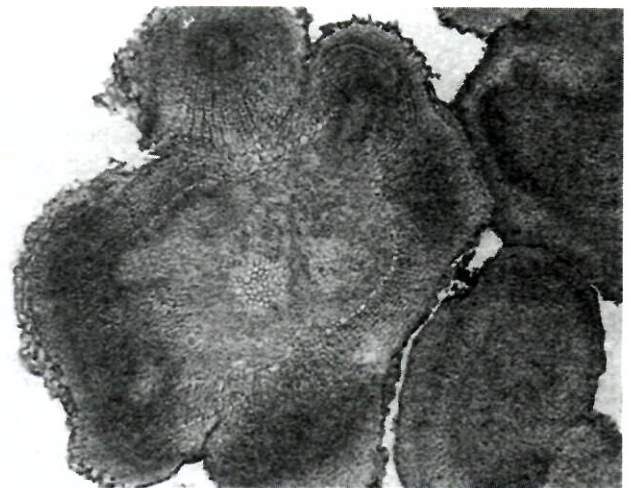


Fig. 4. Diferenciación de centros meristemáticos en callos de J-104 cultivados sobre medio de inducción I.

Resulta interesante que a pesar de no existir diferencias significativas con respecto al factor variedad, se presente una mayor respuesta de formación de centros meristemáticos en el tratamiento que conjuga a IAC-23 con el medio I, variedad que coincidentemente ofreció la mejor respuesta de inducción.

Con relación a las dimensiones de los centros meristemáticos, medidas a través de las variables: longitud y amplitud máximas, se distinguió una interacción altamente significativa entre las variedades y los medios

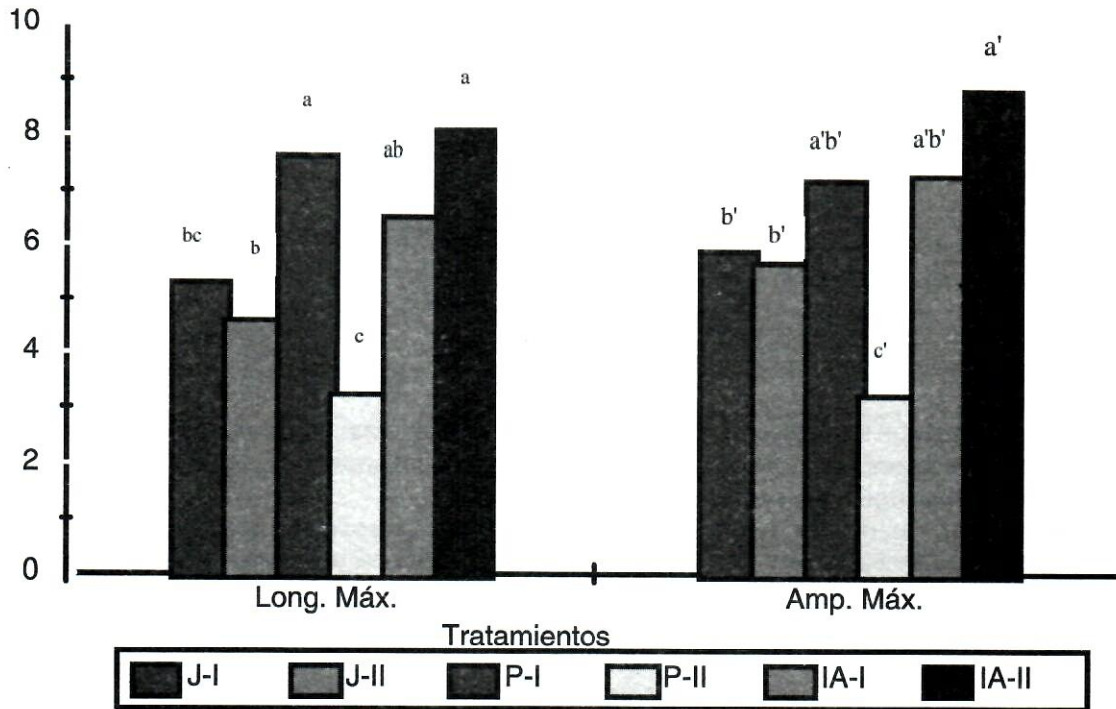


Fig. 5. Comparación de los valores de longitud y amplitud máximas de centros meristemáticos, entre los tratamientos aplicados.

J-I : J-104, medio I P-I : Pokkali, medio I IA-I : IAC-23, medio I
 J-II: J-104, medio II P-II : Pokkali, medio II IA-II : IAC-23, medio II
 $p < 0.05$

(Letras diferentes indican diferencias significativas entre tratamientos).

de cultivo. Para ambas variables, los tratamientos que combinaron a la variedad IAC-23 con los 2 medios y a la variedad Pokkali con el medio I promovieron los mejores resultados (Fig. 5), por lo que pudiera generalizarse que corresponden a la variedad IAC-23 los valores promisorios en cuanto a las dimensiones de los centros meristemáticos. El tratamiento conformado por la variedad Pokkali en medio II se manifestó como el menos recomendable para organizar centros meristemáticos de mayores proporciones.

En las observaciones realizadas, los elementos de tejido conductor estuvieron casi absolutamente representados por vasos de xilema, consecuentemente el número de traqueídas fue la cuarta variable evaluada a nivel de los cortes histológicos de los callos.

Las frecuencias de aparición de traqueídas atendiendo a los 5 niveles -relativos a la cantidad- establecidos, para los diferentes tratamientos en la muestra experimental evaluada (n) y la significación operada sobre el estadístico G (Tabla III) hacen posible inferir que, mayoritariamente, el número de traqueídas está asociado con el medio de cultivo del cual se trate.

El medio I condujo a la menor diferenciación de elementos

traqueales para las variedades J-104 y Pokkali, mientras que el medio II promovió condiciones favorables para la diferenciación de dichos vasos conductores (Fig. 6), a excepción también de la variedad IAC-23, donde el comportamiento fue totalmente contrario.

El máximo número de traqueídas fue alcanzado por la variedad J-104 al interactuar con el medio II y por la variedad IAC-23 con el medio I.

En la composición del medio de cultivo II, el balance fitohormonal se distingue de aquel del medio I, como recordaremos, se adiciona la citoquinina KIN en una relación 1:2 con respecto al 2,4-D. El hecho de obtener una mejor respuesta de diferenciación de elementos traqueales en el medio II concuerda con lo expuesto por Comejo *et al.* (1984) y por Dodds y Roberts (1995) acerca de la influencia positiva de las auxinas y citoquininas en el proceso de diferenciación de tejido vascular en los callos, estos últimos autores sugieren además la presencia de un carbohidrato como requerimiento adicional para la xilogénesis.

Dodds y Roberts (1995), de alguna forma, relacionan la diferenciación de nódulos vasculares, integrados por zonas discretas de xilema y floema separadas por cambium,

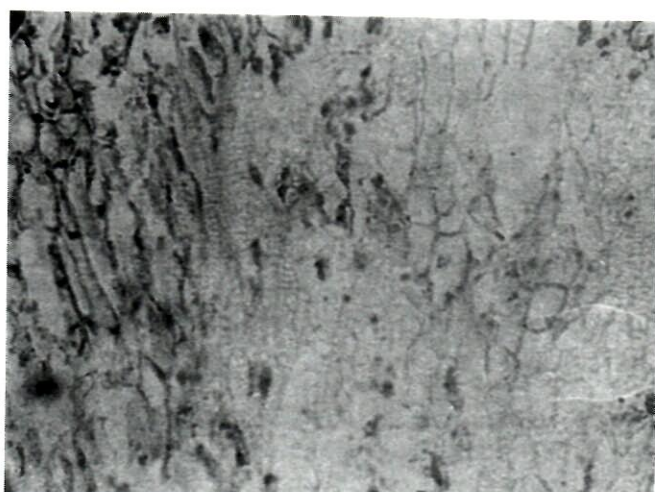


Fig. 6. Diferenciación de traqueídas en callos de IAC-23 cultivados sobre medio de inducción II.

con los meristemoides, aunque plantean que la diferenciación vascular también puede adoptar la forma de hileras de elementos traqueales, como se ajusta a nuestro caso.

Vasil y Vasil (1982 b) señalan que los embrioides de *Pennisetum americanum* poseen un sistema vascular cerrado e independiente. En nuestros cortes no fue posible observar la continuidad del tejido conductor con alguna de las otras formas celulares como se describe para embrioides de trigo (*Triticum aestivum*) en los que se halló al tejido vascular originado a partir de la epiblastula, en conexión con las estructuras foliosas del escutelo y el primordio radical (Ozias-Akins y Vasil, 1983).

A pesar de que tampoco se trata de algo comprobado por nosotros, no pudiéramos descartar el evento de transdiferenciación directa de células parenquimáticas a traqueales, explicado por Dodds y Roberts (1995).

Las habilidades de formación de traqueídas y vasos de xilema en arroz, también se relacionan con la actividad de la enzima fosfatasa ácida (Abe *et al.*, 1994).

La independencia entre el número de traqueídas y el medio de cultivo mostrada por la variedad IAC-23 y sus manifestaciones extremas y contrarias en comparación a las otras dos variedades para este carácter pudiera deberse a adaptaciones intrínsecas de esta variedad en particular. IAC-23 se caracteriza por ser tolerante a la sequía y a la salinidad por lo que es probable que un medio de cultivo menos favorable para la formación de vasos conductores, como es el I, se genere una respuesta inversa en el sentido de aumentar el transporte de agua para las estructuras embrioidales en formación.

El período de tiempo de 30 días, momento en el cual logramos detectar a través de cortes histológicos el origen incipiente de embrioides, se aproxima a las 3 semanas propuestas para la aparición de embriones bien desarrollados en *Zea mays* (Lu *et al.*, 1982) y a los 35-38 días definidos como propicios para la producción de embriones somáticos en *Coffea canephora* Froehn. var. *robusta* (García *et al.*, 1995).

Finalmente, corroboramos al igual que otros autores (Vasil y Vasil, 1982 a, b; Lu *et al.*, 1982; Ozias-Akins y Vasil, 1983; García *et al.*, 1995) que la neoformación de embrioides queda establecida desde las fases de iniciación del callo.

BIBLIOGRAFÍA

- Abe T, Oka Y y Sasahara T. 1994. Varietal variations in biochemical changes during growth and redifferentiation of rice callus cultures. *Jpn. J. Genet.* 69: 385-396.
- Ahmad I B, Norhana H y Normah N. 1994. Callus formation from embryos in some indica rice varieties. Third Symposium of applied Biology, May 28-29: 95-97.
- Ayres NM, McClung AM, Walker GA y Park WD. 1995. Effect of regeneration media on shoot production from anther cultures of rice. *Intern. Rice Res. Notes* 20 (1): 8-9.
- Borrajero I, Chacón E, Cubero O, Piera OM, de Armas MC, Cerra M, Pérez V, Valdés Z, Sariol H, García R, Ponce

TABLA III

Frecuencias de aparición de traqueídas para cada tratamiento y estadístico G para cada variedad.

		Nº de traqueídas (Niveles)						EstadísticoG
		Medio (n)	1 (0)	2 (1-10)	3 (11-20)	4 (21-30)	5 (> 30)	
V a r.	J-104	I (9)	6	0	1	0	2	10.836 *
		II (9)	1	2	1	5		
	Pok	I (9)	8	1	0	0		10.623 *
		II (10)	3	1	1	3	2	
IAC-23	I (10)	4	0	0	0	6	4.568 n.s.	
	II (8)	7	0	0	0	1		

- MC. 1982 a. Texto para la formación de técnicos de Citohistopatología. Tomo I. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Docencia Médica Media: 271 pp.
- Borrajero I, Chacón E, Cubero O, Piera OM, de Armas MC, Cerra M, Pérez V, Valdés Z, Sariol H, García R y Ponce MC. 1982 b. Texto para la formación de técnicos de Citohistopatología. Tomo II. Ministerio de Salud Pública. Dirección Nacional de Docencia Médica Media: 413 pp.
- Cornejo MC y Primo E. Técnicas histológicas. En: Cornejo MC, Primo E. Organogénesis en cultivo diploides y haploides de arroz. INIA, Madrid. 1984: 47-49.
- Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin KC and Bi FY. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Sci. Sin.* 16: 659-688.
- Dodds JH y Roberts LW. Experimental: callus and callus-derived systems. En: Dodds JH, Roberts LW. Experiments in plant tissue culture. Third edition. Cambridge University Press. 1995: 67-81.
- García ME, Bravo J y Montes S. 1995. Estudio histológico de la embriogénesis somática en *Coffea canephora* var *robusta*. I. Calogénesis. *Cultivos Tropicales* 16 (2): 35-39.
- Jain SM y Ishii K. 1997. Recent advances in somatic embryogenesis in forest. Proceeding IFS Workshop on Recent Advances in Biotechnology for tree conservation and management, September 15-19, Florianópolis, Brasil: 214-231.
- López MG. 1996. Estudio de la expresión génica durante la embriogénesis somática en *Saccharum officinarum* y su relación con el ácido abscísico y la sequía. Tesis Doctoral Univ. Complutense de Madrid. Fac. Ciencias Biológicas. Dpto. Genética: 126 pp.
- Lu C, Vasil IK y Ozias-Akins P. 1982. Somatic embryogenesis in *Zea mays* L. *Theor. Appl. Genet.* 62: 109-112.
- Meijer EGM, van Iren F, Schrijnemakers E, Hensgens LAM, van Zijderveld M y Schilperoort RA. 1991. Retention of the capacity to produce plants from protoplasts in cryopreserved cell lines of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell Reports* 10: 171-174.
- Mitsuoka K, Honda H, Xing XH y Unno H. 1994. Effect of intracellular 2,4 D concentration on plantlet regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) callus. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42: 364-366.
- Murashige T y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Nabors MW, Heyser JW, Dykes TA y Demott KJ. 1983. *Planta* 157: 385.
- Ozias-Akins P and Vasil I K. 1983. Proliferation of and plant regeneration from the epiblast of *Triticum aestivum* (wheat; *Gramineae*) embryos. *American Journal of Botany* 70 (7): 1092-1097.
- Peña E y Saralegui H. 1982. Técnicas de Anatomía Vegetal. Editorial Pueblo y Educación: 100 pp.
- Pérez AV. 1997. Obtención de plántulas de arroz (*Oryza sativa* L.) mediante el cultivo de anteras. Tesis de Maestría: 75 pp.
- Rance IM, Wenzhong T, Mathews H, Kochko A, Beachy RN y Fauquet C. 1994. Partial desiccation of mature embryo-derived calli, a simple treatment that dramatically enhances the regeneration ability of indica rice. *Plant Cell Report* 13 (11): 647-651.
- Ravi DS y Minocha JL. 1993. Efficiency of different explants and media for callus induction and plant regeneration in Basmati rice. *Crop Improv.* 20 (2): 139-142.
- Ravi HB y Minocha JL. 1992. Effect of media and age on peroxidase isozyme pattern in calli of rice (*Oryza sativa*). *Crop. Improv.* 19 (2): 88-91.
- Ravi HB y Minocha JL. 1993. Genotypic response for callusing and regeneration in indica rice (*Oryza sativa* L.). *Jour. Pl. Sci. Res.* 9: 19-20.
- Ravi JK, Gosal SS and Minocha JL. 1993. Seed and anther culture in indica rice (*Oryza sativa* L.). *Short Cumm. Symp. Heterosis Breeding in crop Plants - Theory and Application.* Verma MM, Virk DS, Chahal GS (Eds.).
- Reddy VS, Leelavathi S and Sen SK. 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. *Physiol. Plant* 63: 309-314.
- Rueb S, Leneman M, Schilperoort RA and Hensgens LAM. 1994. Efficient plant regeneration through somatic embryogenesis from callus induced on mature rice embryos (*Oryza sativa* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 36: 259-264.
- Sathish P, Gamborg OL and Nabors MW. 1995. Rice anther culture: callus initiation and androclonal variation

in progenies of regenerated plants. *Plant Cell Report* 14 (7): 432-436.

Sigarroa A. 1987. *Manual de prácticas de Biometría y Diseño Experimental*. La Habana, Ed. Pueblo y Educación: 154 pp.

Siriwardana S and Nabors MW. 1983. Tryptophan enhancement of somatic embryogenesis in rice. *Plant Physiology* 73 (1): 142-146.

Vasil IK and Vasil V. 1993. Embryogenic callus, cell suspension and protoplast cultures of cereals. En: Lindsey K. *Plant tissue culture. Manual. Supplement 3*. Kluwer Publishers: 1-16.

Vasil V and Vasil IK. 1982 a. Characterization of an embryogenic cell suspension culture derived from cultured inflorescences of *Pennisetum americanum* (Pearl millet, *Gramineae*). *American Journal of Botany* 69 (9): 1441-1449.

Vasil V and Vasil IK. 1982 b. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) Schum. I. In cultured immature embryos. *Botanical Gazette* 143 (4): 454-465.

Wenzhong T, Rance I, Sivamani E, Fauquet C and Beachy RN. 1994. Improvement of plant regeneration frequency in vitro in indica rice. *Chinese Journal of Genetics* 21 (2): 105-112.

Zhu Y, Ouyang W, Li Y and Chen Z. 1996. The effects 2-ip and 2,4-D on rice calli differentiation. *Plant Growth Regulation* 19: 19-24.

Recibido: 20 de abril del 2000.

Direcc. de los autores: *Instituto de Ecología y Sistemática (IES), Carretera de Varona Km 3 1/2, Capdevila, Boyeros, Ciudad de La Habana, Cuba. **Facultad de Biología, Universidad de la Habana. Calle 25 # 455 e/ J e I Vedado. Plaza 10400. Ciudad de la Habana, Cuba.