



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

TRABAJO FINAL DE GRADUACIÓN

MODALIDAD: PASANTÍA

Cultivo *in vitro* de tejidos en Arroz (*Oryza sativa* L.)

PASANTE: Sandoval, Silvana Raquel

DIRECTOR: Ing. Agr. Marassi María Antonia

EVALUADORES: Ing. Agr. (Dra.) Claudia V. LUNA

Lic. (Dra.) Elsa C. LATTAR

Lic. (Dra.) Patricia E. NOVO

AÑO: 2019

Cultivo *in vitro* de tejidos en Arroz (*Oryza sativa* L.)

PASANTE: Sandoval, Silvana Raquel.

Lugar de realización

Este trabajo se llevó a cabo en cátedra de Fisiología vegetal (IBONE- UNNE- CONICET) perteneciente al campus sargento Cabral; de la Facultad de Ciencias Agrarias (FCA -UNNE).

Tiempo de realización: el tiempo demandado desde la etapa de revisión bibliográfica hasta el análisis de datos en laboratorio fue desde febrero a agosto 2018.

Objetivo general

Adquirir conocimiento en técnicas de cultivo *in vitro* asociadas al mejoramiento de arroz.

Objetivos específicos

- Realizar cultivo *in vitro* de anteras en arroz.
- Adquirir conocimientos sobre el cultivo *in vitro* de cariopses y embriones aislados de arroz.
- Ampliar y aplicar conocimientos adquiridos en el transcurso de la carrera.

Descripción de las tareas desarrolladas

Cultivo *in vitro*

La técnica de cultivo *in vitro* consistió en la preparación, tanto de medios de cultivos, como la desinfección de explantes (anteras, embriones o cariopses) a utilizar según el caso y la preparación de la cámara de cultivo (cabina de flujo laminar); para la posterior siembra en condiciones asépticas, de los explantes seleccionados.

Preparación de los medios de Cultivo

La preparación los medios dependió del material a cultivar, pero en forma general consistió en la realización de los cálculos correspondientes para cada medio de cultivo, la medición y pesado de los mismos, la realización de la mezcla; seguida de la medición del pH. Terminada la medición el agregado de agar, seguida de la cocción y finalmente el dispensado del mismo en frascos. El proceso se describe seguidamente para cada cultivo.

Componentes del medio de cultivo basal utilizado (N6) Chu et al 1975; 511 y (MS) Murashige y Skoog, 1962

- Sales minerales (macro y micronutrientes)
- Vitaminas
- Hidrato de carbono: sacarosa
- Agua

Se pesaron los diferentes componentes y se disolvieron en forma individual llevándose posteriormente a volumen con agua destilada. Las cantidades pesadas correspondían a una concentración 10 veces mayor que la del medio de cultivo a utilizar.

Preparación de los reguladores de crecimiento

Se pesaron los reguladores y se llevaron a volumen con agua bidestilada.

Cálculos a realizar para la preparación del medio de cultivo

Medio basal x 10

Se diluye en 10 veces la concentración del medio.

Por ejemplo para 500 ml de medio N6 se tomaron 50 ml del medio basal concentrado.

Calculo para el agregado de las hormonas

Todos los stocks están a 100 ppm (mg/L)

Cálculos

$$VI \times CI = VF \times CF$$

VI= Volumen Inicial

CI= Concentración Inicial

VF= Volumen Final

CF= concentración final

Por ejemplo: el cálculo realizado para ANA 1,4 mg/l para 500 ml fue el siguiente

$$VI \times 100 \text{ mg/l} = 500 \text{ ml} \times 1,4 \text{ mg/l}$$

$$VI = 500 \text{ ml} \times 1,4 \text{ mg/l} / 100 \text{ mg/l}$$

$$VI = 7 \text{ ml}$$

Una vez colocado el medio basal y los reguladores de crecimiento se lleva a volumen con agua destilada

Corrección del pH

Los medios basales deben tener, en general un pH de 5,8. Se realizó utilizando un peachimetro, se midió y se corrigió mediante el empleo de soluciones correctores (descriptas seguidamente). En este laboratorio K(OH) y HCl a diferentes normalidades

Soluciones correctoras de pH

Ácido Clorhídrico: 0,5N; 0,1 N y 0,01 N

Hidróxido de Potasio: 0,5N; 0,1 N y 0,01 N

Se colocó el medio en el Peachimetro, se midió, se sacó el electrodo del medio, se agregó el corrector adecuado, se agitó y se volvió a medir. Esto se repitió hasta que se alcanzó el pH buscado.

Se trabajó con medios semisólidos, posteriormente se agregó el agente gelificante.

Solidificación del medio: Agar, 0,75% para 1 litro del medio de cultivo se pesaron 7,5 g.

Una vez corregido el pH y agregado el agar se lo llevó a cocción en microondas hasta que se disolvió bien el agar.

Una vez cocido el medio se distribuyó en los recipientes. (Fig 1, c) (Anexo)

Se taparon los recipientes con aluminio y se llevaron a esterilizar. En este laboratorio la esterilización fue en autoclave.

Esterilización del medio (en autoclave)

Primero se constata que el reservorio de agua del autoclave este lleno, si no se agrega agua hasta el nivel indicado, luego se cargan los medios de cultivo. Se cierra la tapa superior cuidando de cerrar las charnelas de forme cruzada para asegurar un buen apoyo de la tapa, se prende fuego en el mechero de la parte inferior y dejando abierta la válvula de salida de vapor se deja prendido hasta que por esta solo sale vapor de agua. Cuando esto ocurre se cierra la válvula y se aguarda a que llegue a 1 atm de presión. Cuando alcanza una atm de presión se baja la llama del mechero de forma que la presión permanezca en 1 atm por veinte minutos (20') y luego se apaga. Se abrirá solo después que la presión lleve a 0,5 atm

Esterilización del ambiente de trabajo (cámara de Flujo laminar) e instrumental

La cámara de Flujo laminar se prende unos 10 minutos antes del inicio del trabajo y se la deja funcionar vacía (para eliminar el aire contraminado del habitáculo), luego de este tiempo se pulverizan todas sus paredes con alcohol 70%. Y se introducen los medios esterilizados que también se pulverizaran con alcohol 70%. Los materiales de cultivos (pinzas, bisturíes) y recipiente para apoyar el material vegetal se colocan con alcohol 96% y se deja todo dentro de la cámara por otros diez minutos.

Antes del inicio del cultivo se flamearan (pasaran por fuego) tanto los recipientes de soporte como el instrumental.

Esterilización del material vegetal

Se explica para los diferentes explantes utilizados

Cultivo *in vitro* de anteras

Material vegetal: *Oryza sativa* L. Variedad IRGA 424.

Se utilizaron inflorescencias del tipo panoja que se encontraban aun dentro de la vaina de la hoja bandera, con una distancia entre el collar de la hoja bandera y el collar de la inmediata inferior de entre 6 y 8 cm.

Medios utilizados

N6+ ANA 2 mg/l + KIN 0,5 mg/L + agar 0,75%

511+ ANA 2 mg/L KIN 0,5 mg/L + agar 0.75%

Metodología del Cultivo de anteras:

Desinfección del material vegetal: Las panojas envueltas en su vaina fueron sumergidas en alcohol al 70% por dos minutos; luego eliminado el alcohol. Seguidamente se colocaron en lavandina al 25% durante 20 minutos, luego se enjuagaba con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar ya desinfectada. (Fig 2 **a**) (Anexo)

La preparación del flujo laminar se realiza de la misma manera ya descripta.

Se cultivaron 45 anteras por recipiente conteniendo 25 ml del medio de cultivo, en un total de 50 frascos. (Fig 2 **b** material a cultivar, **c** cultivo de anteras) y luego de cultivados se rotularon los frascos (Fig 2 **d**) y se llevaron a las condiciones de incubación (Anexo)

Condiciones de incubación

1. Se llevaron los frascos a oscuridad a una temperatura de 27 ± 2 °C hasta observarse alguna respuesta.
2. Una vez que se observaron respuestas se llevaron a la cámara con luz 27 ± 2 °C 16 horas de fotoperiodo 160 W/m² s

Toma de Datos:

La toma de datos se realizó a partir de los 30 días y luego semanalmente, utilizando una lupa estereoscópica para ello. (Fig 3 **a, b, c, d**) Anexo Los valores fueron volcados en las tablas 1 y 2: (Anexo)

Evaluación de los datos

La evaluación se realizó respecto al porcentaje infectados, de callos producidos y plantas obtenidas. (Fig 8: **a** anteras con respuesta, **b** observación de callos y **c** recuento de vástagos) en Anexo.

Cultivo *in vitro* de cariopses

Medio utilizado:

N6 + BAP 3mg/L + ANA 1 mg/L + agar 0,75%

El cultivo de cariopses se realizó una vez terminado el tiempo en que se disponía de anteras para iniciar el cultivo. La metodología para la preparación de medios de cultivo fue la misma que para cultivo de anteras. Los medios contenían diferentes concentraciones de auxinas y citosinas que para anteras.

Material vegetal: se utilizaron cariopses descascarados manualmente para evitar lastimar el embrión.

Desinfección del material vegetal: alcohol al 70% por dos minutos; luego elimina. Seguidamente se colocó lavandina al 45% durante 30 minutos, luego se enjuagaba con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar ya desinfectada.

Se cultivaron 5 cariopses por recipiente conteniendo 25 ml del medio de cultivo. (Fig 4 **a** inicio del cultivo de cámara de flujo laminar, **b** materia desinfectado a cultivar, **c** cultivo de los cariopses, **d** fin del cultivo)

Condiciones de incubación

Se llevaron los frascos a la cámara con luz 27 ± 2 °C 16 horas de fotoperiodo 160 W/m² s.

Cuando se obtuvieron plantas y estas alcanzaron un tamaño hasta el borde del frasco se las repico a frascos más grandes para que continuaran su crecimiento y luego de un tiempo se las saco se las aclimato para sacarlas a tierra (Fig 5 **a** vástagos de cariopses, **b** tamaño para pasaje a frasco mayor, **c** preparación de la cámara de cultivo para el traspaso, **d** traspaso a frasco mayor, **e** plantas traspasadas, **f** aspecto después de una semana aproximadamente)

Toma de Datos

La toma de datos se realizó de manera semanal, Los datos obtenidos se volcaron en la tabla N° 3 (Anexo)

La evaluación se realizó respecto al número de cariopses infectados, germinados, el número de vástagos obtenidos. (Fig 8: **d** recuento de vástagos, **e** múltiples vastagosa partir de cariopses) En ANEXO.

Cultivo de embriones:

Medio utilizado:

N6 + BAP 3mg/L + ANA 1 mg/L + agar 0,75%

Material vegetal utilizado: se extrajeron embriones a partir de cariopses descascarados manualmente. Para ello se desinfectaron por 40 minutos en agua lavandina al 40 % y en cámara de flujo laminar se separaron del endosperma bajo lupa y usando bisturí.

Desinfección del material vegetal: alcohol al 70% por dos minutos; luego elimina. Seguidamente se colocó lavandina al 40% durante 40 minutos, luego se enjuagaba con agua estéril dentro de la cámara de flujo laminar ya desinfectada.

La preparación del flujo laminar se realiza de la misma manera ya descripta; sumado a la desinfección de la lupa con alcohol al 70%.

Se cultivaron 5 embriones por cada recipiente de 60 ml de volumen, conteniendo 25 ml del medio de cultivo. (Fig 6: **a** preparación del flujo laminar con la lupa **b** separación bajo lupa del embrión del endosperma, **c** vista del cariopse para sacar el embrión **d** una vez separado se cultiva) Anexo

Luego de observarse múltiples vástagos (Fig 7 **a**) igual que para cariopses cuando llegan al tamaño adecuado (Fig 7 **b**) se trasplantan a frascos mas grandes (Fig 7 **c**) y cuando llegan ahí al tamaño adecuado (Fig 7 **d**) se sacan se lavan bien las raíces (Fig 7 **e**) y se las lleva a aclimatación en agua (Fig 7 **f**) por alrededor de una semana. Anexo

Condiciones de incubación

Se llevaron los frascos a la cámara con luz 27 ± 2 °C 16 horas de fotoperiodo 160 W/m² s

Toma de Datos

La toma de datos se realizó de manera semanal. Los valores fueron expresados en las siguientes tablas (ANEXO):

La evaluación se realizó

La evaluación se realizó respecto al número de embriones infectados, germinados, el número de vástagos obtenidos. (Fig 8: **f** múltiples vástagos a partir de embriones) en ANEXO

Consideraciones finales

Como experiencia del trabajo realizado aprendí sobre el manejo del laboratorio, la integración de conceptos adquiridos en la carrera, como evaluar una experiencia. Además de cómo resolver problemas propios de la técnica como del lugar de trabajo o de programación.

Por otro lado pude observar la importancia de los problemas de contaminación y la pérdida de material por esta causa en diferentes momentos de la técnica.

Bibliografía consultada

- Olmos, S.; G. Luciani y E. Galdeano. 2010. Micropropagacion En Biotecnología y mejoramiento vegetal II. (eds. Levitus,G.; V. Echenique; C. Rubinstein; E. Hopp and L. Mroginski) INTA: 353 - 362
- Pérez Bernal, M.; Y. Coll García; A. González Quintero; C. Hernández Díaz; R. Armas Ramos y M. Pujol Ferrer. (2007) Propagación *in vitro* de la variedad cubana de arroz Jucarito-104 Biotecnología Vegetal 7(2): 89-93
- Polci, P.; V. Conti; R. Miranda y N, Gea. 2010. Obtención de plantas doble-haploides En Biotecnología y mejoramiento vegetal II. (eds. Levitus,G.; V. Echenique; C. Rubinstein; E. Hopp and L. Mroginski) INTA: 297 – 310
- Roca, W.M.; V.M. Nuñez y K. Mornam. (1991) Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas en Cultivos de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones (Roca W y L. A. Mroginski eds.) CIAT : 271 - 293
- Villalobos, A y T.A Thorpe. (1991) Micropropagacion: Conceptos metodologías y resultados En Cultivos de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones (Roca W y L. A. Mroginski eds.) CIAT 127 – 141

Zapata, F.M.; L. B. Torrizo; R.O. Romero y S. T, Mercy. (1991) Cultivo de anteras de arroz. En Cultivos de tejidos en la Agricultura Fundamentos y Aplicaciones (Roca W y L. A. Mroginski eds.) CIAT: 533 – 542, Murashige T.; Skoog F.1962

Opinión del asesor

La pasante desarrollo las tareas cumpliendo no solo con las actividades que se le iban otorgando, cumpliendo también con los horarios pactados para la realización de las mismas.

Mostro interés en la comprensión del por qué y la forma de realización de las tareas.

Mostro haber leído la bibliografía sugerida para una mayor comprensión del porque la utilización de los diferentes materiales en el cultivo *in vitro* y los conceptos generales de la técnica en sí.

Tuvo una buena interacción con el resto de las personas trabajando en el laboratorio.

Fig 1: Preparación de medios de cultivos a) detalles del laboratorio, b) soluciones utilizadas, c) ejemplo de dispensación manual de medio de cultivo.



Fig 2 Cultivo de anteras fig2 cultivo de anteras en el flujo laminar a) tallos de arroz en alcohol al 25%; b) Selección y separación de las inflorescencias, c) Detalle del cultivo de antera. d) Incubación de anteras en condiciones estándares.

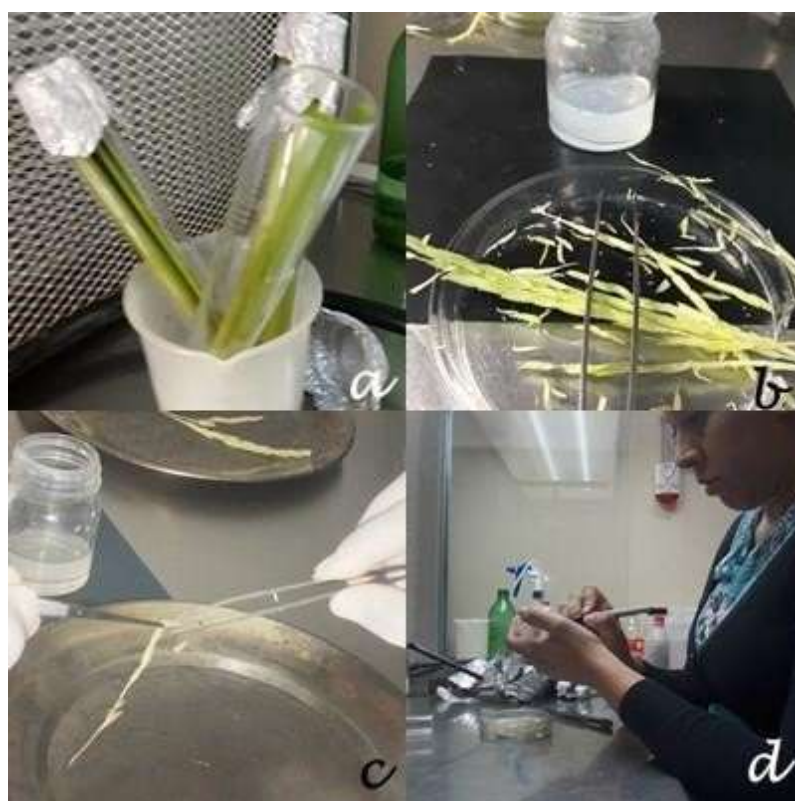


Fig 3: Toma de datos anteras a) Detalles de frascos, b) Conteo de callos con lupa, c) Imagen detalle de la observación en la lupa, d) Imagen de la lupa más carpeta de campo.



Fig 4: Cultivo cariopses a) Inicio del cultivo de cámara de flujo laminar, b) Cariopses descascarado a cultivar, c) Detalle del cultivo de cariopses, d) Finalización de la etapa de cultivo mediante enfoque experimental.



Fig 5: Cultivo de cariopses repique a frascos de mayor tamaño a) Vástagos de cariopses; b) Tamaño adecuado para el pasaje a un frasco de mayor volumen, c) Detalle de la diferencia de volumen entre frascos, d) Detalle de un vástago y limpieza de raíces, e) Plantas traspasadas, f) Detalles de las plantas luego de una semana aproximadamente.

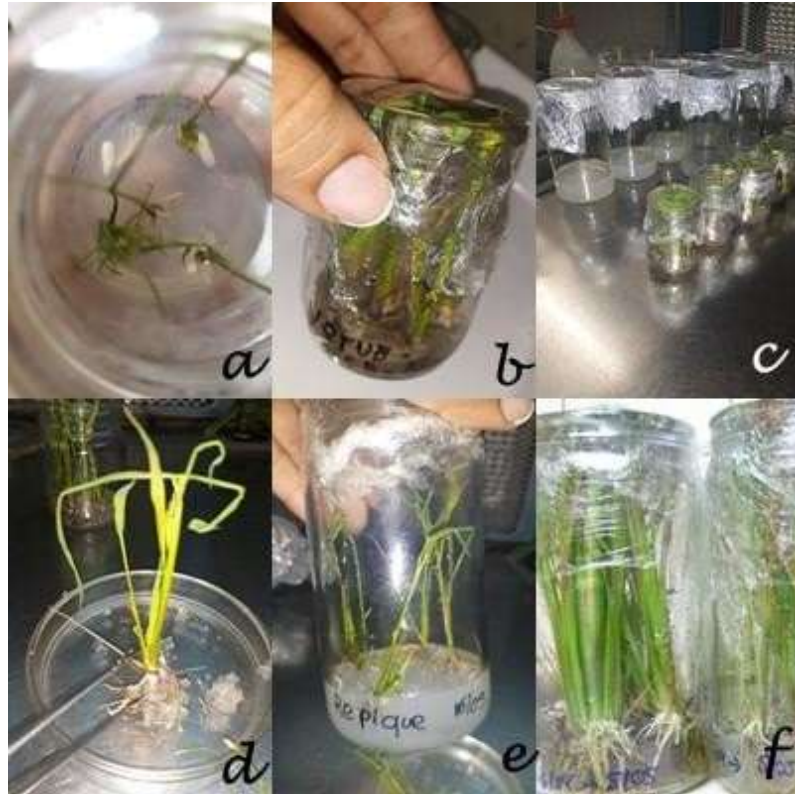


Fig 6: Cultivo de embriones a) Imagen del cultivo de embriones con lupa dentro del flujo laminar, b) Detalle de grano de arroz en lupa, c) Separación del embrión del endosperma, d) Detalle de la lupa y frascos dentro del flujo laminar.

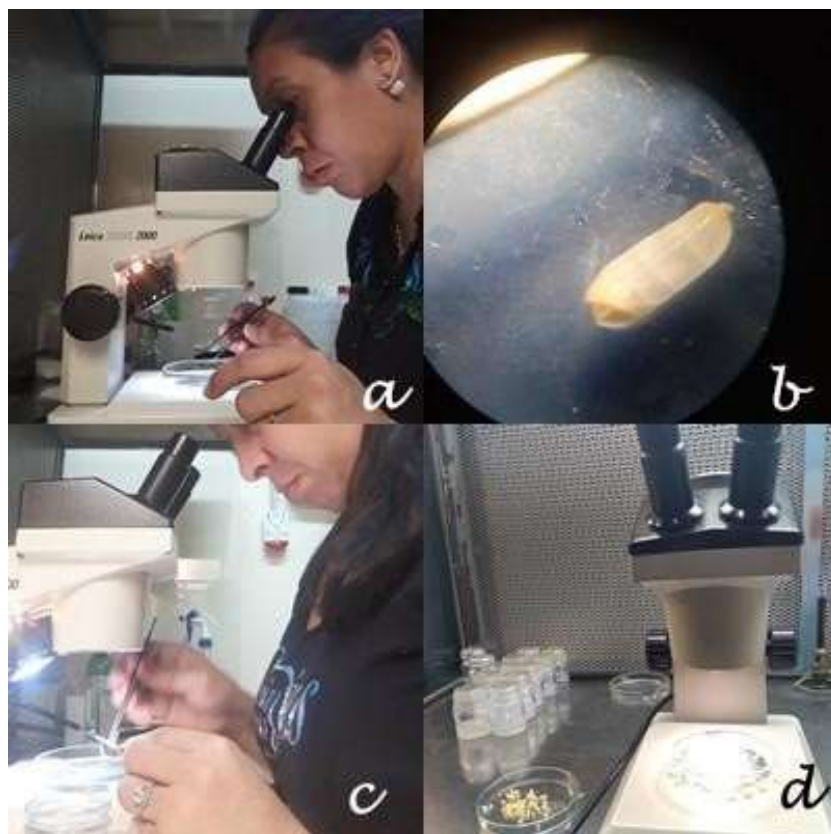


Fig 7: Repique de plantas a partir de embriones y aclimatación. a) Detalle del frasco con embriones germinados, b) Plántulas con altura adecuada para el repique, c) Imagen del flujo laminar con frascos preparados para el repique, d) Detalle de un frasco repicado, e) limpieza de raíces para llevar a aclimatación en agua, f) Plantas en aclimatación de una semana.

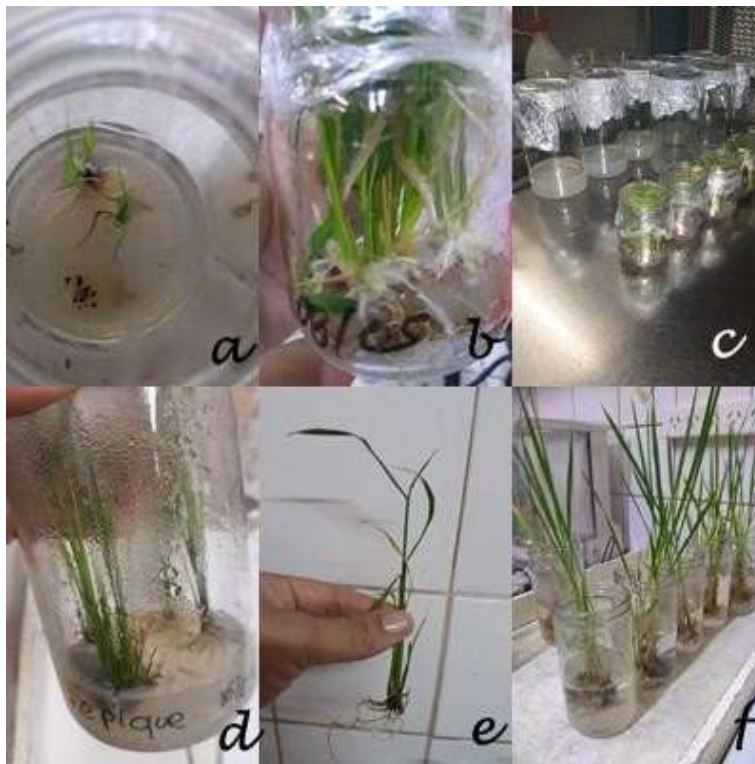


Fig 8: Observaciones durante las tomas de datos a) Detalle de frasco de anteras de unas semanas. b) producción de cayos a partir de anteras, c) producción de plántulas a partir de embriones, d) Producción de plántulas a partir de cariopses, e) y f) Detalles de platulas.

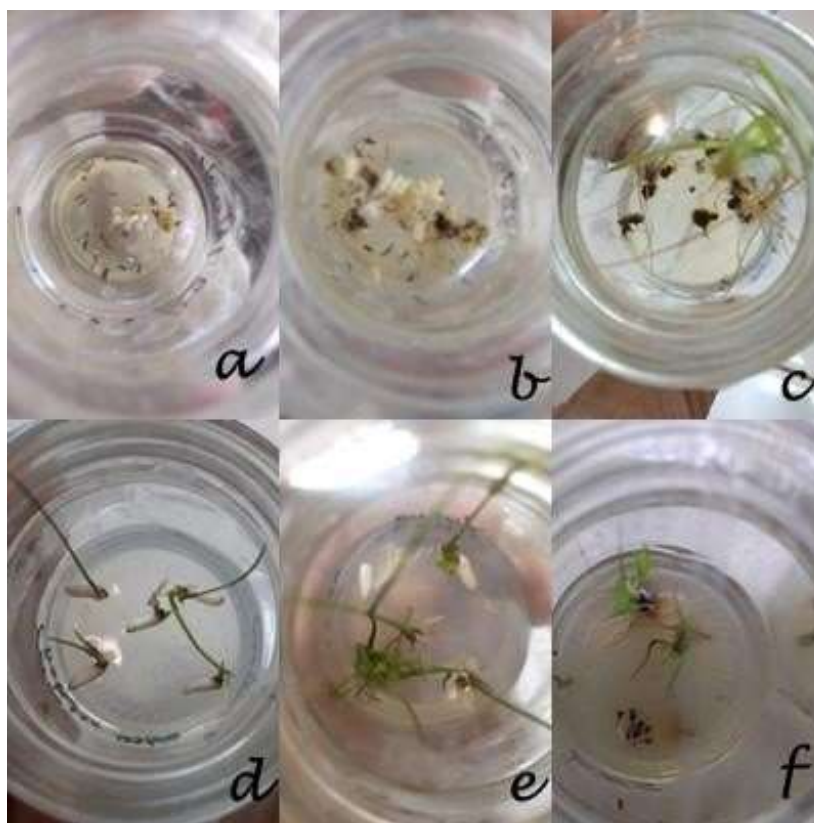


Fig 9: Problemas encontrados: a) contaminación con bacterias al inicio del cultivo de anteras, b) vástagos albinos derivados del cultivo de anteras y problemas no propios de la técnica, como por ejemplo la ruptura del flujo laminar lo que llevo a que no se pudieran repicar plantas y murieran, c) contaminación con hongos en la etapa avanzada de germinación en el cultivo de cariopses o los problemas de una mala elección de reguladores que llevo a la obtención de vástagos albinos, d) vástago muerto por falta de repique o una no buena organización del tiempo para evitar la pérdida de material por deshidratación al momento de aclimatar, e) plantas muertas por falta de agua durante la aclimatación.



Tabla N°1: Datos observados de las anteras de la variedad IRGA 424 en el medio basal N6+ ANA 2 mg/l ´KIN 0,5 mg/L + agar 0,75%

Fecha de la toma de datos	N° de Anteras	N° de infectados	% de infectados	N° de callos	% de callos	N° de vástagos	% de vástagos	Observaciones
Cultivas	2250							
06/04/18	2250	45	2	1	0,04	0	0	
13/04/18	2205	405	18,36	2	0,09	0	0	
08/05/18	1800	45	2,50	4	0,22	0	0	
16/05/18	1755	0	0	33	1,88	33	1,88	Repique al mismo medio, frascos más grandes
06/06/18	1755	0	0	51	2,90	51	2,90	Repicados aumentaron su volumen.
27/06/18	1755	860	49	12	0,68	12	1,53	Después del arreglo del Flujo laminar
04/07/18	895	0	0	15	1,65	15	1,65	
11/07/18	895	325	36,31	15	1,65	15	1,65	

Tabla N°2: Datos observados en las anteras de la variedad IRGA 424 en el medio basal 511+ ANA 2 mg/L KIN 0,5 mg/L + agar 0.75%

Fecha de la toma de datos	N° de anteras	N° de infectados	% de infectados	N° de callos	% de callos	N° de vástagos	% de vástagos	Observaciones
Cultivadas	2350							
06/04/18	2350	45	1,91	0	0	0	0	
13/04/18	2305	360	15,61	0	0	0	0	
08/05/18	1945	90	4,62	13	0,66	0	0	
16/05/18	1855	0	0	44	2,37	44	2,37	REPIQUE al mismo medio, frascos de mayor volumen
06/06/18	1855	0	0	65	3,50	65	3,50	Los repicados aumentaron su volumen
27/06/18	1855	946	51	17	0,91	17	0,91	Después del arreglo del Flujo Laminar. Repique al mismo medio.
04/07/18	910	0	0	30	3,29	30	3,29	
11/07/18	910	15	1,64	30	3,29	30	3,29	Se descartaron infectados por bacterias

Tabla N°3: Datos observados en los cariopses de la variedad IRGA 424 en un medio de N6 + BAP 3mg/L + ANA 1 mg/L + agar 0,75%.

FECHA TOMA DE DATOS	N° de cariops es	Nº DE INFECTAD OS	% DE INFECTAD OS	Nº DE GERMINA DOS	% DE GERMINA DOS	Nº DE VASTAG OS	OBSERVACIO NES
Cultivad os	100						
06/04/1 8	100	11	11	73	73	81	1 inf semilla 5 inf por Bacterias 5 inf por Hongos
13/04/1 8	89	15	16,85	89	100	95	11 inf por bacterias 5 inf por Hongos
08/05/1 8	74	0	0	74	100	180	
16/05/1 8	74	29	39,18	74	100	95	Repique
30/05/1 8	45	0	0	45	100	132	
06/06/1 8	45	0	0	45	100	132	Pasaron a Agua

Tabla N° 4: Datos del cultivo de embriones para la variedad Yerua en un medio de cultivo N6 + BAP 3mg/L + ANA 1 mg/L + agar 0,75%

FECHA DE TOMA DE DATOS	EMBRIOS	Nº DE INFECTADOS	% DE INFECTADOS	Nº DE GERMINADOS	% DE GERMINADOS	Nº DE VASTAGOS	OBSERVACIONES
Cultivos	50						
08/05/18	50	3	6	19	38	0	
15/05/18	47	15	31,91	27	57,44	30	
30/05/18	32	0	0	29	90,62	37	Repique al mismo medio a frascos de mayor tamaño
06/06/18	32	0	0	29	90,62	39	
27/06/18	32	7	21,87	29	90,62	33	Pasaron a agua (25)
04/07/18							Pasaje a tierra 15