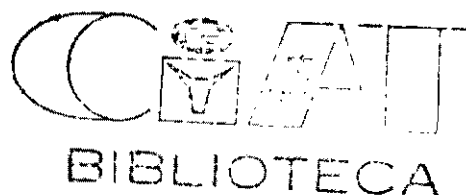


SB
191
.R5
L467
C.3



Centro Internacional
de Agricultura Tropical

~~Mejoramiento del Arroz con~~
Cultivo de Anteras
Aplicaciones en el desarrollo de
Germoplasma Adaptado a Ecosistemas
Latinoamericanos y el Caribe



14778
9 MAR. 1994

Documento de trabajo para el curso taller
Financiado por la Fundación Rockefeller
Febrero 14 - 25 de 1994

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) se dedica al alivio del hambre y de la pobreza en los países tropicales en desarrollo, mediante la aplicación de la ciencia al aumento de la producción agrícola, conservando, a la vez, los recursos naturales.

El CIAT es uno de los 18 centros internacionales de investigación agrícola auspiciados por el Grupo Consultivo para la Investigación Agrícola Internacional (GCIAI).

El presupuesto básico del CIAT es financiado por 19 donantes, entre los que figuran gobiernos de países, organizaciones para el desarrollo regional e institucional, y fundaciones privadas. En 1993, los siguientes países son donantes del CIAT: Alemania, Australia, Bélgica, Canadá, China, España, Estados Unidos de América, Francia, Holanda, Italia, Japón, Noruega, el Reino Unido, Suecia y Suiza. Las entidades donantes incluyen el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), el Banco Mundial, la Comunidad Económica Europea (CEE), y la Fundación Ford.

La información y las conclusiones contenidas en esta publicación no reflejan necesariamente los puntos de vista de los donantes.

**Mejoramiento del Arroz con
Cultivo de Anteras**
Aplicaciones en el desarrollo de
Germoplasma Adaptado a Ecosistemas
Latinoamericanos y el Caribe

Contenido científico:

Zaida Lentini, Ph.D.
Patricia Reyes, Ing. Agr.
César P. Martínez, Ph.D.
Víctor Manuel Núñez, Ing. Agr.
William M. Roca, Ph.D.

Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)
Cali, Colombia

CONTENIDO

	Pág.
Introducción	6
 1. CONCEPTOS BÁSICOS	 8
1.1 Morfología de la inflorescencia del arroz	8
1.2 La antera	9
1.3 Desarrollo del grano de polen en la antera	9
 2. EL CULTIVO DE ANTERAS	 14
2.1 Inducción de microcallos	14
2.2 Diferenciación celular para regenerar plantas	15
2.3 Factores que influyen en el cultivo de las anteras	17
 3. UTILIZACIÓN DEL CULTIVO DE ANTERAS EN MEJORAMIENTO ..	 40
3.1 Ventajas	40
3.2 Desventajas	44
3.3 Evaluación, selección, y algunos ejemplos de sus usos en mejoramiento ...	46
 4. IMPLICACIONES ECONÓMICAS DEL USO DE CULTIVO DE ANTERAS EN EL DESARROLLO DE VARIEDADES	 52
5. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ	 54
5.1 Siembra del material donante de las anteras	54
5.2 Selección de panículas	54
5.3 Esterilización superficial de las panículas	55
5.4 Determinación del estado de desarrollo del polen	56
5.5 Aislamiento de las anteras	57
5.6 Cultivo de las anteras y formación de microcallos	57
5.7 Transferencia de los microcallos al medio de regeneración	58
5.8 Adaptación de las plántulas para el trasplante a suelo	58
5.9 Evaluación de las plantas R ₁ , líneas R ₂ y selección de la semilla R ₃	59

6.	FORMULACIÓN Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO .	62
6.1	Preparación y almacenamiento de soluciones madres	62
6.2	Medidas de seguridad en el manejo de reactivos	64
6.3	Formulación de los medios basales utilizados para la inducción de callos y regeneración de plantas	64
6.4	Preparación de un litro de los medios N6m y NL para la inducción de callos	64
6.5	Preparación de un litro del medio de Murashige y Skoog para la regeneración de las plantas	66
6.6	Recomendaciones	67
7.	LITERATURA CITADA	73
	Apéndice	77

INTRODUCCIÓN

En arroz, líneas homocigotas pueden ser producidas a partir de cruzamientos segregantes por medio del doblamiento cromosómico del polen-haploide y regeneración de plantas a través de un ciclo de cultivo de anteras (CA). Niiziki y Oono (1968) fueron los primeros en regenerar plantas con esta técnica en arroz, y desde entonces el CA ha sido utilizada exitosamente en el mejoramiento de este cultivo generando mas de 80 variedades en Asia y Estados Unidos (Han, 1985; Fang, 1991; Liang and Huang, 1991). Sin embargo la implementación de esta técnica como una herramienta rutinaria en programas de mejoramiento ha sido lenta, principalmente porque la respuesta depende del genotipo utilizado. El arroz tipo japónica tiene una mayor respuesta que otros materiales (Chen and Lin, 1981; Ying, 1986; Chen *et al.*, 1991). De tal forma que la mayoría de estas aplicaciones han estado restringidas principalmente a cruzamientos donde al menos uno de los padres es del tipo japonico.

El CIAT viene investigando como incorporar el CA en el programa de mejoramiento. Uno de los primeros logros fue el desarrollo de un método simple que permite el procesamiento masivo de 8.000 - 10.000 anteras/persona/día (Núñez *et al.*, 1989). Desde 1990, nuestro laboratorio viene estudiando los posibles factores que afectan la respuesta androgenética de genotipos ampliamente utilizados en programas de mejoramiento en América Latina. El estudio ha estado centrado en identificar factores que afectan específicamente la respuesta de materiales altamente recalcitrantes del tipo indica (adaptados a condiciones de riego tropical o subtropical) y sabana (secano, adaptados a suelos ácidos). Arroz indica se caracteriza por una baja inducción de callos, mientras que el de tipo seco tiene una baja regeneración de plantas verdes. En el presente trabajo se muestra la metodología desarrollada, la cual es aplicable a una gran diversidad de genotipos. Actualmente, las plantas homocigotas producidas por CA (doble haploides, DH) son utilizadas en el programa de mejoramiento para desarrollar plantas tolerantes al frío, incrementar la recombinación entre materiales genéticamente distantes con resistencia a piricularia, al virus de la hoja blanca, y tolerancia a sequía, y para facilitar la producción de

materiales adecuados para el mapeo genético con RFLP y PCR (Lentini y Martínez, 1992). Finalmente, se presenta un estudio de factibilidad económica sobre el uso del cultivo de anteras para el desarrollo de variedades de arroz.

1. CONCEPTOS BÁSICOS

Antes de entrar a ver en qué consiste el cultivo de anteras es preciso repasar la morfología de la inflorescencia del arroz y el desarrollo del grano de polen en la antera, porque estos conceptos permitirán una mejor comprensión de la técnica.

1.1 Morfología de la inflorescencia del arroz

La inflorescencia del arroz es una panícula (Figura 1) compuesta de unidades florales denominadas espiguillas.

La espiguilla consta de la raquilla, dos lemas estériles y la florecilla (Figura 2). La raquilla es el eje que sostiene la flor y las lemas estériles o glumas rudimentarias son las brácteas alargadas del pedicelo que envuelven la flor por debajo de la raquilla. Las brácteas superiores, llamadas glumas florales o simplemente glumas, son la lema y la palea.

La flor consta de un pistilo y seis estambres. En el pistilo se distinguen el ovario, el estilo y el estigma. El ovario es de cavidad simple y contiene un solo óvulo. El estilo es corto y termina en un doble estigma plumoso. El estigma según la variedad presenta diferentes colores: blanco, verde pálido, amarillo, púrpura pálido o púrpura. Los estambres son filamentos delgados que sostienen las anteras alargadas y bífidas, las cuales contienen los granos de polen.

Las lodículas son dos protuberancias redondeadas y transparentes que se encuentran en la base de la flor responsables de la apertura floral. Durante la antesis las lodículas se ponen turgentes logrando que la lema y la palea se separen, simultáneamente se alargan los estambres y las anteras emergen. La dehiscencia de las anteras puede efectuarse antes o al mismo tiempo en que se abren las glumas, mostrando tendencia a la cleistogamia.

1.2 La antera

Al hacer un corte transversal en la antera se aprecian las células centrales por donde se conecta al filamento, cuatro cavidades denominadas sacos polínicos, dos anteriores y dos posteriores. Cuando ya se han formado los granos de polen, el saco anterior forma una sola cavidad con el respectivo saco posterior, de manera que la antera queda compuesta por sólo dos cavidades, denominadas tecas (Figura 3A).

La zona mas importante de la estructura de la antera es el arqueporio, parte interna de los sacos, en donde se forman los granos de polen. El arqueporio esta rodeado de un tejido glandular, conocido como el tapete, que produce enzimas, nutrientes y materiales estructurales críticos para la microesporogenesis. El conjunto de sacos polínicos de la antera esta rodeado por el llamado estrato fibroso, compuesto de células con paredes delgadas dispuestas a modo de filetes. Finalmente, en el exterior de todas estas capas se encuentra la pared de la antera que es una capa altamente especializada responsable por la deshicencia de la antera (Figura 3B).

1.3 Desarrollo del grano de polen en la antera

Dentro de los sacos polínicos se originan células jóvenes diploides, denominadas células madres del polen o microsporocitos primarios. Después de que el microsporocito alcanza cierto desarrollo, ocurre la meiosis o división reduccional, de la cual resultan dos células con 12 cromosomas, o sea la mitad del número de cromosomas que existe en las células somáticas del arroz, formándose así dos microsporocitos secundarios haploides. En seguida los microsporocitos secundarios sufren una división mitótica o ecuacional dando origen a dos células, también haploides. Así, por cada microsporocito primario, se forman cuatro células haploides, que se denominan microsporas (Figura 4A).

Posteriormente las microsporas se separan, iniciándose el estado uninucleado que comprende 3 etapas: (a) uninucleado temprano, cuando la doble pared de la microspora (intina y exina) no está todavía bien conformada y el núcleo está situado

en el centro de la microspora (Figura 4B); (b) uninucleado medio cuando ya la doble pared está bien definida y el núcleo empieza a ser desplazado hacia un costado por la presencia de una vacuola grande (Figura 4C), y (c) uninucleado tardío cuando el núcleo localizado en el costado de la microspora se presenta agigantado con pequeñas vacuolas nucleolares y listo para entrar en mitosis (Figura 4D).

Luego viene el estado binucleado de la microspora que comprende: (a) el binucleado temprano, que se presenta inmediatamente después de la primera división mitótica del núcleo, a partir del cual se forman dos núcleos; el vegetativo generalmente de mayor tamaño y el generatriz o espermatógeno más pequeño (Figura 4E), y (b) el binucleado tardío cuando se forman gránulos de almidón en el citoplasma (Figura 4F). El núcleo generativo sufre una segunda división mitótica obteniéndose así un conjunto de tres núcleos haploides que constituyen el grano de polen. Normalmente el grano de polen germina unas pocas horas después de entrar en contacto con el estigma originándose el tubo polínico. El núcleo vegetativo se degenera y uno de los núcleos generativos se fusiona con el núcleo de la ovocélula para formar el cigoto.

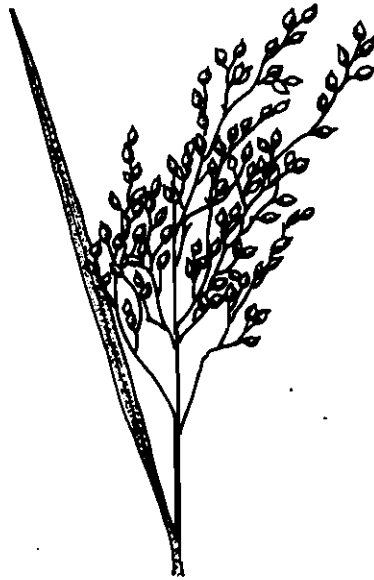


Figura 1. Inflorescencia en panícula de la planta de arroz.

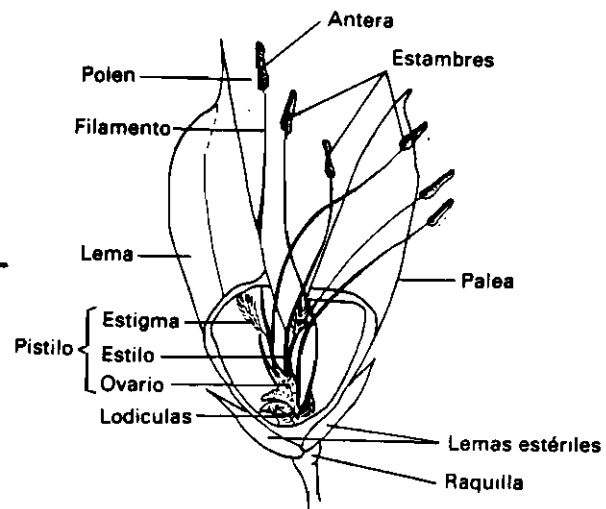


Figura 2. Estructuras de la espiquilla del arroz.

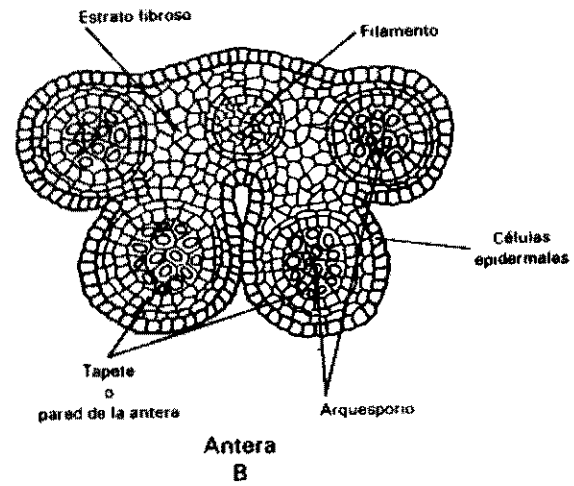
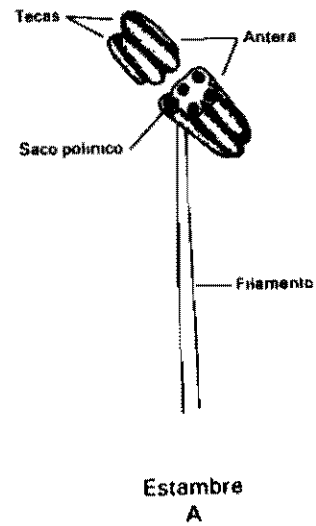


Figura 3. A. Corte transversal de la antera.

B. Estructura interna de la antera.

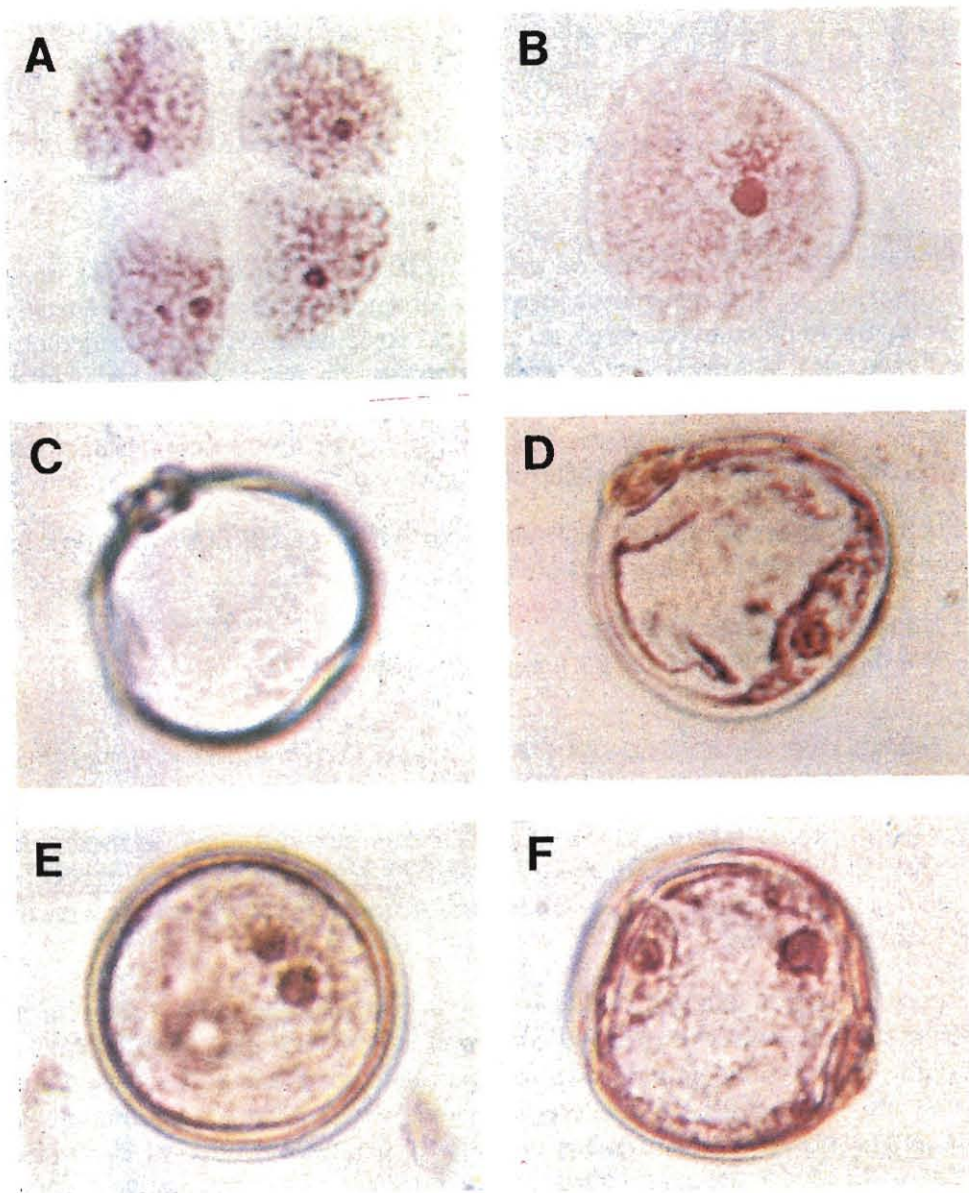


Figura 4. Estados de desarrollo de la microspora; a. Tetrada de microsporas; b. Uninucleado temprano; c. Uninucleado medio; d. Uninucleado tardío; e. Binucleado temprano; f. Binucleado tardío.

2. EL CULTIVO DE ANTERAS

El cultivo de anteras puede ser definido como una manipulación *in vitro* de los granos de polen inmaduros (microsporas) contenidos dentro de la antera, para evitar su desarrollo gametofítico e inducir el desarrollo esporofítico. En el caso de arroz este proceso ocurre a través de la formación de un tejido no diferenciado (callo) (Figura 5A - E) que culmina en la formación de embriones y/o plantas (Figura 5F, H), fenómeno conocido como androgénesis (Niizeki y Oono, 1968). De las plantas producidas aproximadamente un 40-70% puede ser haploide, triploide o tetraploide, mientras que el otro 30-60% es diploide y fértil (doble haploide, DH) y de mayor interés para el fitomejorador (Nishi y Mitsuoka, 1969). La técnica de cultivo de anteras de arroz ha avanzado a niveles donde un gran número de DH son producidos de muchos cultivares e híbridos, lo que hace posible aplicar esta técnica en programas de mejoramiento (Chen *et al.*, 1982; Martínez *et al.*, 1993).

2.1 Inducción de microcallos

En esta primera fase las microsporas son inducidas cultivando las anteras en un medio cuya composición estimula la división mitótica selectiva de las microsporas a expensas de las células somáticas presentes en el filamento, el tejido conectivo y la pared de la antera. Esta inducción se obtiene en un medio con altas concentraciones de auxinas [2,4-D, picloramo, y/o ácido naftalenacético (ANA)] y con bajos niveles de citoquininas [kinetina, zeatina, o bencilaminopurina (BAP)].

Después de dos días de cultivo ocurre la primera división mitótica de la microspora que da como resultado la formación de dos núcleos: el vegetativo de mayor tamaño y el generativo más pequeño, los cuales están separados por una membrana. El núcleo generativo se degenera rápidamente y generalmente desaparece antes de que el núcleo vegetativo se divida de nuevo. Alrededor del quinto día de cultivo *in vitro* el núcleo vegetativo inicia la división mitótica. En las primeras divisiones generalmente se originan membranas celulares que permiten la formación de núcleos independientes, cuyo número puede variar de 2 a 8 por cada microspora. A los 20

días de cultivo se forma una masa de tejido amorfo con más de 100 células por cada microspora involucrada en el proceso; éste es el denominado microcallo, que alrededor de los 30 ó 50 días dependiendo del genotipo, alcanza un tamaño de 2 mm, considerado como el más apropiado para iniciar el proceso de regeneración de plantas.

Aunque aún no se sabe con exactitud cómo sucede el doblamiento cromosómico del 30 - 60% de las plantas regeneradas por cultivo de anteras, las observaciones citológicas del desarrollo de las microsporas en esta etapa permiten suponer dos formas, mediante las cuales puede ocurrir la diploidización o poliploidización. En la primera, llamada fusión nuclear, cuando el cultivo se inicia a partir de microsporas en estado uninucleado temprano a medio, no hay formación de membrana celular entre los núcleos en las primeras divisiones mitóticas del núcleo vegetativo, haciendo posible la fusión de dos o más núcleos, lo cual origina callos diploides o poliploides; o cuando el proceso de cultivo se ha producido a partir de microsporas en estado uninucleado tardío, el núcleo vegetativo se fusiona con el núcleo generativo y origina un callo diploide. En la segunda forma, llamada endoreduplicación, al presentarse la mitosis de las células haploides no hay separación de los cromosomas duplicados, lo cual conduce a la formación de un solo núcleo con un número doble de cromosomas.

2.2 Diferenciación celular para regenerar plantas

Una vez los microcallos han alcanzado el desarrollo adecuado, o sea un tamaño de 2 mm, son transferidos a otro medio de cultivo que contiene concentraciones bajas de auxinas pero altas de citoquininas (kinetina o bencil aminopurina), las que estimulan la diferenciación de las células del microcallo hasta regenerar plantas.

En los primeros estados de desarrollo el microcallo es una masa de células sin diferenciación; posteriormente las células desarrollan vacuolas y se empieza a formar el tejido parenquimatoso. En este tejido se diferencian meristemas localizados algunos en la periferia, denominados meristemas periféricos, y otros están dispersos dentro de la masa parenquimatoso, denominados endomeristemas dispersos. Los

meristemas periféricos originan los puntos de crecimiento o yemas de la plántula, mientras que de los endomeristemas dispersos se originan los primordios de las raíces. En los primeros estados del proceso de morfogénesis, las yemas y las raíces se desarrollan independientemente, sin ninguna conexión de tejido vascular entre ellos. Posteriormente se desarrolla el tejido vascular que conecta el vástago con la raíz, conformándose así la nueva plántula. Estas plántulas tienden a macollar dentro del medio de cultivo y desarrollan hojas típicas a los 30 ó 45 días después de ocurrida la transferencia de los callos al medio de regeneración.

2.3 Factores que influyen en el cultivo de las anteras

Los siguientes factores influyen en la producción de plantas doble haploides derivadas del cultivo de anteras de arroz:

- El genotipo
- El albinismo
- Las condiciones ambientales y el estado fisiológico de la planta donante
- El estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo
- El tratamiento de la antera antes del cultivo
- La pared de la antera
- El medio de cultivo
- Las condiciones físicas de incubación de las anteras

2.3.1 El genotipo

El genotipo es el factor que mas influye en la frecuencia de las anteras que producen callos, la capacidad del callo de diferenciar plantas, la proporción de plantas verdes a albinas, y la ploidia de las plantas regeneradas. Mientras que es posible producir un alto número de doble haploides de muchas variedades e híbridos de arroz japónica, la producción de callos y regeneración de plantas verdes de la mayoría de las índicas es baja (Chen *et al.*, 1991). Nuestro estudio con materiales latinoamericanos que incluye un total de 151 índica, 113 japónica secano, 199 índica X japónica secano, y 99

Índica X japónica riego (Cuadro 1) muestra diferencias genotípicas similares a las obtenidas por otros investigadores con materiales asiáticos. La razón por estas diferencias genotípicas todavía no es del todo clara. Sin embargo, hay evidencias que la androgénesis *in vitro* está bajo control genético simple. Estudios hereditarios sugieren que la inducción de callos y regeneración de plantas están controlados por uno o dos bloques de genes recesivos diferentes sin involucrar al citoplasma (la dominancia de la no respuesta es parcial), y el efecto de genes aditivos es predominante (Miah *et al.*, 1985; Quimio y Zapata, 1990). Además, aparentemente la respuesta *in vitro* no está ligada a otros caracteres de interés agronómico. Nuestra experiencia también lo demuestra. Híbridos Índica X japónica presentan una mayor respuesta que las Índicas (Cuadro 1), y de estos cruzamientos ha sido posible recobrar fenotipos que combinan características de ambos genotipos. Por lo tanto, existe la posibilidad de mejorar la respuesta al cultivo de anteras del arroz tipo Índica a través de manipulaciones genéticas.

2.3.2 El Albinismo

La producción de plantas albinas es un fenómeno común en el cultivo de anteras de cereales. En arroz la aparición de plantas carentes de clorofila varía con el genotipo; en algunos casos puede obtenerse una alta tasa de regeneración de plantas pero el porcentaje de plantas albinas puede variar desde un 10% hasta un 100% (Wang *et al.*, 1978; Tsay *et al.*, 1981) (Figura 6). El albinismo es particularmente predominante en plantas derivadas del polen inmaduro de híbridos interespecíficos o híbridos intraespecíficos entre las subespecies japónica e Índica (Tsay *et al.*, 1981); así el albinismo constituye un obstáculo importante para el uso del cultivo de anteras en cruces amplios. Sin embargo, peculiaridades del polen y de las condiciones del cultivo *in vitro* pueden ser también responsables, al menos en parte, para su prevalencia.

Estudios sugieren que la formación de plantas albinas es debida a alteraciones de los plastidios durante la microsporogénesis *in vivo*. El albinismo está relacionado con el deterioro del ADN de los cloroplastos (Day y Ellis, 1984) y con deficiencias en el

ARN de los plastidios (Chen, 1986). La producción de plantas albinas también puede ser debida a la falta de expresión de los genes responsables del desarrollo normal de los cloroplastos y síntesis de clorofila bajo las condiciones de cultivo *in vitro*. La frecuencia de plantas albinas incrementa con la edad del callo (>2 mm en diámetro), la temperatura de inducción y regeneración de las plantas (> 26°C), la clase y concentración de reguladores de crecimiento (2,4-D > 2 mg/l), concentración de sucrosa en el medio de inducción (> 6%), concentración de sales en el medio de cultivo (<0.4 mg equivalente de Fe⁺²), y el estado de desarrollo del polen durante la excisión y cultivo de las anteras (> de uninucleado tardío, Figura 4D) (Chen et al., 1991). Así, la propia manipulación de estos factores puede también ayudar a minimizar la frecuencia de producción de albinos.

2.3.3 Las condiciones ambientales y el estado fisiológico de la planta donante

Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, tales como el fotoperíodo, la intensidad de luz, la temperatura, la nutrición mineral, variaciones estacionales, tratamientos físicos y la aplicación de hormonas pueden influir en la respuesta de las microsporas al cultivo *in vitro* (Chen et al., 1991).

Por lo general, anteras de plantas desarrolladas en el campo y bajo períodos de baja nubosidad y lluvia presentan una mayor respuesta debido a los altos niveles radiacionales. Nuestros resultados de dos años de estudio muestran que la respuesta del arroz tipo indica es altamente afectada por los niveles radiacionales recibidos durante los dos últimos meses antes de cosechar las anteras, mientras que las japónicas son más afectadas durante todo el período de crecimiento (Figura 7).

Anteras de plantas desarrolladas a bajas temperaturas (15/20°C noche/día) son más afectadas que aquellas a altas temperaturas (30-35°C). Pero anteras de plantas crecidas a temperaturas superiores a los 30°C tienden a producir un mayor porcentaje de plantas albinas (Chen et al., 1991). Las condiciones óptimas para el crecimiento de las plantas es 19/29°C noche/día (Ying, 1986). En algunos casos la deficiencia de nitrógeno en las plantas donantes incrementa la respuesta al cultivo *in vitro* de las

anteras, y la aplicación de gametocidas a las panículas en sus estados iniciales de desarrollo puede también resultar en una mayor respuesta (Chen *et al.*, 1991).

En observaciones realizadas a los granos de polen maduros contenidos en las anteras del arroz, se han identificado dos tipos de granos de polen con diferencias morfológicas y fisiológicas. Este factor diferencial denominado dimorfismo del polen, consiste en que algunos granos presentan el estado morfológico normal, pero otros, considerados anormales, son de menor tamaño, con tinción débil del citoplasma y generalmente presentan divisiones anormales similares al proceso de división que se presenta cuando se cultivan los granos de polen en un medio de cultivo *in vitro*. A los granos de polen anormales se los ha denominado granos-s o granos-p y se cree que son los responsables de la proliferación celular que da como resultado la formación de callos cuando se someten las anteras al cultivo *in vitro*. Su presencia dentro de la población de polen está predeterminada por las condiciones ambientales bajo las que se desarrolla el cultivo y el estado fisiológico de las plantas donantes (Heberle Bors, 1985).

El estado fisiológico de la planta donante justo en el momento en que se cosechan las panículas también influye en los resultados obtenidos. Nuestras investigaciones indican que las anteras de las primeras inflorescencias, cosechadas en días soleados, y entre 8 a.m. y 10 a.m. tienen una mayor capacidad de respuesta que las que provienen de la etapa final de la floración y cosechadas en días lluviosos y/o después de las 10 a.m. Estas diferencias pueden estar asociadas con la viabilidad de las microsporas en el momento de cosechar las anteras (Chen *et al.*, 1991).

2.3.4 El estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo

El estado de desarrollo del polen en el momento en que se separan las anteras para someterlas al cultivo *in vitro*, es un factor clave para asegurar una respuesta exitosa. En estudios comparativos y en la práctica se ha determinado que la etapa de desarrollo del polen comprendida entre el estado uninucleado medio y el uninucleado tardío es la óptima para asegurar una respuesta exitosa (Chen, 1977) (Figura 4C - D).

Si la siembra de las anteras en el medio nutritivo se realiza cuando el estado de desarrollo del polen está en una etapa anterior o posterior a las mencionadas, la producción de callos decrece notablemente.

2.3.5 El tratamiento de las anteras antes del cultivo

Por muchos años se mantuvo la práctica rutinaria de aislar las flores de la planta donante, separar sus anteras e inmediatamente colocarlas bajo condiciones definitivas de incubación. Sin embargo, en los últimos 20 años esta práctica se ha modificado al descubrir que al someter las anteras a un tratamiento de bajas temperaturas antes de sembrarlas en el medio de cultivo, se incrementa la producción de callos significativamente. En la actualidad ésta es una práctica esencial dentro de la técnica utilizada para el cultivo de anteras.

Los efectos del pretratamiento a bajas temperaturas sobre la respuesta del cultivo de anteras de arroz han sido estudiados por varios investigadores. No existe un efecto significativo cuando el tratamiento es aplicado después que las anteras son cultivadas en el medio de inducción (Tsay y Chen, 1984). La inducción óptima se consigue con un pretratamiento de 8-10°C por 7 días en la oscuridad en anteras con microsporas en estado uninucleado medio (Figura 4 C). Ese tratamiento no solamente incrementa la formación de callo, pero también la diferenciación de plantas verdes. Un pretratamiento en frío por más de 14 días reduce la capacidad morfogénica de los callos e incrementa la producción de albinos (Tsay y Chen, 1984).

Las investigaciones en la fisiología de las anteras han revelado que los efectos benéficos del tratamiento con frío y en ausencia de luz, consisten en reducir la actividad respiratoria de las anteras al disminuir el consumo de materiales, lo cual prolonga la actividad biológica del arqueporio que alberga a los granos de polen, manteniendo su viabilidad, evitando la dehiscencia prematura de las anteras en el cultivo, y retrasando la senescencia del polen (Sunderland, 1978). Actualmente se piensa que el pretratamiento en frío promueve la inhibición de la expresión de genes y/o de la función de las enzimas producto de esta expresión, los cuales son

responsables por el desarrollo gametofítico, permitiendo el cambio al desarrollo esporofítico (Chen *et al.*, 1991).

Aunque existen otros tratamientos físicos como el pretratamiento a altas temperaturas, las irradiaciones con rayos gamma a las anteras o a las semillas que dan origen a las plantas donantes, y la aplicación de químicos tales como colchicina y ethrel en el medio de cultivo, el tratamiento con bajas temperaturas sigue siendo el más utilizado y el de mejores resultados.

2.3.6 La pared de la antera

En experimentos realizados cultivando granos de polen *in vitro*, los resultados han sido favorables sólo cuando éstos han permanecido unidos a las anteras en el medio de cultivo por lo menos unos días antes de ser aislados. Igualmente, la inducción de callos y posterior regeneración de plantas es mayor en cultivos donde la senescencia de las anteras ocurre hacia el final del período del cultivo, después de la cuarta semana, que cuando aparece en los primeros quince días (Pelletier y Ilami, 1972; Mii 1976; Tsay 1982). Estos hallazgos son evidencia clara de la importancia que tienen las sustancias fisiológicamente activas contenidas en el tapete o pared de la antera, las cuales inducen la morfogénesis de las microsporas durante los primeros días de cultivo, y son necesarias hasta que estas células son autónomas para proseguir el desarrollo esporofítico. En el caso de la senescencia prematura de las anteras, también es probable que las quinonas producidas son tóxicas para las microsporas.

En nuestro laboratorio varios intentos fueron realizados para reducir la senescencia precoz de las anteras, la cual generalmente ocurre durante las primeras dos semanas de cultivo en los genotipos índica. Carbón activado fue adicionado para absorber los polifenoles liberados al medio de inducción, pero este compuesto totalmente inhibió la inducción de callos. Agentes anti-oxidantes para minimizar la oxidación de compuestos fenólicos tales como L-cisteína, no ejercieron ningún efecto, y aunque el ácido cítrico incrementó la inducción de callos de un 55% de los genotipos evaluados, la mayoría de éstos mostraron una baja regeneración de plantas verdes.

2.3.7 El medio de cultivo

Aunque la iniciación de la división de las microsporas puede ser independiente de aditamentos nutricionales, éstos son requeridos para las subsecuentes divisiones que conllevan a la formación del callo, y la diferenciación de estas células en embriones y plantas. Normalmente se utilizan dos medios de cultivo, uno para la inducción de callos a partir del polen inmaduro, y otro para la regeneración de plántulas a partir de los callos.

Los medios de cultivo están constituidos por dos grandes grupos de sustancias. El primer grupo, o medio basal, está formado de nutrimentos inorgánicos (macro y microelementos), hidratos de carbono, vitaminas y en algunos casos otros aditivos orgánicos. El segundo grupo de sustancias lo constituyen los reguladores de crecimiento de tipo hormonal. Varios laboratorios han tratado de optimizar la composición de los medios de cultivo para el CA de arroz, pero en ocasiones las conclusiones difieren unos de otros. Estas diferencias pueden deberse a la influencia que ejercen el genotipo, el estado de desarrollo del polen y el pretratamiento en frío dado a las anteras. Sin embargo, esto no resta la importancia que tiene la composición del medio de cultivo, ya que es común que para un mismo genotipo, la frecuencia de inducción varíe según la composición del medio.

2.3.7.1 Nutrientes inorgánicos y vitaminas

El crecimiento y la diferenciación de los callos está influenciado por las concentraciones de sales inorgánicas, especialmente las de amonio, por esto la relación entre la concentración de amonio (NH_4^+) y de nitrato (NO_3^-) es uno de los principales factores en la composición del medio. La formación del callo de microsporas de arroz y otros cereales es inhibida por las altas concentraciones de amonio presentes en el medio básico MS. Basado en estas observaciones Chu *et al.* (1975) desarrollaron el medio básico N6, el cual contiene aproximadamente 1/3 de los niveles de amonio, el triple de fosfato, 1/3 de calcio, 1/2 de magnesio, 1/3 de cloruro, 1.5 veces de potasio, y el doble de sulfato con respecto al medio basal MS

(Cuadro 2). Las vitaminas del medio basal satisfacen la necesidad que tiene el polen de cofactores enzimáticos. Usualmente en el medio N6 se adiciona ácido nicotínico (0.5 mg/l), piridoxina (0.5 mg/l), tiamina (1.0 mg/l) y glicina (2 mg/l) (Cuadro 2).

El medio N6 ha sido ampliamente adoptado para el cultivo de anteras de arroz japónica. El tipo *Índica*, sin embargo, tiene otros requerimientos nutricionales. Huang *et al.* (1981) encontraron que una modificación del medio N6 que contiene la mitad del nivel de NH_4^+ , dos veces la de PO_4^- y $1/5 \text{ Mg}^{2+}$ (medio He2, denominado aquí N6m por contener otra composición hormonal) incrementa la frecuencia de inducción de callos y la regeneración de plantas verdes de genotipos *Índica*, sugiriendo que este tipo de arroz es altamente susceptible al amonio y el magnesio.

Estudios comparativos fueron realizados en el CIAT para determinar la composición óptima del medio basal para la inducción de callo, y su efecto sobre la regeneración de plantas verdes de 22 genotipos *Índica* y 13 japónica comúnmente cultivados o utilizados en mejoramiento en LAC (Cuadro 3). La respuesta con los medios basales N6 y N6m fue comparada con la obtenida con el medio Papa-2 (Chen *et al.*, 1978), previamente utilizado en el CIAT (Núñez *et al.*, 1989). El medio de papa está basado en el uso del extracto de papa suplementado con 2 a 4 veces niveles mas bajos de macronutrientes con respecto al N6 y N6m, sin micronutrientes y vitaminas. La inducción de callos y regeneración de plantas verdes de las *Índicas* fue el doble en el medio N6m que en los medios N6 y Papa-2 (Figura 8). Las japónicas formaron callos en el medio de Papa -2, pero un incremento de 2 a 3 veces en regeneración de plantas verdes se observó con el N6 o N6m, respectivamente (Figura 9). El medio de Papa-2 no solamente produjo una senescencia tempranas de las anteras, sino que también indujo la diferenciación de un menor número de callos. Resultados similares fueron obtenidos con un mayor número de genotipos utilizados en nuestro programa de mejoramiento (Cuadro 1). Modificaciones subsiguientes del medio N6m, conteniendo 231.5 mg/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3134 mg/l KNO_3 , 540 mg/l KH_2PO_4 , micronutrientes del MS, y 2.5 mg/l vitaminas del N6 (medio NL, Cuadro 2) incrementó 3 veces la inducción de callos y 5 veces la regeneración de plantas verdes de arroz *Índica* con respecto al N6m (Figura 8). La diferenciación de plantas de arroz

japónica también incrementó cuando los callos se indujeron en el medio NL (Figura 9). Nuestros resultados también indican que una mayor inducción de callos es obtenida en medio líquido que en medio sólido.

El medio MS (Cuadro 2) es el más utilizado para la diferenciación de plantas a partir de callos de anteras de arroz. En nuestro laboratorio se utilizan dos medios basales. El MS, que se caracteriza por un alto contenido de sales inorgánicas, y 1/2 MS, el cual contiene la mitad de las sales inorgánicas del MS, con excepción del $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, que se adiciona completo cuando se utiliza el Phytigel como agente solidificante para permitir su solidificación. El MS se emplea con callos que provienen del medio de inducción N6m, y 1/2MS para callos inducidos en el medio NL, el cual contiene maltosa. El tipo de agente gelificante también influye en la regeneración de plantas, obteniéndose mejores resultados cuando se utiliza phytigel (1.8 g/l) o gel-rite (1.5 g/l) en comparación con agar. En el CIAT el Phytigel es el solidificante más utilizado.

2.3.7.2 Hidratos de carbono

Los hidratos de carbono (azúcares) del medio basal satisfacen los requerimientos de moléculas de carbono como fuente de energía. Por lo general, altos niveles de sucrosa son estimulantes para la inducción de callos de anteras de arroz.

Concentraciones de 4% a 5% han sido recomendadas (Chen *et al.*, 1991). En general se requieren niveles más altos de sucrosa para la inducción que para la regeneración de plantas. Sucrosa al 3% en el medio de diferenciación es generalmente utilizada por la mayoría de los investigadores.

Estudios realizados en nuestro laboratorio mostraron que un incremento significativo en la inducción de callo de genotipos indica recalcitrantes y japónica es obtenido cuando 5% sucrosa es reemplazada por 5% maltosa (Figura 10). Maltosa 5% es más inductiva que 1% o 3% (Figura 10). Investigaciones recientes indican que para algunos genotipos una mayor inducción de callos es obtenida con maltosa 8% ó 10%, pero lo más notable es que la producción de plantas verdes de callos inducidos a

estas concentraciones es incrementada significativamente (Figura 10). Además de maltosa, otros carbohidratos fueron evaluados. Glucosa 5% inhibe la inducción de callos, y combinaciones de 2% maltosa con 3% manitol o 7% de almidón de arroz, o 2% sucrosa con 3% ó 5% manitol son menos inductivas que 5% maltosa solamente. A diferencia de la inducción de callos, la substitución de sucrosa por maltosa en el medio de regeneración no incrementa la formación de plantas verdes.

2.3.7.3 Reguladores de crecimiento

Los constituyentes más cruciales en el cultivo de anteras de arroz son las auxinas y las citoquininas.

Auxinas: ANA (ácido naftalenacético), 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), AIA (ácido indolacético), AIB (ácido indolbutírico), Picloramo, Dicamba, AFA (ácido Fenilacético)

Citoquininas: BAP (6-benzilaminopurina), 2 iP (N⁶-2-iso penteniladenina), Kinetina (6-furfurilamonopurina), Zeatina, Thiadazuron.

Las auxinas en concentraciones medias y altas actúan sinérgicamente con las citoquininas en concentraciones bajas para el desarrollo de callos. Cuando se utilizan bajas concentraciones de auxinas se estimula el enraizamiento y las citoquininas en altas concentraciones favorecen el desarrollo de los brotes, tallos y hojas e inhiben el enraizamiento. Es muy importante realizar una combinación de auxinas y citoquininas en una proporción de 1:4 ó de 1:2 para regenerar plantas enraizadas.

El 2,4-D como fuente de auxinas generalmente se utiliza para la inducción de callos, puesto que tiende a inhibir la organogénesis, a diferencia del ANA que además de favorecer la producción de callos no suprime la diferenciación posterior.

El resultado de investigaciones realizadas en CA de arroz en varios laboratorios indican que: a) es necesario incluir al menos una auxina y una citoquinina en el

medio de inducción para obtener callos con alta capacidad morfogénica; b) Las auxinas 2,4-D y ANA son igualmente eficientes en la formación de callos; c) Concentraciones de kinetina mayores de 1 mg/l en el medio de inducción promueven la producción de albinos; d) Concentraciones de 1 mg/l ANA y 4 mg/l kinetina en el medio de regeneración incrementan la formación de plantas verdes.

Nuestros resultados muestran que la embriogénesis de callos es promovida utilizando conjuntamente 2 mg/l 2,4-D y 0.07 mg/l picloramo en el medio de inducción. La adición de 2,4-D y/o ANA son menos inductivas. Dicamba con o sin picloramo promueve una inducción de callos en forma similar al 2,4-D, pero la regeneración de plantas de estos callos está altamente inhibida. En contraste a cebada, el AFA en concentraciones de 2, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/l notablemente inhibe la inducción de callos, inclusive de aquellos genotipos con mayor respuesta, y muy pocos callos diferencian plantas. La inducción de callos con 0.5 mg/l kinetina o 0.1 mg/l zeatina son similares. La regeneración de plantas verdes es óptima cuando se utiliza ANA: kinetina en una proporción de 1 mg/l: 4 mg/l. Thiadazuron, compuesto con una fuerte acción similar a las citoquininas, inhibe la diferenciación de plantas a concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 mg/l, y las pocas plantas verdes formadas son anormales. Sería interesante evaluar concentraciones más bajas de este componente.

2.3.7.4 Otros aditivos

La presencia de 5-10 mg/l nitrato de plata (AgNO_3) en el medio de inducción reduce notablemente la senescencia de las anteras de arroz tipo *Índica* recalcitrantes, resultando en un incremento de la inducción de callos de hasta siete veces para algunos genotipos (Figura 11). Para la mayoría de los genotipos concentraciones mayores de 15 mg/l AgNO_3 son inhibitorias. Por el contrario, la presencia de AgNO_3 en el medio de regeneración inhibe la diferenciación de plantas. El ión plata es un inhibidor de la acción del etileno. Nitrato de plata ha sido utilizado para estimular la inducción y regeneración de plantas verdes de callos embriogénicos de varias especies. Estos resultados indican que el etileno acumulado en el envase de cultivo puede estar inhibiendo la formación de callos de arroz *Índica*, efecto probablemente que es revertido con la aplicación del nitrato de plata.

Estudios sobre los factores que afectan la formación de plantas verdes mostraron que una reducción de la concentración de sucrosa del 3% al 2%, conjuntamente con la suplementación de 10 mg/l putrescina (una poliamina), incrementan la diferenciación de plantas de un 30% a un 50% en un genotipo japonico secano frecuentemente utilizado como padre para adaptación a suelos acidos en nuestro programa de mejoramiento (Figura 12). Un mayor efecto de la putrescina es obtenido cuando el medio de regeneración contiene 2% sucrosa. Observaciones preliminares mostraron que la reducción de sucrosa del 3% al 2% en el medio de regeneración incrementa el numero de callos con puntos de diferenciación; sin embargo, solamente un 20% de éstos desarrollaban plantas. Ningún efecto ha sido observado en las índicas estudiadas. La putrescina incrementa la elongación de coleóptilos de arroz *in vivo* bajo condiciones anaeróbicas (Reggiani *et al.*, 1989). Estos resultados sugieren que los bajos niveles de oxígeno dentro del envase de cultivo pueden ser inhibitorias para la diferenciación de plantas en genotipos de secano, pero no afectan aquellos adaptados a condiciones de inundación. Un mayor número de genotipos secano deben ser evaluados para establecer si la putrescina puede ser utilizada rutinariamente.

2.3.7.5 Medio óptimo

Nuestras investigaciones sugieren que es posible incrementar la inducción de callos 24 veces en las índicas y 2 veces en las japónicas cuando se utiliza el medio de inducción NL complementado con 2 mg/l 2,4-D, 0.07 mg/l picloramo, 1 mg/l kinetina, 5% maltosa y 10 mg/l AgNO₃ (Cuadro 4) (Lentini *et al.*, 1993). Callos inducidos en este medio muestran un aumento en formación de plantas verdes 16 veces para las índicas y 10 veces para las japónicas, cuando son diferenciados en 1/2 MS, 1 mg/l ANA, 4 mg/l kinetina, 3% sucrosa, y 0.18 % phytigel. Un promedio del 60% de las plantas verdes son diploides (doble-haploides) en las índicas, y 41% en las japónicas, resultando en un rendimiento de 46 doble-haploides por cada 100 anteras cultivadas tipo índica, y 178 doble-haploides por 100 anteras japónicas. Este medio ha demostrado ser óptimo para los 22 genotipos índica y 13 japónica evaluados (Figuras 8 y 9) y un gran numero de genotipos procesados en nuestro laboratorio para la producción de líneas de mejoramiento (Lentini *et al.*, 1993).

Actualmente, se están realizando investigaciones para determinar si maltosa 8-10% puede ser empleada de forma rutinaria.

2.3.8 Las condiciones físicas de incubación para la inducción de callos y diferenciación de plantas

La temperatura y la luz juegan un papel importante en la androgénesis (Maheshwari *et al.*, 1980). En arroz, la temperatura adecuada para los procesos de formación de callos y de regeneración de plantas está entre los 24 y 26°C. Con temperaturas por encima de 28°C las anteras se degeneran rápidamente, disminuyen la formación de callos y la tasa de regeneración de plantas, y aumenta la presencia de plantas albinas.

La luz no es necesaria para la fase de inducción, y el crecimiento de los callos se favorece en la oscuridad. Una vez que los callos son transferidos al medio de regeneración, la luz es necesaria para el proceso de fotosíntesis en el desarrollo de las plantas verdes. El cambio de oscuridad a luz debe ser progresivo, primero exponiendo los callos a luz tenue de aproximadamente $40 \mu \text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, y posteriormente a luz directa de 80 a $100 \mu \text{E.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Otros factores que influyen en la respuesta de la antera es la composición de la atmósfera del recipiente de cultivo (Johansson *et al.*, 1982) y la densidad de las anteras inoculadas (Sunderland *et al.*, 1981); sin embargo, estos factores no han sido investigados en arroz (Chen *et al.*, 1991).

Nuestras investigaciones muestran que el uso de nitrato de plata, un inhibidor de etileno, incrementa la inducción de callos de genotipos indica, pero no tiene efecto en la diferenciación de plantas (punto 2.3.7.4). El efecto de la densidad de las anteras inoculadas también fue evaluada. El número de anteras fue incrementada de 25 anteras/ml medio líquido, densidad normalmente utilizada en nuestro laboratorio, a 50 anteras/ml medio, densidad óptima para cebada; sin embargo, la inducción de callo fue similar a ambas densidades.

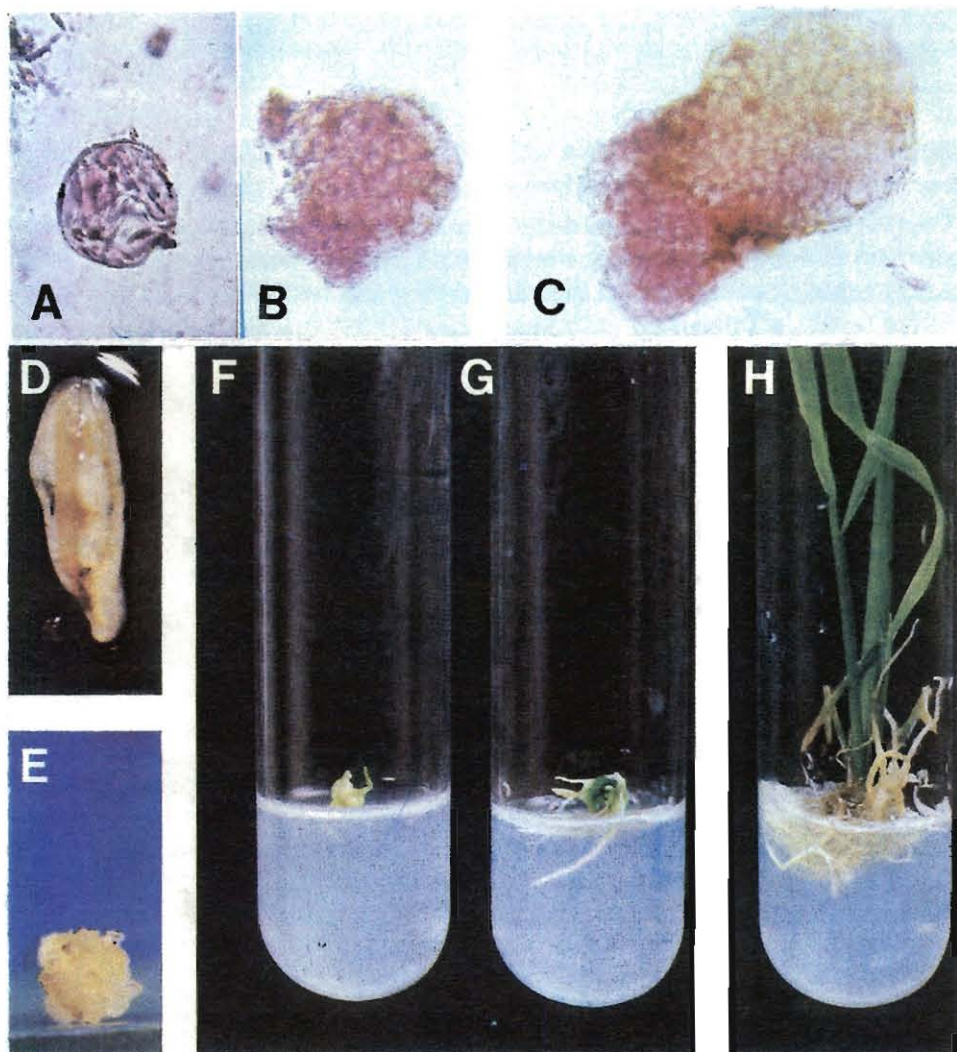


Figura 5. Producción de plantas de arroz a partir del cultivo de anteras; A, B y C: multiplicación celular a partir de la microspora; D - minicallo dentro de la antera; E: minicallo (1-2 mm); F y G: diferenciación de yemas y raíces; H: plántula ya formada.



Figura 6. Plantas albinas regeneradas a partir del cultivo de anteras.

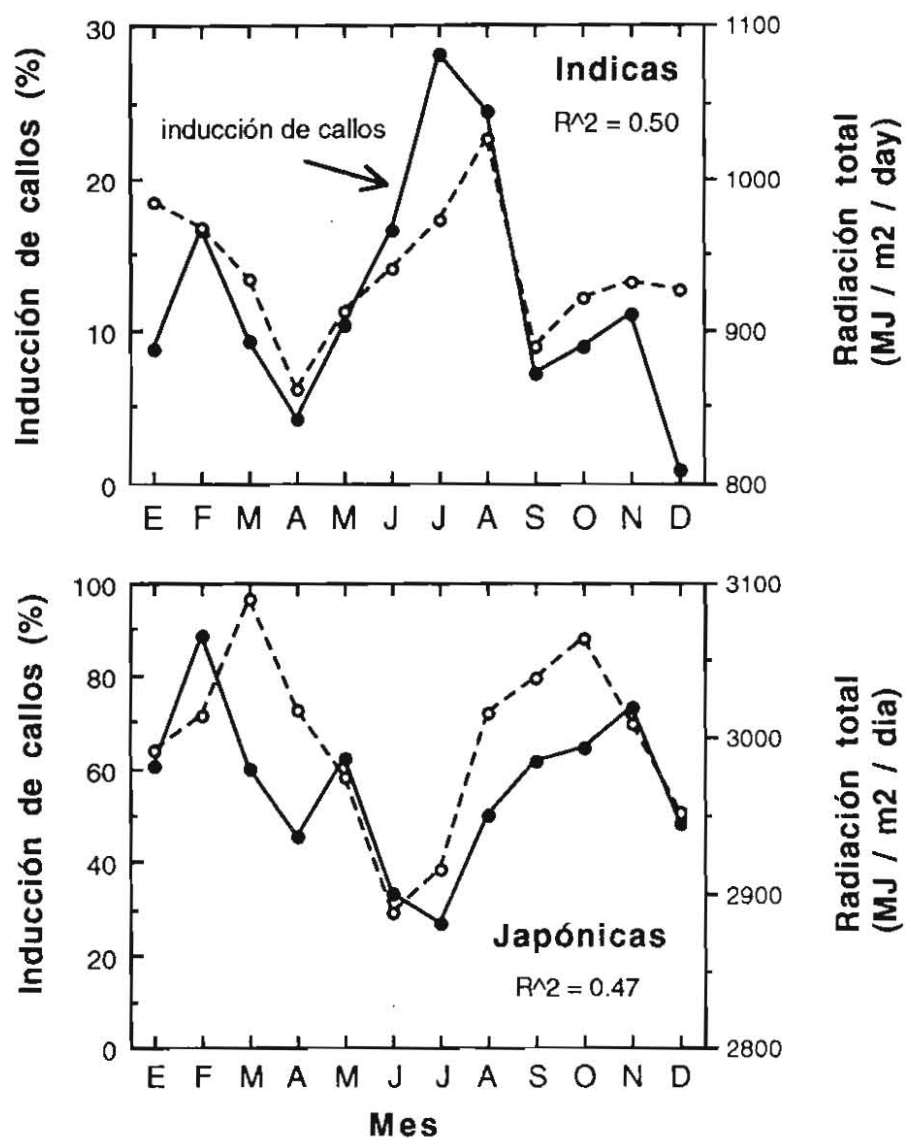


Figura 7. Efecto de los niveles radiacionales recibidos por las plantas durante los dos (índica) o tres (japónica) meses de crecimiento antes de la cosecha de la panícula en el campo.

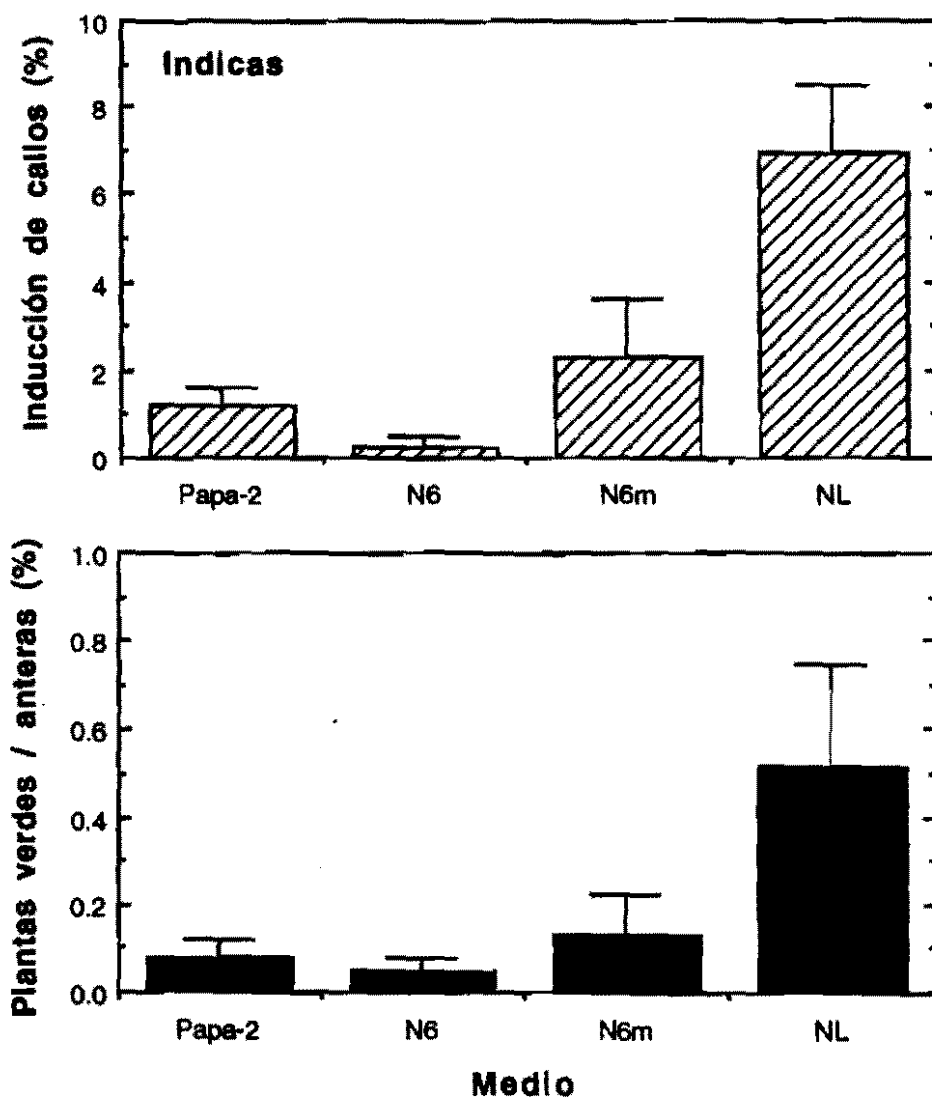


Figura 8. Respuesta al cultivo de anteras de 22 genotipos indica comúnmente cultivados o utilizados en mejoramiento en América Latina y el Caribe.

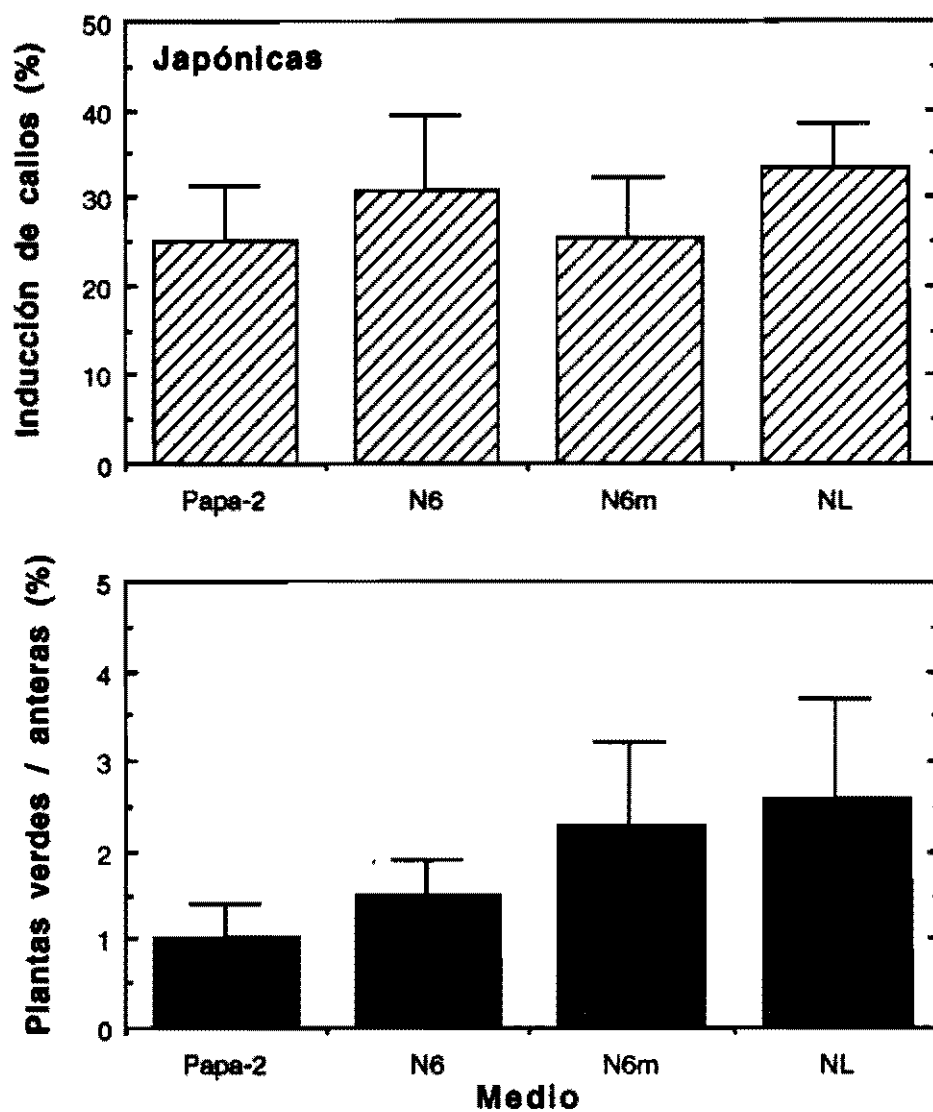


Figura 9. Respuesta al cultivo de anteras de 13 genotipos japónica comúnmente cultivados o utilizados en mejoramiento en América Latina y el Caribe.

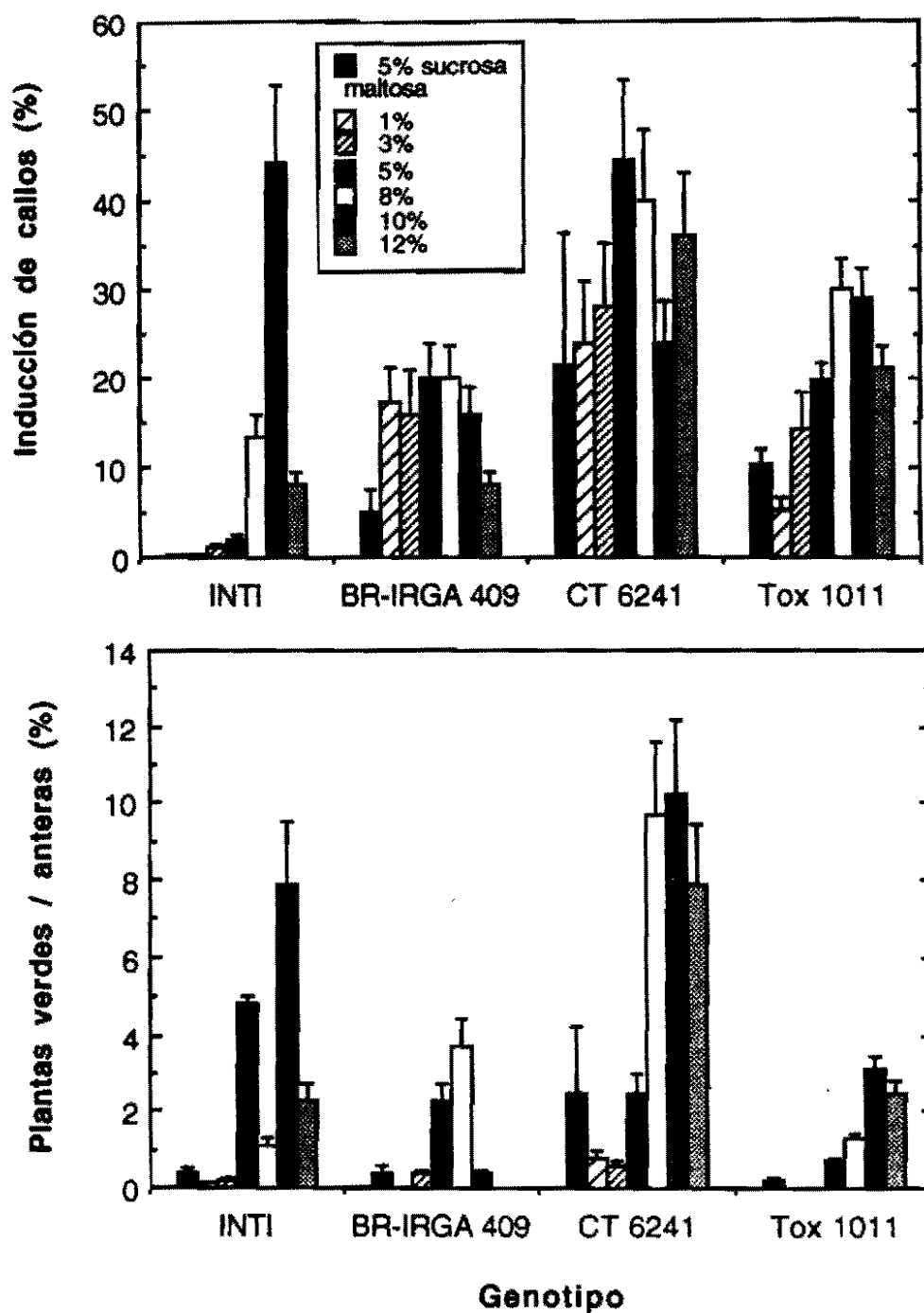


Figura 10. Efecto de sucrosa y maltosa en la inducción de callos y regeneración de plantas.

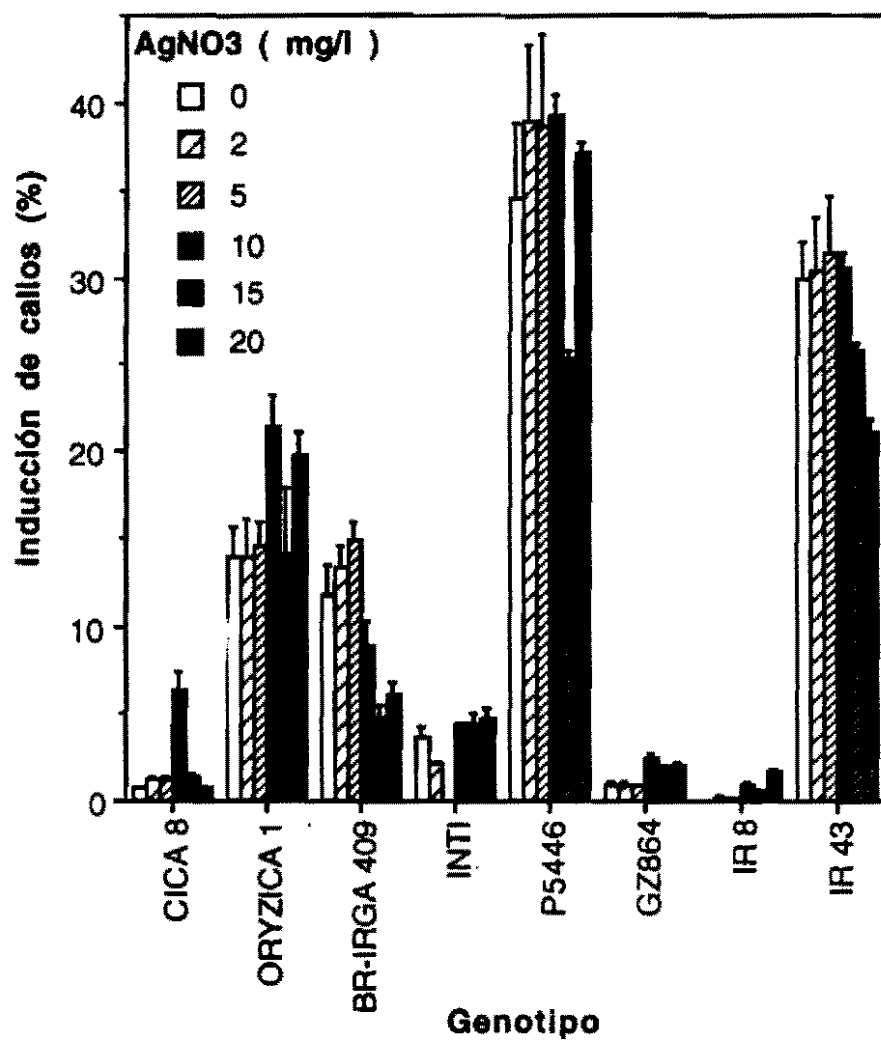


Figura 11. Efecto del nitrato de planta (AgNO_3) en la inducción de callos en medio NL con 5% maltosa.

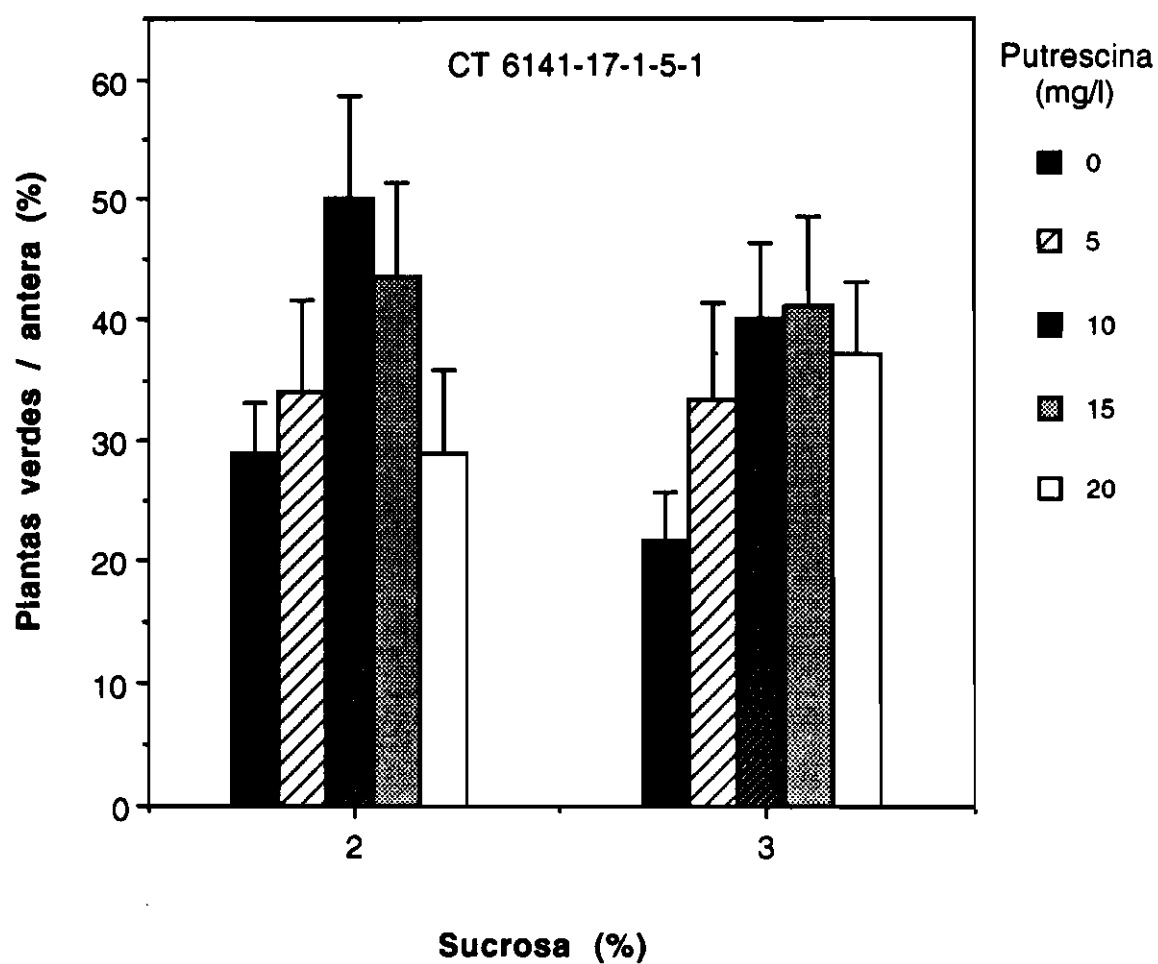


Figura 12. Efecto de putrecina en la regeneración de plantas verdes en medio MS con 2% o 3% sucrosa a partir de callos inducidos en medio N6m con 5% sucrosa.

Cuadro 1. Regeneración de plantas verdes de varios genotipos de arroz a partir de callos de anteras inducidos en medios Papa-2 o N6m.

Tipo de arroz	Medio	Genotipo	Anteras cultivada	Callos/ antera (%)	Plantas verdes/antera (%)
Indica	Papa-2	100	592,500	0.01 (0.002)	0.01 (0.005)
	N6m	51	275,250	4.3 (0.6)	0.2 (0.05)
Japónica secano	Papa-2	74	778,500	0.1 (0.03)	0.1 (0.01)
	N6m	39	165,500	28.7 (3.4)	0.9 (0.2)
Indica X Japónica secano	Papa-2	127	1,009,000	0.2 (0.01)	0.5 (0.06)
	N6m	72	397,500	14.4 (1.5)	0.7 (0.1)
Indica X Japónica riego	Papa-2	10	39,100	38.4 (5.2)	3.7 (1.2)
	N6m	89	240,750	91.5 (5.6)	6.6 (0.2)

Los numeros en paréntesis corresponden al error estándar (desviación estándar/n^{1/2}).

Cuadro 2. Composición de los medios N6, N6m, NL y MS.

Compuesto	N6	N6m	NL	MS
(mg/l) NH ₄ NO ₃				1650
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	231.5	231.5	
KNO ₃	2830	2830	3134	1900
KH ₂ PO ₄	400	540	540	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	3.7	185	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	166	150	440
H ₃ BO ₃	1.6	1.6	6	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.4	4.4	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	1.5	10	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O			0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O			0.025	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O			0.025	0.025
KI	0.83	0.83	1	0.83
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8
M-inositol				100
Tiamina-HCl	1	1	2.5	0.1
Acido nicotínico	0.5	0.5	2.5	0.5
Piridoxina-HCl	0.5	0.5	2.5	0.5
Glicina	2	2	2.5	2
2,4-D		2	2	
Picloramo		0.07	0.07	
ANA				1
Kinetina		0.5	0.5	4
AgNO ₃			10	
(g/l) Sucrosa	50	50		30
Maltosa			50	
Phytigel				1.8

Cuadro 3. Genotipos¹ utilizados para optimizar las condiciones de inducción de callos y regeneración de plantas.

Indica		Japónica
Amistad	Iniap 415 P5446-6-6-6-1-13	Araguaia Oryzica Sabana 6
Anayansi	Inti Sinaloa A68	Bluebelle Rustic
BR-IRGA 409	IR 42	Buli Inia Tox 1011-4-1
CEA 1	IR 43	Ceysvoni
Centa A5	Irat 124	CT 6241
Cica 8	Juma 58	CT 7244
Cimarrón	Morelos	Diamante
CR 1821	Oryzica 1	El Paso 144
GZ 864	Cica 8	El Paso 227
Icta Montagua	Oryzica Llanos 5	Guarani

¹ El tipo de arroz fue determinado de acuerdo a la clasificación isoenzimática según Glaszmann (1987).

Cuadro 4. Regeneración de plantas verdes a partir de callos de anteras inducidos en medio NL con 5% maltosa y 10 mg/l AgNO_3 .

Tipo de arroz	Genotipo	Callo/antera (%)		Plantas verdes/antera (%)	
		Papa-2	NL	Papa-2	NL
Indica	Cica 8	0.5	6.4	0.0	0.20
	Oryzica 1	0.8	21.4	0.08	0.35
	BR-Irga 409	0.0	8.9	0.0	0.93
	Inti	0.0	4.4	0.0	1.23
	GZ 864-2-3-1	0.2	2.4	0.0	0.10
	P 5446-6-6-6-1-13	3.4	39.3	0.39	4.44
	IR 8	0.0	0.9	0.0	0.09
	IR 43	0.0	30.6	0.0	0.46
	Media	0.61	14.3	0.6	0.98
	Error standard	0.41	5.1	0.05	0.52
	Coef. Var.	190	100	233	149
Japónica	CT 6241-17-1-5-1	14.7	64.8	1.59	15.9
	Ceysvoni	5.4	2.4	0.005	0.02
	Tox 1011-4-1	7.1	13.9	0.13	0.76
	CT 7244-9-2-1-52-1	17.4	30.1	0.0	1.69
	Diamante	51.5	100.0	0.56	5.50
	Media	19.2	39.9	0.46	4.77
	Error standard	8.4	17.9	0.30	2.94
	Coef. Var.	98	95	147	138

Promedio de al menos 3 replicaciones cada una de 3250 anteras / genotipo / tratamiento.

3. UTILIZACIÓN DEL CULTIVO DE ANTERAS EN MEJORAMIENTO

Un gran número de estudios teóricos y experimentales han sido realizados para definir las condiciones en las cuales el mejoramiento con DH puede ser de utilidad, particularmente para el desarrollo de variedades de cultivos autógomos. Estos estudios indican que el CA presenta ventajas y desventajas para su aplicación en mejoramiento. A continuación se presenta un análisis de las implicaciones genéticas y prácticas del uso del CA, y algunos ejemplos en el desarrollo de líneas de mejoramiento adaptadas a los diferentes ecosistemas de arroz de América Latina y del Caribe.

3.1 Ventajas

Puesto que cada grano de polen proveniente de plantas híbridas F_1 representa un gameto diferente, la población de las plantas DH exhibe la variabilidad genética que se encontrará en una generación F_2 , con la ventaja adicional que cada individuo tendrá un genotipo homocigoto, es decir, fijado definitivamente.

3.1.1 Ahorro en tiempo

Cuando se aplica la técnica del cultivo de anteras se pueden obtener líneas homocigotas en sólo 8-9 meses, contabilizados a partir de la siembra de una generación híbrida F_1 o F_2 . Mientras que esta misma estabilidad se logra generalmente en el sistema estándar de mejoramiento después de 5 a 6 generaciones de autopolinización. Por consiguiente, las evaluaciones en ensayos de rendimiento pueden hacerse mucho antes.

Variedad A x Variedad B

F ₁	{	Siembra
Anteras		2,5 meses
Callos		1,5 meses
Plantas regeneradas (R ₁)	{	1,0 mes
Progenie de R1 (R ₂)		4,0 meses
Total		9,0 meses

3.1.2 Economía

Al eliminarse las siembras y evaluaciones de líneas segregantes se obtiene también ahorro en mano de obra, tierra y esfuerzos. Martínez *et al.*, 1993 compararon los costos incurridos en el desarrollo de variedades a través del CA y del método pedigrí y encontraron que mediante el CA se pueden reducir los costos entre US\$53.000 y US\$91.000 por variedad, dependiendo del genotipo y del ecosistema considerado. Esto representa un ahorro aproximadamente de un 30% de los costos con respecto al método estándar (Cuadro 7).

3.1.3 Eficiencia de selección

El CA aumenta la eficiencia de selección tanto para caracteres cualitativos como para los cuantitativos, lo cual facilita la identificación de los genotipos superiores en comparación con la selección efectuada durante las generaciones tempranas en el sistema de pedigrí (Snape, 1989). La selección de individuos en una población F₂ es

más efectiva cuando los alelos son dominantes, mientras que si los alelos deseables son recesivos solo están presentes en una proporción $(1/4)^n$. Por el contrario, en una población de DH los genotipos recesivos tienen una frecuencia de $(1/2)^n$. Esto facilita la selección de genes recesivos deseables ya que no existe el enmascaramiento de los genes recesivos por los dominantes. Teóricamente, si los padres del híbrido tienen "n" pares de alelos recombinando independientemente, para seleccionar un genotipo de una población F_2 la eficiencia de la selección debe ser $(1/2)^{2n}$ en el mejoramiento con doble haploides y $(1/2)^n$ en el mejoramiento con diploides. Esto indica que la eficiencia de selección en el mejoramiento con DH es 2^n veces más alta que aquella del mejoramiento con diploides (Baenziger y Schaeffer, 1983).

Con base en esto algunos cultivares han sido seleccionados eficientemente a partir de poblaciones más pequeñas de plantas derivadas del polen de arroz. Se ha estimado que cerca de 150 plantas provenientes de cultivo de anteras de una F_1 son suficientes, en vez de 4.000 - 5.000 plantas F_2 , para los propósitos de selección de los genotipos deseables (Shen *et al.*, 1983). Tomando los niveles de respuesta obtenidos con el medio NL (Cuadro 4), es posible producir 150 DH cultivando 32.600 anteras índica y 8.427 anteras japónicas por cruzamiento.

El aumento en la eficiencia de la selección mediante el cultivo de anteras se cuenta como una ventaja, especialmente cuando la variación de dominancia (variación debida a la desviación del heterocigoto a partir del valor medio parental y que no está presente en una línea homocigota) es significativa (Raina, 1989). Griffing (1975) demostró que las varianzas fenotípicas para poblaciones diploides y DH son:

$$\begin{array}{ll} \text{Diploides:} & V_{P2} (D) = V_{A2} + V_{D2} + V_{E2} \\ \text{Doble haploides:} & V_{P2} (H) = 2V_{A2} + V_{E2} \end{array}$$

donde V_{P2} es la varianza fenotípica (variación debida a las diferencias entre líneas), V_{A2} es la varianza genética aditiva (variación debida a diferencias entre homocigotos en un solo locus), V_{D2} es la varianza genética de dominancia (descrita anteriormente) y V_{E2} es la varianza ambiental (variación debida a efectos ambientales).

En el mejoramiento convencional, las líneas en generación temprana (F_2 - F_4) muestran diferencias fenotípicas para las cuales contribuyen los efectos aditivo y de dominancia. En contraste, las líneas haploides dobladas solamente muestran varianza aditiva, por lo tanto alta heredabilidad debido a la eliminación de los efectos de dominancia. Así, comparados con la población F_2 , menos plantas haploides dobladas se requieren para propósitos de selección de los recombinantes deseados (Raina, 1989). A este respecto Baenziger y Schaeffer (1983), citaron el ejemplo hipotético de un cruce segregante para tres genes recesivos y para tres genes dominantes. Si los tres genes recesivos están siendo seleccionados, $1/8$ de la población de dihaploides será seleccionada, con respecto a un $1/64$ de la población F_2 . Las líneas seleccionadas en ambos casos son homocigotas. En el caso que se haga selección para los tres genes dominantes, $1/8$ de la población de dihaploides se seleccionará mientras que $27/64$ de la población F_2 será seleccionada. En la población de dihaploides, todos los individuos son homocigotos, pero en la población F_2 de los $27/64$ seleccionados con base al fenotipo, solamente $1/64$ es homocigoto. Si una familia segregante es seleccionada en la generación F_3 , más evaluaciones serán necesarias en la F_4 y en las generaciones más avanzadas para encontrar los homocigotos deseados.

En las generaciones tempranas del sistema pedigrí la selección de caracteres cuantitativos es difícil debido a la presencia de dominancia, segregación intrafamiliar y competencia entre plantas. Por el contrario, en el sistema DH no existe dominancia y además hay el doble de la varianza aditiva entre los productos recombinantes de un cruzamiento con respecto a las F_2 y F_3 equivalentes. Aún en caracteres con dominancia completa, la F_3 no exhibe tanta varianza genética total como en una población DH y la varianza aditiva es solo la mitad. La variación ambiental entre plantas F_2 es probablemente mayor que entre F_3 o DH; además, se puede incrementar el número de repeticiones con el fin de disminuir la varianza ambiental en los DH y de esta manera evaluar con mayor precisión el valor individual de cada DH (Snape, 1989). Por otra parte, las generaciones F_3 o F_4 exhiben diferencias genéticas entre individuos dentro de las parcelas, en tanto que en las parcelas DH los individuos dentro de cada línea son genéticamente idénticos; esto facilita la selección visual de

las mejores líneas en generaciones tempranas. Según Snape (1989) la heterocigosis y segregación dentro de las parcelas de pedigrí también afectan el grado en el cual la selección de individuos en una generación resulta en la respuesta deseada en su progenie en la generación siguiente. Por el contrario, las líneas DH guardan una correlación igual a la unidad entre generaciones al ser genéticamente idénticas.

Estas propiedades genéticas únicas encontradas en la población DH comparada con generaciones tempranas generadas por métodos convencionales permiten efectuar una mejor discriminación entre cruzamientos y entre genotipos dentro de cruzamientos, y por consiguiente aumentan la probabilidad de avance genético y éxito en un programa de mejoramiento (Griffing, 1975; Snape, 1989). Por ejemplo, Jansen (1992) estimó las probabilidades de obtener un genotipo determinado a partir de un cruzamiento entre dos padres homocigotos; para el caso de un carácter controlado por cinco loci no ligados encontró que se deben producir 95 líneas DH con el fin de garantizar que un genotipo específico esté presente por lo menos una vez con una probabilidad del 95%. En contraste, en el caso de pedigree se necesitarían evaluar 4⁵ plantas, es decir, un total de 1024 plantas para encontrar un genotipo con los cinco loci (Briggs y Knowles, 1967).

3.2 Desventajas

Entre las más comúnmente citadas se tienen su alta dependencia del genotipo, el rango de la variabilidad genética recuperada, el limitado número de recombinaciones meióticas y el costo del laboratorio.

La producción de DH a través del CA es mucho mayor a partir de las japónicas que de las índicas; tal vez ello se deba no sólo a la mejor respuesta de las japónicas sino además al hecho de que la gran mayoría de los laboratorios en sus investigaciones han utilizado como modelo a las japónicas. No obstante, trabajos recientes realizados en nuestro laboratorio muestran que es posible obtener un incremento substancial en la respuesta de las índicas (Cuadro 4 y Figura 8) (Lentini *et al.*, 1993).

En cuanto a la variabilidad genética presente en una población DH, varios trabajos indican que el rango de segregación obtenido en DH derivados a partir de la F_1 es similar al observado en poblaciones F_2 (Raina, 1989). Recientemente, un estudio realizado por nuestro programa (Pérez-Almeida *et al.*, 1993) comparó la diversidad genética obtenida en piricularia de la hoja (BI) y del cuello (NBI) en poblaciones de DH y líneas S_2 obtenidas a partir de 11 cruzamientos dobles utilizados en un programa de selección recurrente. Se evaluaron 10 líneas DH y 10 líneas S_2 por cada cruzamiento, escogidas al azar. Se encontró que el rango de variación para BI, NBI y otras características agronómicas fue mayor en el caso del CA. Esto sugiere que CA produjo extremos de variación no encontrados en el caso del pedigrí.

Con el fin de maximizar el ahorro en tiempo, las plantas F_1 son generalmente procesadas por CA. No obstante en este caso, solo se permite un ciclo de recombinación entre los genomioms parentales antes de la fijación de los genotipos, lo que se ha indicado como una desventaja con respecto a los métodos estándar de mejoramiento para la recuperación de ciertos recombinantes deseables. Sin embargo, hay estudios que sugieren que tales diferencias solamente son importantes cuando se están seleccionando caracteres en ligamento. Bruzzone (1991) estudió el comportamiento de progenies derivadas a partir del CA de plantas F_1 y F_2 provenientes de cuatro cruzamientos entre cultivares de riego y secano. Encontró que los DH originados a partir de la F_1 fueron superiores en términos de fertilidad y peso de 1.000 granos; y no hubo diferencias entre estas generaciones para los otros parámetros estudiados como altura, floración, número de granos por panícula y número de panículas por m^2 . En el caso de existir ligamento entre caracteres de importancia, se recomienda procesar la F_2 para incrementar la probabilidad de romper los ligamentos antes de utilizar el CA (Snape y Simpson, 1981).

El costo inicial para establecer un laboratorio de CA incluyendo la infraestructura, equipo y reactivos puede ser relativamente alto. En un estudio económico sobre el uso del CA en el desarrollo de variedades de arroz, Martínez *et al.*, (1993) estimaron que un laboratorio con una capacidad para sembrar 5.500 anteras/semana, el laboratorio más pequeño y económicamente mas apropiado para la producción masiva de DH para mejoramiento, tiene un costo inicial de aproximadamente US\$45,000 y un costo operacional de US\$2,000 por semestre. Sin embargo, al

analizar la relación costo/beneficio del uso del CA en un programa de mejoramiento encontraron que su implementación puede reducir el costo de obtención de una variedad entre US\$53,000 y US\$91,000, dependiendo del genotipo y del ecosistema considerados. Esta reducción representa un 30% de ahorro en comparación con el sistema de pedigrí.

Con frecuencia se cuestiona la estabilidad y uniformidad de las plantas obtenidas por CA. Sin embargo, investigaciones realizadas por varios investigadores indican que más del 90% de los DH son uniformes y estables; aproximadamente un 8% de los DH presentan variaciones pequeñas en algunos caracteres de importancia agronómica, en tanto que el 0.7% presenta variaciones grandes (Raina, 1989). La estabilidad se mantiene a través de varias generaciones. La experiencia acumulada en CIAT desde 1986 concuerda con estas observaciones. Las variaciones o segregación observadas en los DH generalmente son ocasionadas por:

- Variación somática, es decir que el DH se obtiene a partir del tejido somático (la pared de la antera, el filamento, etc.), el cual es diploide y puede ser heterocigoto, y no de una microspora o célula haploide.
- Mutación inducida durante el proceso de formación del callo. La inducida antes del doblamiento cromosómico aparecerá como homocigota mientras que la inducida después será heterocigota.
- Hibridación espontánea. Generalmente las plantas R_1 presentan cierto grado de esterilidad, lo cual bajo condiciones de campo facilita la polinización cruzada resultando en un híbrido.

3.3 Evaluación, selección, y algunos ejemplos de sus usos en mejoramiento

Si bien las plantas DH son homocigotas y por consiguiente pueden pasar directamente a ensayos de rendimiento, no han sido evaluadas y seleccionadas previamente por otras características agronómicas como lo son resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, calidad, tolerancia a distintos problemas

edáficos, y adaptación a un ecosistema determinado. Por consiguiente, la población DH representa el punto de partida para que el fitomejorador empiece su ciclo de evaluación y selección. Este proceso se diferencia bastante del que se sigue con el material genético desarrollado a través de los métodos estándar de mejoramiento, ya que generalmente cuando éstos llegan a la generación F_5 - F_6 ya han sido evaluados y seleccionados por una serie de características deseables. En otras palabras, el hecho de que se obtengan líneas DH no quiere decir que de por sí son variedades mejoradas superiores.

El cultivo de anteras ha demostrado ser una técnica útil para acelerar la introgresión de características deseables en poblaciones de mejoramiento. En la literatura se encuentran reportadas un total de 42 variedades liberadas mediante este método en un lapso de 16 años (1975-1991) (Cuadro 5).

En nuestro programa, el cultivo de anteras ha facilitado y acelerado el desarrollo de líneas con características específicas para determinados ecosistemas latinoamericanos. Por ejemplo, Chile requiere variedades tolerantes a bajas temperaturas, precoces y de buena calidad molinera y culinaria. A estas latitudes sólo es posible sembrar arroz una vez al año, esto implica que para obtener una variedad mejorada por los métodos estándar de mejoramiento se requieran de 12 a 15 años. Utilizando el cultivo de anteras el proceso se reduce significativamente. En 1985 cruzamientos triples fueron realizados entre los cultivares chilenos Diamante y Quillas (adaptadas a bajas temperaturas) con la variedad Lemont (de alta calidad de grano), procedente de Estados Unidos. Estos cruzamientos fueron procesados por cultivo de anteras y seleccionados por el método pedigree. Una alta esterilidad fue observada en las generaciones F_1 y F_2 , produciéndose solamente 234 familias F_2 , mientras que por cultivo de anteras se obtuvieron 941 líneas R_2 . Estas líneas fueron evaluadas y seleccionadas por tolerancia al frío, calidad, precocidad, rendimiento y adaptación en Chile, y se identificaron 18 como promisorias que luego pasaron a pruebas demostrativas en fincas de agricultores. Este material, además, puede servir de base para generar germoplasma adecuado para otras regiones, tales como Río Grande del Sur, Uruguay, Cuba, etc., en donde el arroz se ve afectado por temperaturas bajas en ciertas épocas.

El cultivo de anteras nos facilita el proceso, ya que las líneas así obtenidas son homocigotas, y los países colaboradores a los que se las enviamos pueden sembrarlas inmediatamente en ensayos preliminares de rendimiento, para evaluarlas y seleccionarlas bajo sus propias condiciones, de acuerdo con los problemas locales y de esta forma acortar el tiempo requerido para desarrollar una variedad.

Igualmente, en el trópico el cultivo de anteras abre nuevas perspectivas para la obtención más rápida de variedades para las condiciones de secano en suelos ácidos de sabana, donde la distribución de las lluvias sólo permite una cosecha anual. Nuestro programa ha desarrollado líneas DH que presentan el tipo de planta y calidad de grano de riego con raíces tipo secano asociadas con tolerancia a sequía, a partir de cruzamientos entre variedades de riego y secano (Cuadro 6, CT 9586-14-CA7).

Casi siempre el porcentaje de esterilidad es muy alto en cruzamientos amplios como lo son entre materiales indica y japónica, y del tipo riego y tipo secano. A través del cultivo de anteras ha sido posible obviar en parte este problema; por ejemplo, en CIAT se han obtenido DH fértiles a partir de cruzamientos estériles entre cultivares de riego y secano.

Nuestro programa también viene utilizando el cultivo de anteras para acelerar la diversificación y ampliación de la base genética presente del germoplasma de arroz en América Latina, y para facilitar el mapeo de genes de importancia como los de resistencia al virus de la hoja blanca, y resistencia a piricularia por RFLP y RAPIDS.

Cuadro 5. Variedades de arroz desarrolladas con cultivo de anteras.

Variedad	Liberada	País	Características
Late Keng 959	1975	China	Alta productividad
Xin Xion	1975	China	ND
Hua Yu 1	1976	China	Alto rendimiento en suelos ácidos
Hua Yu 2	1976	China	ND
Xin Xun	1976	China	Alto rendimiento
Zhengen 66	1979	Chinas	Tolerante al frío, resistente a piricularia, buena calidad de grano, alto rendimiento, resistente a Xantomonas
Tafene 1	1980	China	ND
Zong Hua 2	1980	China	ND
Zong Hua 6	1980	China	ND
Zong Hua 10	1980	China	ND
Zong Hua 11	1980	China	ND
Zong Hua 12	1980	China	ND
Huahanzhao	1981	China	Temprana, buena calidad de grano, tolerante al frío, resistente a enfermedades
Zhe Keng 66	1982	ND	Resistente al añublo bacterial de la hoja, alto rendimiento, buena calidad de grano
Zong Hua 8	1983	China	Alto rendimiento, resistente a piricularia
Zong Hua 9	1983	China	Alto rendimiento, resistente a piricularia
Huajian	1983	China	Alto rendimiento, resistente a piricularia
Nanhua 5	1983	China	Alto rendimiento
Nanhua 11	1983	China	Alto rendimiento
Quianhua 1	1983	China	Alto rendimiento
7706	1983	China	ND
369	1983	China	ND
Yinghua 2	1983	China	ND
Hwaseongbyeon	1985	Korea	Temprana, enana, alto rendimiento, resistente a piricularia, añublo bacterial, al rayado de la hoja, tolerante al frío, y buena calidad de grano

Variedad	Liberada	País	Características
Huayu 15	1985	ND	Alto rendimiento
Hirohikari	1986	Japón	Temprana, resistente al vuelco, buena calidad de grano
Hirohonami	1986	Japón	Temprana, resistencia a piricularia, alto rendimiento, buena calidad de grano
Milyang 90	1987	Korea	Resistente a insectos y al virus del rayado, buena calidad de grano
Hwajinbyeo	1988	Korea	Madurez medio-tardía, enana, alto rendimiento, resistente a piricularia, añublo bacterial, al rayado de la hoja, tolerante al frío, y buena calidad de grano
Hua-03	1988	China	Temprana, alto contenido proteico, enana, alto rendimiento
Hua Pei 528	1989	ND	ND
Marianna	1989	ND	Resistente al añublo bacterial de la hoja, alto rendimiento, buena calidad de grano
Hwayeongbyeo	1991	Korea	Madurez medio, enana, alto rendimiento, resistente a piricularia, añublo bacterial, al rayado de la hoja, tolerante al frío, y buena calidad de grano
Joiko 394	ND	Japón	Tolerante al frío, resistente a piricularia, buena calidad de grano, alto rendimiento
Dan 209	ND	China	Resistente a piricularia y Xanthomonas
Hua Pei 35	ND	ND	ND
77001	ND	ND	ND
Hua Pei 15	ND	ND	Alto rendimiento, resistente a enfermedades, buena calidad de grano
Hua Pei 56	ND	ND	Porte alto, resistente a insectos, buena calidad de grano
88-26	ND	ND	Temprana, resistente al vuelco, alto rendimiento.
Hua Pei 438	ND	ND	Resistente al añublo bacterial de la hoja, alto rendimiento, buena calidad de grano.
Fan 5	ND	ND	Resistente al añublo bacterial de la hoja, alto rendimiento, buena calidad de grano

ND = no documentado

Cuadro 6. Características agronómicas de doble haploides seleccionados de un híbrido seco X riego.

Genotipo	Maduración (días)	Altura (cm)	Amilosa (%)	Rendimiento kg/ha	Tipo de planta/raíces
Padres					
Oryzica 1	130	85	30	7612	irrigado, raíces superficiales
CT6241-17-1-5-1	115	80	21	7712	secano, raíces profundas
F2-doble haploides					
CT9586-283-CA1	115	80	22	6960	irrigado, raíces gruesas
CT9586-14-CA7	130	90	31	7630	irrigado, raíces profundas
CT9586-428-CA3	135	75	30	2323	irrigado, raíces superficiales

Amilosa (%) : IR8 = 33, Blubonet 50 = 26, Colombia 1 = 21

4. IMPLICACIONES ECONÓMICAS DEL USO DE CULTIVO DE ANTERAS EN EL DESARROLLO DE VARIEDADES

Muy poco se sabe de las implicaciones económicas del su uso del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades. Información que es necesaria para facilitar la toma de decisiones para la incorporación del CA como una herramienta en mejoramiento.

Un análisis económico de costo y beneficio fue realizado por nuestro programa, donde se comparo el desarrollo de variedades mediante CA con el método pedigrí (MP), comúnmente utilizado en el mejoramiento de arroz (Martínez *et al.*, 1993). La respuesta al cultivo de anteras de 570 genotipos adaptados a diversos ecosistemas, y los costos fijos y variables asociados con la infraestructura y varios niveles de actividad para producir al menos una línea por CA que reuniera todas las características necesarias para su liberación como variedad, fueron utilizados como referencia. El análisis incluyo cinco niveles operacionales de laboratorio (5.500, 50.000, 100.000, 150.000 y 200.000 siembra de anteras/semana) para optimizar los ahorros. Los costos por el uso del cultivo de anteras fueron basados tomando como referencia nuestro laboratorio, el cual requirió una inversión inicial de US\$60.000 (infraestructura, equipo y vidriería), con una capacidad de procesamiento de 150.000 anteras/semana con 5 técnicos y un asistente de investigación, y opera con un presupuesto de US\$ 11.000/semestre que incluye salarios del personal de apoyo, 20% del tiempo de un supervisor, reactivos, y costos de depreciación. El desarrollo de las variedades Oryzica Llanos 4 y 5 en siete años para condiciones tropicales irrigadas fue utilizada como referencia para los costos del desarrollo de variedades por MP. Los estimados incluyeron los costos para la producción de plantas desde la F1 hasta la F6; ensayos de campo de rendimiento, regionales y comerciales; y salarios. Los cálculos resultaron en un total de US\$ 204.000 por variedad por MP para condiciones irrigadas tropicales. Para condiciones irrigadas templadas (Japónica riego) y seco (1 cultivo/año, 12 años) los costos fueron incrementados en un 71% con respecto a condiciones irrigadas tropicales (Índica) (2 cultivos/año, 7 años), es decir, a un total de US\$349.799 por variedad por MP.

El estudio indicó que CA puede reducir los costos entre US\$53.000 (Indica X japónica seco) y \$91.000 (japónica riego) por variedad desarrollada, dependiendo del genotipo y ecosistema seleccionado. Estos costos representan ahorros hasta aproximadamente un 30% con respecto a MP (Cuadro 7). El nivel operacional óptimo para obtener el mayor ahorro, varió desde 5.450 siembra de anteras/semana para Japónica riego a 150.000 siembra de anteras/semana para Indica X japónica seco. Con estos niveles operacionales, es posible en 3 meses y 7 1/2 meses sembrar el número de anteras requerido para desarrollar una variedad para condiciones irrigadas templadas (japónica riego) y los otros ecosistemas, respectivamente. Este análisis sugiere que la implementación de CA es una alternativa atractiva para el desarrollo de variedades de arroz.

Cuadro 7. Costos totales estimados para obtener una variedad con cultivo de anteras.

Tipo de arroz	CA (US\$)	MP (US\$)	Ahorro con CA (US\$)	Ahorro respecto a MP (%)	Actividad óptima (anteras/semana)
Indica	144.852 ^{a/}	204.561	59.709	29	60.000
	144.042 ^{b/}	204.561	60.519	30	34.000
Japónica riego	258.907 ^{a/}	349.799	90.892	26	5.450
Japónica seco	292.797 ^{a/}	349.799	57.002	16	117.000
Indica X Japónica seco	296.391 ^{a/}	349.799	53.408	15	150.000

Callos inducidos en: a/ medio N6m y b/ medio NL, respectivamente.

5. PROCEDIMIENTO GENERAL PARA EL CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ

Desde el punto de vista técnico, el cultivo de anteras consiste en colocar las anteras, que son las que contienen los granos de polen inmaduros, en un ambiente que sea y pueda ser mantenido en condición estéril, y proveer al material de las sustancias químicas y de los regímenes de temperatura y luz apropiados para el desarrollo del callo y posterior diferenciación de las plantas.

Esta sección contiene el protocolo completo utilizado actualmente en nuestro laboratorio, desde la siembra de las anteras hasta la evaluación en el campo de las plantas regeneradas. Los protocolos aquí descritos estarán sujetos a las modificaciones necesarias de acuerdo a las investigaciones realizadas.

5.1 Siembra del material donante de las anteras

La semilla de las plantas F_1 o F_2 se siembra en bandejas con suelo estéril o en eras o camas donde permanecen durante 20 a 25 días.

Para esterilizar el suelo inicialmente se homogeniza y se le adicionan los correctivos físicos y químicos necesarios; posteriormente se coloca en un vagón esterilizador a vapor a una temperatura de 70 a 80°C por espacio de hora y media a dos.

Luego se transplantan al campo a una distancia de siembra de 40 cm entre surcos y 30 cm entre plantas. Estas distancias permiten un buen desarrollo a las plantas y facilitan el desplazamiento dentro del cultivo para la selección y cosecha de las panículas (Figura 13). Este material recibe todas las prácticas normales de manejo del cultivo del arroz (Tascón y García, 1985).

5.2 Selección de panículas

La selección de las panículas de donde se extraerán las anteras, se realiza a los 60 <

70 días (de acuerdo con el ciclo vegetativo del material genético) después del trasplante, en la etapa de embuchamiento. Esta se caracteriza por la diferenciación de las espiguillas en la inflorescencia y su crecimiento dentro de la vaina de la hoja bandera. De acuerdo con los objetivos propuestos se seleccionan las mejores plantas y de ellas se toman de 2 a 3 panículas, teniendo en cuenta su estado óptimo fitosanitario, o sea que está completamente sana. Las panículas se cosechan conservando el entrenudo y la vaina de la hoja, para protegerlas de contaminación con patógenos del campo. Para obtener una mayor respuesta, las panículas deben ser recolectadas preferiblemente en días soleados antes de las 10:00 a.m. Las panículas son colocadas en bolsas plásticas justo después de cosechadas para evitar su deshidratación. En el laboratorio, son limpiadas externamente con etanol al 70%, colocadas en una bolsa limpia, e incubadas a 8-10°C por 7-8 días.

Es aconsejable seleccionar aproximadamente 100 panículas por cada cruzamiento, teniendo en cuenta las siguientes características morfológicas. La distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas debe estar en un rango de 4 a 8 cm (Figura 14), aunque puede variar según el genotipo de la planta y las condiciones ambientales en que se desarrolle la planta. Esta distancia está asociada con un estado de desarrollo de las microsporas de uninucleado medio y/o tardío, óptimo para el cultivo de anteras. Este estado de desarrollo está altamente correlacionado con flores de glumas amarillo verdoso y consistencia frágil, criterios que facilitan la selección en el momento de la siembra de las anteras.

Para mayor precisión y cuando el tiempo lo permite, la observación microscópica de los granos de polen ayuda a determinar en cuál estado de desarrollo se encuentra el polen.

5.3 Esterilización superficial de las panículas

Las panículas previamente tratadas a 8-10°C por 7-8 días, se sacan de la vaina de la hoja y se toman de la base, sosteniéndolas en forma invertida para cortar con tijera el primer tercio que se desecha, y aprovechar solo el tercio medio, evitando así el

contacto de la mano con esta parte de la inflorescencia (Figura 15). Luego se sumergen en etanol al 70% durante 1 minuto.

Posteriormente, se sumergen las espiguillas durante 3 minutos en un recipiente estéril, que contiene una solución de hipoclorito de sodio al 10% (10 ml clorox comercial con 5.25% NaOCl de compuesto activo en 90 ml H₂O) con Tween 80 como agente dispersante (3 gotas/100 ml de solución), y acidificada con 5 gotas de HCl 1 N por cada 100 ml de solución, para aumentar la efectividad del hipoclorito. Luego se lavan 4 a 5 veces en agua destilada estéril.

Las panículas desinfestadas se colocan en una caja de petri estéril con papel filtro humedecido en agua estéril. Esta operación debe realizarse en un lugar limpio, sin corrientes de aire o polvo y preferiblemente en un gabinete de flujo laminar de aire estéril.

5.4 Determinación del estado de desarrollo del polen

Es aconsejable determinar el estado de desarrollo en que se encuentra el polen al iniciar un proyecto de cultivo de anteras, y sobre todo, cuando aún no se ha adquirido la práctica suficiente en la selección de las panículas en el campo. Esto facilita precisar las características morfológicas indicadoras del estado óptimo para el cultivo de anteras de cada genotipo en estudio, las cuales pueden variar según la condición ambiental donde se desarrollen las plantas donantes de las anteras. Este análisis citológico se realiza mediante la siguiente técnica:

Se fijan las anteras sumergiendo las flores durante 24 horas a temperatura ambiente en 3 partes de etanol absoluto y una parte de ácido acético glacial, al cual se le agrega cloruro férrico al 0.5%. Cuando se necesita hacer una determinación rápida, las flores se pueden colocar en la solución fijadora en baño de María a 70°C por 45 minutos.

Se trituran las anteras con la cabeza de un clavo de hierro sobre un porta objeto con 2 a 3 gotas de acetocarmín al 0.5%.

Por último se remueve el exceso de acetocarmín, se coloca el cubre-objetos, y se observa al microscopio con la lente 40X - 100X.

5.5 Aislamiento de las anteras

Con el fin de aislar las anteras de los filamentos, se cortan las flores por su base (Figura 16). Posteriormente se toman 4-5 flores/por vez con una pinza por el extremo no cortado, y se golpea contra el borde del frasco que contiene el medio de cultivo para la inducción de callos (medio de inducción) (Figura 17). El frasco es de 4 cm de diámetro y 7 cm de alto (frasco de compota para bebé) y contiene 10 ml de medio nutritivo. En cada frasco se pueden cultivar hasta 50 flores, y teniendo en cuenta que por cada flor caen al medio entre 3 y 4 anteras, se siembran de 150 a 200 anteras por frasco. Después de la siembra los frascos se tapan con papel aluminio asegurándolo alrededor con papel parafilm adherente, o tapas plásticas Magenta.

Puesto que una panícula generalmente provee 20 flores de las cuales salen un promedio de 70 anteras, por cada 100 panículas provenientes de una generación híbrida F_1 o F_2 se pueden cultivar aproximadamente 7.000 anteras (40 frascos).

5.6 Cultivo de las anteras y formación de microcallos

Tan pronto las anteras hayan sido sembradas en el medio de cultivo, los frascos previamente tapados se colocan en un lugar donde permanecen en la oscuridad y a una temperatura entre 24 y 27°C durante 4 a 6 semanas (Figura 18). Bajo estas condiciones ocurre la división mitótica de las microsporas, la cual conduce a la formación de los microcallos. Estos empiezan a aparecer alrededor de los 20 días de cultivo (Figura 19), proliferando entre los 35-45 días y alcanzando un tamaño de 1-2 mm, apropiado para ser transferidos al medio de regeneración a los 40 a 50 días. De las 7000 anteras sembradas entre un 14 a 40% se desarrolla esporfíticamente,

produciéndose alrededor de 980 a 2800 callos. De estos callos se regeneran alrededor de 70 a 334 plantas R_1 , dependiendo de la respuesta del genotipo a la técnica.

5.7 Transferencia de los microcallos al medio de regeneración

En esta fase, los microcallos se transfieren a frascos más grandes (de 10 x 10 cm), los cuales contienen un medio de cultivo que promueve la regeneración de plántulas (medio de regeneración). La transferencia de los callos se realiza vaciando un poco el medio líquido de inducción que contiene los microcallos, y utilizando una espátula o bisturí para su manipulación.

Asumiendo que cada microcallo ha sido originado por un grano de polen inmaduro, es conveniente mantenerlos separados aproximadamente 0,5 cm. Para lograrlo, la transferencia se hace en forma individual o en grupo para después separarlos dentro del medio. Esta última alternativa es más eficiente cuando el volumen de material es grande. Para garantizar una alta diferenciación de plantas, es aconsejable cultivar un máximo de 10-15 callos por frasco por 150 ml medio.

Durante la incubación los frascos deben mantenerse a una temperatura de 24 a 26°C. Inicialmente son colocados en una estantería con luz indirecta por una semana. Luego son llevados a luz directa con una iluminación de 80 a 100 $\mu E \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ que se logra con lámparas fluorescentes tipo luz día con alto porcentaje de color azul, y expuestas a un fotoperíodo de 16 horas (Figura 20).

5.8 Adaptación de las plántulas para el trasplante a suelo

A los 30-40 días, cuando las plantas han alcanzado suficiente desarrollo foliar y radicular (Figura 21), se retiran manualmente del frasco para después lavar con agua sus raíces con el fin de eliminar los residuos de callos y medio, cortar a la mitad la lámina foliar y sumergir sus raíces en agua por 1 ó 2 días, operación que se realiza en el laboratorio.

Luego se llevan las plantas al invernadero donde se transplantan en bandejas con suelo estéril y fangueado o sobresaturado, y permanecen a una temperatura de 28 a 30°C y protegidas del sol directo para evitar su deshidratación (Figura 22). Después de 8 días se fertilizan las plantas con una mezcla que contiene 30% de N, 7% de P_2O_5 y 6% de K, aplicando 4 gramos de fertilizante NPK por litro de agua, y posteriormente se pasan a una casa de malla en las mismas bandejas.

A las dos semanas las plantas son transplantadas al campo donde reciben el manejo apropiado al cultivo de arroz (Figura 23). Cada planta regenerada R_1 es potencialmente un genotipo diferente y se maneja con ese criterio.

5.9 Evaluación de las plantas R_1 , líneas R_2 y selección de la semilla R_3

La evaluación de las plantas R_1 se realiza de acuerdo con los objetivos del programa de mejoramiento. Al realizar la selección de las plantas regeneradas (R_1), se debe tener en cuenta que éstas han pasado por diferentes estreses en su desarrollo y debido a esto es posible que ciertas características fenotípicas tales como altura, floración, macollamiento, fertilidad, y centro blanco, pueden verse afectadas y no expresarse en forma normal. Por consiguiente los datos que se tomen en las plantas regeneradas R_1 deben interpretarse con cuidado.

La semilla de las plantas R_1 se siembra para pruebas de uniformidad obteniéndose la generación R_2 (Figura 24). Su semilla, denominada R_3 se siembra de nuevo obteniéndose la generación R_3 . En cada generación el material se evalúa y selecciona de acuerdo con los objetivos del programa de mejoramiento.



Figura 13. Cultivo de arroz en el momento de la selección de las panículas.



Figura 14. Distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas.



Figura 15. Corte del tercio medio de la panícula.



Figura 16. Corte de las flores por su base.



Figura 17. Siembra de las anteras en el medio de cultivo para la inducción del microcallo.



Figura 18. Anteras cultivadas en medio de inducción e incubadas en la oscuridad y una temperatura de 25 a 27°C.



Figura 19. Callos después de 20 días de cultivo.



Figura 20. Microcallos en el medio para la regeneración incubados a $24-26^{\circ}\text{C}$ y $100 \text{ E.m}^{-2}.\text{S}^{-1}$.



Figura 21. Estado de las plantas 30-40 días después de haber sido transferidos los callos al medio de regeneración.



Figura 22. Plantas regeneradas en bandejas con suelo fangueado y esterilizado.



Figura 23. Plantas R_1 , transplantadas en el campo.



Figura 24. Líneas homocigotas R_2 .

6. FORMULACION Y PREPARACIÓN DE LOS MEDIOS DE CULTIVO

La preparación y el almacenamiento de los medios de cultivos son críticos para garantizar una respuesta exitosa, ya que de ello depende la composición química del medio y la disponibilidad de los nutrientes al tejido vegetal cultivado *in vitro*. La composición del medio es afectada por el manejo y almacenamiento de los reactivos, así como por la preparación y almacenamiento de las soluciones madres. A continuación se describen algunas consideraciones a ser tomadas en esta etapa.

6.1 Preparación y almacenamiento de soluciones madres

Algunas sales (macronutrientes y micronutrientes) de los medios de cultivo usados comúnmente en cultivo *in vitro* pueden ser obtenidas comercialmente en forma de premezcla. Las premezclas son útiles sobre todo en aquellos laboratorios donde se cultiva a gran escala y hay limitaciones de personal. Tienen además la ventaja de garantizar calidad y resultados reproducibles. Sin embargo, las premezclas presentan la desventaja que son más costosas que la preparación del medio con sales individuales. También en la investigación frecuentemente se necesita preparar medios experimentales con modificaciones en la composición y la cantidad de los constituyentes, lo que limita el uso de las premezclas. En el caso de utilizar sales individuales para la preparación del medio, es aconsejable preparar inicialmente soluciones concentradas de los ingredientes (soluciones madres), ya que los niveles de la mayoría de las sales involucradas en el medio son relativamente pequeños.

El agua utilizada tanto para la preparación de las soluciones madres como para el medio debe ser de alta pureza y libre de iones, es decir, agua destilada y deionizada. Las soluciones madres de sales inorgánicas son fácilmente formuladas por la disolución de cantidades prescritas de sus cristales en agua. Algunas sustancias orgánicas, tales como las auxinas, citoquininas y giberilinas, son difíciles de disolver en agua. Las citoquininas, al igual que otros compuestos básicos, se disuelven fácilmente en pequeñas cantidades de un ácido diluido (ej., HCl 1N). Por el contrario, las auxinas, giberilinas y otros ingredientes ácidos se disuelven en bases

diluidas (ej., KOH 1N). La proporción de 0.3 ml del ácido o base por 10 mg de citoquininas o auxinas puede ser usada como guía general. Frecuentemente es necesaria una agitación vigorosa con una barra agitadora para lograr una completa disolución. La muestra predisuelta es luego llevada a un volumen final con agua. Las soluciones madres deben ser almacenadas sin ajustar pH, para así disminuir la precipitación. Los ajustes de pH son hechos después de la inclusión de todas las soluciones madres en el medio final.

Los co-solventes orgánicos, tales como la acetona y el alcohol pueden ser necesarios para disolver ciertas sustancias orgánicas neutrales. Estos co-solventes son relativamente fitotóxicos. Por lo tanto, sólo pueden ser usadas cantidades pequeñas. La disolución final con agua de las soluciones madres preparadas con co-solventes orgánicos debe ser hecha rápidamente para evitar la precipitación.

La refrigeración es recomendada en el almacenamiento de soluciones madres de muchos químicos orgánicos. Algunos compuestos, como las giberilinas, el ácido ascórbico y ciertas auxinas (ej. el ácido indolacético, AIA), son extremadamente inestables y sus soluciones madres pueden ser preparadas frescas. Las soluciones de algunos químicos, tales como las sales de hierro deben ser protegidas de la luz, almacenándolas en frascos oscuros o ambar. Las soluciones madres de la mayoría de las sales inorgánicas no requieren refrigeración. Antes de utilizar una solución madre, es aconsejable verificar que esté libre de precipitación y contaminación. Como norma general, es aconsejable familiarizarse con la forma de disolución y el almacenamiento de los reactivos antes de preparar las soluciones madres, para así garantizar una adecuada composición de la solución. Esta información puede ser suministrada conjuntamente con el producto por el proveedor comercial y obtenida en catálogos de caracterización química de compuestos (ej., Merck). Las premezclas y los reactivos puros deben ser almacenados preferiblemente en lugares con baja humedad relativa y temperaturas por debajo de 28°C. La baja humedad relativa es más crítica que la refrigeración. En el Cuadro 8 se resume las condiciones óptimas recomendadas para el almacenamiento de los reactivos utilizados en los protocolos descritos en este manual.

6.2 Medidas de seguridad en el manejo de reactivos

Si bien el tipo de reactivos utilizados en cultivo de tejidos y células vegetales son por lo general inocuos, hay algunos que deben ser manejados siguiendo ciertas precauciones para evitar un posible daño a la salud del operante y otras personas del laboratorio. Como norma general, es aconsejable antes de utilizar por primera vez un reactivo, familiarizarse con las especificaciones recomendadas por el fabricante sobre el manejo del mismo. En el Cuadro 9 se detallan los reactivos que son utilizados comúnmente en el cultivo de anteras de arroz y que deben ser manejados con cierta precaución.

6.3 Formulación de los medios basales utilizados para la inducción de callos y regeneración de plantas

Para la etapa de inducción de callos se están utilizando en general dos tipos de medios básicos denominados N6m y NL (Cuadro 2). Estos medios han sido formulados obteniéndose un incremento significativo en la producción de callos de genotipos japónica e índica, respectivamente. Para la regeneración de plantas se utilizan el medio MS (Cuadro 2) y 1/2 MS para callos inducidos en N6m y NL, respectivamente.

6.4 Preparación de un litro de los medios N6m y NL para la inducción de callos.

En los Cuadros 10 y 11 se detallan los componentes de los medios N6m y NL, y la cantidad a tomar de cada solución madre para preparar un litro de medio de cultivo. Como se indica en los cuadros, varias sustancias se combinan para reducir el número de soluciones madres; las sustancias inestables se preparan solas y los reactivos que puedan precipitarse no se mezclan. En las soluciones se utiliza siempre agua destilada-deionizada.

La solución fuente de hierro se prepara disolviendo por separado el Na_2EDTA y el $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ en 1/4 del volumen final de solución. Al disolver el Na_2EDTA se debe

calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agita bien y se deja enfriar, para luego completar con agua el volumen final. La solución debe envasarse en un frasco oscuro y almacenarse a temperatura ambiente.

Si la tiamina-HCl no se disuelve bien, debe calentarse ligeramente. Esta solución se puede guardar uno o dos meses.

La solución 2,4-D se prepara adicionando 50 mg del compuesto a 5 ml de 50% etanol calentado levemente a baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 100 ml con agua previamente calentada a la misma temperatura.

La solución de picloramo se prepara adicionando 7 mg del compuesto en 5 ml de etanol 70%, se calienta suavemente, y se ajusta el volumen a 100 ml.

La solución de kinetina se prepara disolviendo los 100 mg del compuesto en aproximadamente 5 ml de 0.5 N HCl. Se calienta a baja temperatura hasta disolver. Se ajusta el volumen a 100 ml. Se divide en alicuotas para almacenar en el congelador a -0°C . Descongelar cada alicuota en baño de María antes de usar, y almacenar el remanente a 4°C (refrigerador) por un máximo de 1 mes.

Para preparar un litro del medio N6m proceda de la siguiente manera:

- Adicione 500 ml de agua destilada-deionizada.
- Adicione las cantidades de las soluciones madres indicadas en el Cuadro 10, siguiendo el mismo orden y con agitación continua.
- Adicione 50 g de sucrosa.
- Lleve el volumen a un litro.
- Ajuste el pH a 5.8.
- Envase en cada frasco de inducción (7 cm X 4 cm, frasco de compota para bebe) 10 ml de medio.
- Esterilice los frascos en un autoclave a 122°C de temperatura y 20 psi de presión, durante 15 minutos.
- Déjelos enfriar y almacénelos a una temperatura de $8-10^{\circ}\text{C}$. El medio puede permanecer en el cuarto frío hasta dos meses en estas condiciones.

- Para calcular el volumen que se debe agregar de cada solución madre, en el caso que se quiera cambiar la concentración de las indicadas en el cuadro, se aplica la siguiente formula:

$$C_1 V_1 = C_2 V_2, \text{ donde:}$$

C_1 = Concentración de la solución madre.

V_1 = Volumen de cada solución madre que se debe adicionar para obtener los volúmenes finales especificados en el cuadro 10. Esta es la incógnita.

C_2 = Concentración final de las soluciones por cada litro de medio que se quiere preparar.

V_2 = Volumen final del medio a preparar, 1000 ml.

Ejemplo: Se quiere preparar 1000 ml de medio con una concentración final de 4 mg/l de kinetina, y se tiene una solución madre de 200 mg/l.
¿Cuántos ml de esta solución madre hay que adicionar?

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$200 \text{ mg/l} \quad X = 4 \text{ mg/l} \cdot 1000 \text{ ml}$$

$$X = 4 \text{ mg/l} \cdot 1000 \text{ ml} / 200 \text{ mg/l}$$

$$X = 20 \text{ ml}$$

Para preparar un litro de medio NL proceda de forma similar a la descrita anteriormente, pero adicionando las cantidades de las soluciones madres indicadas en el Cuadro 11. Substituya la sucrosa por 50 g de maltosa, y adicione 10 mg de AgNO_3 .

6.5 Preparación de un litro del medio de Murashige y Skoog (MS) para la regeneración de las plantas

El medio MS se utiliza para inducir la diferenciación de plantas de callos inducidos en el medio N6m. El método más simple de preparar este medio es utilizando medios prefabricados en forma de cristales que contienen las sales inorgánicas de Murashige

y Skoog, lo cual ahorra mucho tiempo. Sin embargo, la preparación de la solución madre, aunque demanda tiempo y cuidado permite además la posibilidad de realizar cambios cualitativos y cuantitativos en los constituyentes del medio de acuerdo con la necesidad. En el Cuadro 12 se detallan las sustancias que componen el medio MS. Las indicaciones para la preparación de las soluciones madres son iguales a las dadas para el medio de inducción.

La solución No. 6 puede mantenerse hasta dos meses mientras que las otras duran hasta 5 meses. Las soluciones No. 2 y No. 6 se deben mantener en el congelador hasta donde sea posible; las demás se guardan refrigeradas.

La solución de ácido naftalenacético (ANA) se prepara disolviendo 200 mg del compuesto en aproximadamente 5 ml de 0.5 N KOH. Se calienta a temperatura baja hasta disolver. Se completa el volumen final a 200 ml con agua. Es aconsejable preparar esta solución semanalmente.

6.6 Recomendaciones

En la preparación de los medios de cultivo se deben tener en cuenta las siguientes precauciones:

- Asegúrese siempre de llevar un buen control de las soluciones madres para evitar excesos o faltantes.
- No olvide ajustar el pH de los medios de cultivo a 5.8.
- Revise el buen estado de las soluciones, es decir que no presenten precipitaciones o contaminaciones y asegúrese de que estén debidamente marcadas.
- Antes de empezar a preparar cualquiera de los medios tenga todas las sustancias necesarias a mano, ésto le ahorrará tiempo, trabajo y evitará errores.
- Evite los riesgos de contaminación de las soluciones y del equipo empleado.

Cuadro 8. Condiciones óptimas para el almacenamiento de reactivos.

Reactivo	Almacenamiento	
	Cristal	Solución
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	TA	TA
(NH ₄) ₂ SO ₄	TA	TA
KNO ₃	TA	TA
KH ₂ PO ₄	TA	TA
MgSO ₄ ·7H ₂ O	TA	TA
CaCl ₂ ·2H ₂ O	TA	TA
Micronutrientes		
H ₃ BO ₃	TA	TA
MnSO ₄ ·4H ₂ O	TA	TA
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	TA	TA
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	TA	TA
CoCl ₂ ·6H ₂ O	TA	TA
CuSO ₄ ·5H ₂ O	TA	TA
KI	TA	TA
Na ₂ EDTA	TA	TA
FeSO ₄ ·7H ₂ O	TA(D)	TA
Vitaminas		
Mio-inositol	TA	TA
Tiamina-HCl	TA	TA
Acido Nicotínico	TA	TA
Piridoxina-HCl	TA(D)	TA
Glicina	TA	TA
Reguladores de crecimiento		
2,4-D	TA	0 - 5°C
Picloramo	TA	TA
ANA	TA(D)	0 - 5°C
Kinetina	-0°C	-0°C
Otros compuestos		
AgNO ₃	TA	TA
Gelrite	TA(D)	TA
Phytigel	TA(D)	TA
Sucrosa	TA	TA
Maltosa	TA	TA

(TA) Temperatura ambiente. (D) Desecador.

Cuadro 9. Recomendaciones de seguridad en el manejo de reactivos

Reactivo	Manejo
2,4-D	Herbicida. Cancerígeno. El reactivo en polvo debe manipularse con guantes y mascarilla. Su contacto causa irritación en los ojos y disturbios gastrointestinales. El reactivo en solución debe pipetarse con pipeteador manual o automático.
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Tóxico. El reactivo en polvo debe manipularse con mascarilla y guantes. Su contacto puede causar disturbios gastrointestinales (estreñimiento, diarrea y cólico). En los niños la ingestión de grandes cantidades puede causar vomito, daño hepático, taticardia y colapso vascular.
AgNO_3	Tóxico. El reactivo en polvo debe manipularse con mascarilla y guantes. Compuesto cáustico e irritante para los ojos y membranas mucosas. Su ingestión puede causar severa gastroenteritis que puede ser fatal.
Colchicina	Altamente tóxico. Mutágeno y cancerígeno. El reactivo en polvo y en solución debe manipularse con mascarilla, guantes y en cámara extractora. Puede ser mezclado o disuelto en un solvente orgánico para su incineración.
Hipoclorito de calcio	Tóxico. El reactivo en polvo debe manipularse con mascarilla, guantes y en cámara extractora. La inhalación puede causar severa irritación bronquial y edema pulmonar. El contacto prolongado con los ojos puede resultar en irritación. Su ingestión puede causar corrosión de las membranas mucosas, perforación gástrica y edema de la laringe.
HCl	Altamente tóxico. Debe manipularse con mascarilla, guantes y en cámara extractora. Soluciones concentradas causan quemaduras severas y pueden causar daño visual permanente. Puede causar dermatitis y fotosensibilización a partir del contacto industrial. Su inhalación causa asfixia, y puede producir inflamación y ulceración del tracto respiratorio. Su ingestión produce corrosión de las membranas mucosas, esófago y estómago, náuseas, vómito, diarrea, sed intensa. Puede ocurrir colapso circulatorio y muerte.
KOH	Altamente tóxico. Extremadamente corrosivo. Debe manipularse con mascarilla, guantes y en cámara extractora. Soluciones concentradas causan quemaduras severas. La ingestión puede producir fuerte dolor en la garganta y colapso.

Cuadro 10. Solución madre para preparar un litro de medio N6m para inducción de callos de genotipos japónica.

Solución	Componentes	Cantidad (mg)	Volumen de H ₂ O (ml)	Volumen de solución madre/litro del medio (ml)
1	(NH ₄) ₂ SO ₄ KNO ₃ CaCl ₂ ·2H ₂ O	2320 28300 1660	1000	100
2	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O KI	80 158 75 40	50	1
3	Tiamina-HCl Acido nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	50 25 25 100	50	1
4	KH ₂ PO ₄	5400	100	10
5	MgSO ₄ ·7H ₂ O	50	50	3.7
6	Na ₂ EDTA FeSO ₄ ·7H ₂ O	750 550	100	5
7	2,4-D	50	100	4
8	Picloramo	7	100	1
9	Kinetina	100	100	0.5

Cuadro 11. Solución madre para preparar un litro de medio NL para inducción de callos de genotipos indica.

Solución	Componentes	Cantidad (mg)	Volumen de H ₂ O (ml)	Volumen de solución madre/litro del medio (ml)
1	(NH ₄) ₂ SO ₄ KNO ₃ MgSO ₄ ·7H ₂ O CaCl ₂ ·2H ₂ O	2320 31340 1860 1500	1000	100
2	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O KI Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O (2.5 mg/ml) CuSO ₄ ·5H ₂ O (2.5 mg/ml)	600 1690 1000 100 25 1 ml 1 ml	100	1
3	Tiamina-HCl Acido nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	125 125 125 125	50	1
4	KH ₂ PO ₄	5400	100	10
5	Na ₂ EDTA FeSO ₄ ·7H ₂ O	750 550	100	5
6	2,4-D	50	100	4
7	Picloramo	7	100	1
8	Kinetina	100	100	0.5

Cuadro 12. Solución madre para preparar un litro de medio MS para regeneración de plantas a partir de callos inducidos en medio N6m.

Solución	Componentes	Cantidad (mg)	Volumen de H ₂ O (ml)	Volumen de solución madre/litro del medio (ml)
1	NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ ·7H ₂ O KH ₂ PO ₄	82500 95000 18500 8500	1000	20
2	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ ·H ₂ O ZnSO ₄ ·7H ₂ O Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O CoCl ₂ ·6H ₂ O (2.5 mg/ml) CuSO ₄ ·5H ₂ O (2.5 mg/ml)	620 1690 860 25 1 ml 1 ml	100	1
3	KI	83	100	1
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	15	100	2.9
5	Na ₂ EDTA FeSO ₄ ·7H ₂ O	750 550	100	5
6	M-inositol	5000	500	10
7	Tiamina-HCl Acido nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	10 50 50 200	100	1
8	ANA	200	200	1
9	Kinetina	500	500	4

Reactivos	Cantidad (gr)
Piridoxina - HCl	50
Tiamina HCl	50
Glicina	125
Acido nicotínico	50
M-Inositol	50
Acido naftalenacético	50
Acido acético	1 lt
Carmín	25
Etanol	500 ml
Kinetina	50
Sacarosa*	2000
Acido giberélico	2,5
Acido indolacético	5,0
Bencil aminopurina	2,5

* Se puede usar azúcar del mercado, cristalizada

Implementos	Unidades
- Pipetas graduadas:	
1 ml	5
2 ml	5
5 ml	5
10 ml	5
- Vasos graduados:	
100 ml	12
250 ml	12
500 ml	6
1000 ml	6
- Lavadoras plásticas de 250 ml	4
- Probetas:	
25 ml	4
50 ml	4
100 ml	4
500 ml	2
1000 ml	2
- Erlenmeyers:	
125 ml	12
250 ml	12
500 ml	6
1000 ml	6

Reactivos	Cantidad (gr)
NH_4NO_3	500
KNO_3	250
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	500
KH_2PO_4	250
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
KCl	250
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	250
H_3BO_3	250
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	250
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	250
$\text{CoCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	62,5
KI	250
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	250
Na_2EDTA	62,5
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	250

APENDICE

Equipo indispensable para establecer un laboratorio para producir 2000 líneas homocigotas (R_2) al año.

Implementos

Frascos	
de 7 x 4 cm para la inducción	3.000
de 10 x 10 cm para la regeneración	5.000
- Mecheros de alcohol	2
- Mangos para bisturí	4
- Cuchillas para bisturí No. 10	100
- Pinzas medianas de punta gruesa	4
- Pinzas largas de punta gruesa	2
- Rollos de algodón	20
- Cajas de Petri (150 x 20 mm)	48
- Cámaras de doble flujo laminar	1
- Balanzas:	
para pesar pequeñas cantidades	1
para pesar grandes cantidades	1
- Plato agitador y calentador	1
- Barras:	
agitadoras magnéticas grandes	3
agitadoras magnéticas pequeñas	3
- Autoclave simple	1
- Carros de laboratorio	2
- Potenciómetro	1
- Refrigerador	1
- Bandejas plásticas	6
- Bandejas metálicas	4
- Estereoscopio binocular	1
- Microscopio binocular	1
- Porta objetos y cubre objetos	10
- Espátulas	5

- TASCON, E.; GARCIA, E. (eds.), 1985. Arroz: Investigación y producción. CIAT. Cali, Colombia. 696 p.
- TSAY, H.S. 1982. Autotoxicity in tobacco and rice anther culture. In: C.H. Chou y G.R. Walter (eds.). Allelochemicals and pheromones. Acad Sin Taipei. Taiwan. ROC. pp: 283-292.
- TSAY, H.S.; CHEN, L.J. 1984. The effects of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture. J. Agric Res China. 33: 24-29.
- TSAY, H.S.; TENG, Y.C.; LAI, P.C.; CHI, N.C. 1981. The culture of rice anthers of japonica X indica crosses. In: A. Fujiwara (ed.). Plant Tissue Culture. Maruzen. Tokyo. pp: 561-562.
- WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHU, C.C; WU, S.C. 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice. In: Proc Symp Plant Tissue Culture. Science Press. Beijing. pp: 149-147.
- YING, C. 1986. Anther and pollen culture of rice. p.3-25. In : Haploids of higher plants *in vitro*. Hu Han y Yang Hongyuan (eds.). China Academic Publishers Beijing - Springer - Verlag. N.Y.

- MII, M. 1976. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. *Z. Pflanzenphysiol* 80: 206-214.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-479.
- NIISEKI, H.; OONO, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc Jpn Acad* 44: 554-557.
- NISHI, T.; MITSUOKA, S. 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. *Jpn J Genet* 44: 341-346.
- NÚÑEZ, V.M.; ROCA, W.M.; MARTINEZ, C.P. 1989. El cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. Serie 04SR-07-02. CIAT, Cali, Colombia. 60 p.
- PELLETIER G.; ILAMI, M. 1972. Les facteurs de l'androgenèse *in vitro* chez *Nicotiana tabacum* L. *Z. Pflanzenphysiol* 68: 97-114.
- PEREZ-ALMEIDA, I.B. 1993. Variabilidad genética en la reacción a *Pyricularia oryzae*. Cav. de dos poblaciones de arroz obtenidas por cultivo de anteras y pedigree. Tesis M.S. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Maracay. 124 p.
- QUIMIO, C.A.; ZAPATA, F.J. 1990. Diallel analysis of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. *Crop Science* 30: 188-192.
- RAINA, S.K. 1989. Tissue culture in rice improvement: Status and potential. *Adv. Agronomy*. 42:339-397.
- REGGIANI R.; HOCHKOEPLER, A.; BERTANI, A. 1989. Polyamines and anaerobic elongation of rice coleoptile. *Plant Cell Physiol.* 30(6): 893-898.
- SHEN, J.; FANG, L.M.; QUAN, C.H.; HUA, Z.Z. 1983. Improving rice by anther culture. In: *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. Science Press, Beijing, China.
- SNAPE, J.W.; SIMPSON, E. 1981. The genetical expectations of doubled haploid lines derived from different filial generations. *Theor. Appl. Genet.* 60:123-128.
- SNAPE, J.W. 1989. Doubled haploid breeding: Theoretical basis and its practical applications. In: Mujeeb-Kazi, A. y L.A. Sitch (Ed); *Review of Advances in Plant Biotechnology, 1985-1989*. 2nd Int. Symp. on Genetic Manipulation in Crops, CIMMYT and IRRI. Mexico and Manila. p. 19-30.
- SUNDERLAND, N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: *Proc Symp Plant Tissue Culture*. Science Press, Beijing, pp: 65-86.
- SUNDERLAND, N.; XU, Z.H.; HUANG, B. 1981. Recent advances in barley anther culture. In: *Proc 4th Int Barley genetics Symp*. Univ Press, Edinburg, pp: 699-703.

- HAN, H. 1985. Use of haploids in crop improvement. p.76-95. In: Biotechnology in International Agricultural Research Proceedings of the Inter-Center Seminar on International Agricultural Research Centers (IARCs) and Biotechnology. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Philippines.
- HEBERLE-BORS, E. 1985. In vitro haploid formation from pollen: a critical review. Theor. Appl. Genet 71: 361-374.
- HUANG, C.S.; TSAY, H.S.; CHERN, C.G.; CHEN, C.C.; YEH, C.C.; TSENG, T.H. 1988. Japonica rice breeding using anther culture. Journal Agric. Res. China. 37(1):1-8.
- HUANG, H.S.; LING, T.H.; TSENG, P.L.; SHIEN, Y.L.; SHI, P. 1981. Studies on medium component in anther culture of *Oryza sativa* subsp. *hsien* by mathematical methods. In: Plant Tissue Culture. Proceedings of the Beijing Symposium. pp: 244-246. Pitman Publishing Ltd. London. ISBN 0-273-08488-7.
- JANSEN, R.C. 1992. On the selection for specific genes in doubled haploids. Heredity 69: 92-92.
- JOHANSON L.; ANDERSON, B.; ERIKSSON, T. 1982. Improvement of anther culture technique: activated charcoal bound in agar medium in combination with liquid medium and elevated CO₂ concentration. Physiol Plant 54: 24-30.
- LENTINI, Z.; MARTINEZ, V.P. 1992. Applications of anther culture in rice breeding. p. 230. In: Rice in Latin America. Improvement, Management and Marketing. F. Cuevas-Perez (ed.). International Center of Tropical agriculture (CIAT). Cali, Colombia.
- LENTINI, Z.; MARTINEZ, C.P.; SANINT, L.R.; RAMIREZ, A.; REYES, P. 1993. Anther culture of recalcitrant rice genotypes and the cost/benefit implications in varietal development. Sixth Ann. Meeting of the Rockefeller Foundation International Program on Rice Biotechnol. Feb. 1-5. 1993. Chiang Mai, Thailand. p. 92.
- LIANG, S.; HUANG, S. 1991. Huayu 15, a high-yielding rice variety bred by anther culture. p.230-247. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 14, Springer Verlag.
- MAHESHWARI, S.C.; TYAGI, A.K.; MALHOTRA, Y.K. 1980. Induction of haploidy from pollen grains in angiosperms - the current status. Theor Appl Genet 58: 193-206.
- MARTINEZ, C.P.; SANINT, L.R.; LENTINI, Z.; RAMIREZ, A. 1993. Rice breeding with anther culture or pedigree: a cost/benefit analysis. Crop Science (Submitted for publication).
- MIAH, M.A.A.; EARLE, E.D.; KUSH, G.S. 1985. Inheritance of callus formation ability in anther cultures of rice, *Oryza sativa* L. Theor Appl Genet 70: 113-116.

7. LITERATURA CITADA

- BAENZIGER, P.S.; G.W. SCHAEFFER. 1983. Dihaploids via anthers cultured in vitro. In: L.D. Owens (ed.), Genetic Engineering: Applications to Agriculture, pp. 269-284. Bestville Symposia in Agricultural Research. Rowman y Allanheld Pub., New Jersey.
- BRUZZONE, C.B. 1991. Bridging upland-irrigated rice (*Oryza sativa* L.) gene pools via anther culture. Ph. D Thesis. Oregon State University. Corvallis, Oregon. 145 p.
- BRIGGS, F.N.; KNOWLES, P.F. (eds.) 1967. Introduction to plant breeding. Reinhold Publishing Corporation. New York. 426 p.
- CHEN, C.C.; LIN, C.M. 1981. Genotypic differences in plant production in anther culture of rice. pp. 199-203. In: Chang WC (ed.). Proc. Symp. Plant Cell Tissue Culture. Acad. Sin, Taipei.
- CHEN, C.C.; TSAY, H.S.; C.R. HUANG. 1991. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). p. 193-215. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.14, Springer Verlag.
- CHEN, T.; TSO, C.H.; WANG, J.F.; CHANG, K.H. 1978. On screening of anther culture media for hybrid *Oryza sativa* L. subsp. Keng X *O. sativa* subsp. Shien by orthogonal test. In: H. Hu (ed.) Proc Symp Anther Culture. Science Press. Beijing. pp: 40-49.
- CHEN, Y. 1986. Anther and pollen culture of rice. In: Haploids of Higher Plants *in vitro*. Hu, H. and Yang, H. (eds.). China Acad., Publishers, Beijing, pp. 3-25.
- CHU, C.C. 1982. Haploids in plant improvement. In: I.K. Vasil, W.R. Scowcroft, y K.J. Frey (ed.), Plant Improvement and Somatic Cell Genetics, pp. 129-158. Academic Press, New York.
- CHU C.C.; WANG, C.C.; SUN, C.S.; CHEN, H.; YIN, K.C.; CHUC, Y.; BI, F.Y. 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci Sin 18: 659-668.
- DAY, A.; ELLIS, T.H.N. 1984. Chloroplast DNA deletions associated with wheat plants regenerated from pollen: possible bases for maternal inheritance of chloroplasts cell. 39: 359-368.
- FANG, P.Y. 1991. Breeding new rice strains through anther culture. p.216-229. In: Y.P.S. Bajaj (ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol.14, Springer Verlag.
- GLASZMANN, J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. Theor. Appl. Genet. 74: 21-30.
- GRIFFING, B. 1975. Efficiency changes due to use of doubled-haploids in recurrent selection methods. Theor. Appl. Genet. 46:367-386.