

La Fundación Polar es una institución privada sin fines de lucro. Fue creada en 1977 por un grupo de organizaciones pertenecientes a Empresas Polar de Venezuela, con la misión de contribuir al estudio de problemas prioritarios cuya solución sirva efectivamente al progreso del país. Maneja, por tanto, un patrimonio propio en concordancia con sus planes de acción social.

La Fundación Polar lleva a cabo proyectos en nueve áreas cuyas mutuas relaciones son aprovechadas para comprender mejor el complejo tejido de la sociedad venezolana. Tales áreas se denominan así: Agrícola, Ambiente, Ciencia, Economía Agroalimentaria, Educación y Desarrollo Comunitario, Salud y Bienestar Social, Cultura, Historia de Venezuela, y Donaciones. La labor desarrollada en todas ellas se apoya en recursos, ideas y conocimientos que propician la equidad.

En el Área Agrícola, específicamente, se llevan a cabo las siguientes actividades: caracterizar la dinámica organizativa de las instituciones dedicadas a la investigación y a la innovación tecnológica para comprenderla mejor; fomentar la conformación de redes que faciliten la comunicación interinstitucional y la apertura a este tipo de relaciones; hacer estudios que permitan contribuir con nuevos enfoques y contenidos a la formación técnica de los agricultores y profesionales del agro; y fortalecer las iniciativas que surjan en el campo de la documentación y la información.

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 16 centros internacionales de investigación agropecuaria auspiciados por el Grupo Consultivo para la Investigación Agropecuaria Internacional (GCIAT).

El presupuesto básico del CIAT es financiado por 25 donantes, entre los que figuran gobiernos de países, organizaciones para el desarrollo regional e institucional y fundaciones privadas. En 1997, los siguientes países son donantes del CIAT: Alemania, Australia, Bélgica, Brasil, Canadá, Colombia, Dinamarca, España, los Estados Unidos de América, Francia, Holanda, Japón, Noruega, el Reino Unido, Suecia y Suiza. Las entidades donantes son el Banco Interamericano de Desarrollo (BID), el Banco Mundial, el Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo (CIID), el Fondo Internacional para el Desarrollo Agrícola (IFAD), la Fundación Ford, la Fundación Nippon, la Fundación Rockefeller, el Programa de las Naciones Unidas para el Desarrollo (PNUD), y la Unión Europea (UE).

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

La Fundación Rockefeller es una organización creada por John D. Rockefeller y dedicada desde 1913 "a promover el bienestar de la humanidad en todo el mundo". Es una de las fundaciones privadas más antiguas de América y una de las pocas que ha mantenido una intensa actividad internacional. Su objetivo inicial fue la identificación, y el estudio en sus causas, de los factores que generan el sufrimiento y la necesidad en la humanidad.

La Fundación trabaja intensamente en programas escogidos cuyos objetivos están bien definidos, pero ajusta su rumbo siguiendo las necesidades y oportunidades que se presenten. Su actividad se manifiesta en tres áreas principales: desarrollo internacional basado en la ciencia, artes y humanidades, y manejo equitativo de las oportunidades. La primera área se concentra en el mundo en desarrollo dando énfasis al medio ambiente a nivel mundial; a la agricultura, la salud y el estudio de las poblaciones; y a varias iniciativas específicas para África.

La Fundación desarrolla programas de becas y subvenciones que sostienen trabajos de reforma educativa en Estados Unidos, de seguridad internacional, de filantropía internacional, y de otros intereses e iniciativas específicos. Asimismo, la Fundación mantiene en el norte de Italia el Centro Bellagio de Estudios y Conferencias donde se dictan conferencias de alcance internacional y donde se reúnen artistas, científicos e intelectuales, politólogos y otros profesionales de cualquier país del mundo.

La Fundación es administrada por un Presidente, quien dirige una planta de personal proveniente de disciplinas universitarias, científicas y profesionales. La Junta Directiva es independiente y se reúne cuatro veces al año para establecer la orientación de los programas y la política de financiación y para aprobar las asignaciones de recursos. Las propuestas o solicitudes dirigidas a la Fundación se reciben en la secretaria y la información general se solicita a la Oficina de Comunicaciones (The Rockefeller Foundation, 420 Fifth Avenue, New York, NY 10018-2702, USA).

Cultivo de Anteras de Arroz en el Desarrollo de Germoplasma

Sobre los autores:

Zaida Lentini, Ph.D., Bióloga Genetista, científica de los proyectos del CIAT Productividad del Arroz y Agrobiodiversidad, y coordinadora de la investigación en cultivo de anteras y transformación genética del arroz, CIAT, Cali, Colombia.

César P. Martínez, Ph.D., Fitomejorador, científico del proyecto Productividad del Arroz, CIAT, Cali, Colombia.

William M. Roca, Ph.D., Fisiólogo, Jefe de la Unidad de Investigación en Biotecnología y coordinador del proyecto Agrobiodiversidad, CIAT, Cali, Colombia.

Esta publicación fue cofinanciada por:

Fundación Polar, Caracas, Venezuela

Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia

Fundación Rockefeller, Nueva York

Zaida Lentini, Ph.D.

César Martínez, Ph.D.

William Roca, Ph.D.

Cultivo de Anteras de Arroz en el Desarrollo de Germoplasma



Fundación Polar



**Centro Internacional
de Agricultura Tropical**



Fundación Rockefeller

Centro Internacional de Agricultura Tropical
International Center for Tropical Agriculture
Apartado Aéreo 6713
Cali, Colombia
Fax: 57-2-4450-073
e-mail: z.lentini@cgnet.com

Publicación CIAT no. 293
ISBN 958-9439-92-6
Tiraje: 1000 ejemplares
Impreso en Colombia
Agosto de 1997

Lentini, Zaida ; Martínez, César ; Roca, William. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. -- Cali, Colombia : Centro Internacional de Agricultura Tropical, 1997. 57 p. Ilus. (Publicación CIAT ; no. 293)
ISBN 958-9439-92-6

Arroz. Propagación de plantas in vitro. Recursos de germoplasma. Anteras. Callo. Medio de cultivo. Economía. Colombia.

Derechos de Autor CIAT 2001. Todos los derechos reservados

El CIAT propicia la amplia disseminación de sus publicaciones impresas y electrónicas para que el público obtenga de ellas el máximo beneficio. Por tanto, en la mayoría de los casos, los colegas que trabajan en investigación y desarrollo no deben sentirse limitados en el uso de los materiales del CIAT para fines no comerciales. Sin embargo, el Centro prohíbe la modificación de estos materiales sin su consentimiento otorgado por escrito, y espera recibir los créditos merecidos por ellos cuando son reproducidos en otras publicaciones. Aunque el CIAT elabora sus publicaciones con sumo cuidado, no garantiza que sean exactas ni que contengan toda la información.

Contenido

	Página
Introducción	1
Genética de las Plantas Doble Haploides	3
El Doblamiento de Cromosomas, un Camino Corto hacia la Homocigosis	4
La Selección, un Proceso Eficiente en los Doble Haploides	5
Variabilidad Genética en Poblaciones de Doble Haploides	7
Genética de la Respuesta al Cultivo de Anteras	8
Biología del Cultivo de Anteras	9
Morfología de la Inflorescencia del Arroz	9
La antera	10
El polen y su desarrollo en la antera	10
Desarrollo del Cultivo de Anteras	13
Inducción de microcallos	13
Diferenciación celular para regenerar plantas	13
Factores que Influyen en el Cultivo de Anteras	14
El genotipo	14
El albinismo	14
Condiciones ambientales y estado fisiológico de la planta donante	16
Estado de desarrollo del polen al iniciarse la siembra de las anteras	17
Tratamiento de las anteras antes de sembrarlas en el medio de inducción	17
La pared de la antera	18
El medio de cultivo	18
Condiciones físicas de incubación para la inducción de callos y la diferenciación de plantas	25
Utilización del Cultivo de Anteras en Mejoramiento	27
Evaluación y Selección de Doble Haploides	27
Uso de Doble Haploides. Algunos Ejemplos	27
Germoplasma tolerante al frío	30
Germoplasma para condiciones de secano	30
Germoplasma con otras características útiles	30
Implicaciones Económicas del Cultivo de Anteras en el Desarrollo de Variedades	33
Estimación de los Costos en el Método de Pedigrí	33
Estimación de los Costos en el Cultivo de Anteras, y Observaciones	33
Procedimiento General para el Cultivo de Anteras de Arroz	35
Producción y Selección del Material Donante de Anteras	35
Siembra del material donante	35
Selección de las plantas donantes	35
Selección de las panículas	35
Cómo determinar el estado de desarrollo del polen	36
Esterilización Superficial de las Panículas	36
Aislamiento y Siembra de las Anteras	36

	Página
Cultivo de las Anteras y Formación de Microcallos	37
Transferencia de los Microcallos al Medio de Regeneración	37
Adaptación de las Plántulas para el Trasplante al Suelo	37
Evaluación de las Plantas R ₁ y las Líneas R ₂ , y Selección de la Semilla R ₃	37
Formulación y Preparación de los Medios de Cultivo	39
Preparación y Almacenamiento de Soluciones Madre de Medios de Cultivo	39
Medidas de Seguridad en el Manejo de Reactivos	40
Formulación de los Medios Basales para la Inducción de Callos y la Regeneración de Plantas	41
Preparación de los medios A y C para la inducción de callos	41
Preparación del medio de Murashige y Skoog (MS) para la regeneración de plantas	43
Recomendaciones Generales	44
Referencias	45
Apéndice	49
Equipo de laboratorio indispensable para cultivar 60,000 anteras por semana, durante 6 meses, con dos operarios	49
Lista de Abreviaturas	50
Láminas en Color	51

Introducción

El cultivo de anteras (CA) es una técnica por medio de la cual es posible producir líneas homocigotas a partir de poblaciones segregantes, mediante el doblamiento cromosómico del polen haploide y la regeneración de plantas, en un ciclo de cultivo in vitro. En contraste, por los métodos estándar de fitomejoramiento normalmente se requieren seis generaciones de autofecundación para alcanzar la completa homocigosis en plantas autógamias.

Niizeki y Oono (1968) fueron los primeros en regenerar plantas por medio de esa técnica, en arroz. La primera variedad desarrollada con CA se liberó en 1975 y, desde entonces, se han producido más de 100 cultivares a nivel mundial (Han, 1985; Fang, 1991; Liang y Huang, 1991; Lynch et al., 1991). Entre tales cultivares se encuentra la variedad INCA, liberada en 1995 por el 'Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement, Département des cultures annuelles' (CIRAD-CA). Dicha variedad es una línea de CA producida por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), a partir de cruzamientos que realizó en colaboración con el Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias (INIA) de Chile.

Sin embargo, la aplicación rutinaria del CA como herramienta en programas de mejoramiento ha progresado con lentitud, principalmente porque la respuesta depende altamente del genotipo utilizado. El arroz de tipo japónica de riego tiene una respuesta al CA mayor que la de japónica de secano o la de indica (Chen y Lin, 1981; Ying, 1986a; Chen et al., 1991). Por eso, la aplicación de esta técnica ha estado restringida principalmente a cruzamientos donde, al menos, uno de los padres es del tipo japónica de riego.

El CIAT ha venido investigando, desde 1985, cómo incorporar el CA a sus trabajos, para agilizar la ampliación de la base genética del germoplasma de arroz adaptado a los diferentes agroecosistemas de ese cultivo. Uno de los primeros logros fue la optimización de un método simple para el procesamiento de un gran número de anteras y de cruzamientos por año (Núñez et al., 1989).

Desde 1990, este Centro está estudiando los posibles factores que afectan la androgénesis de genotipos de baja respuesta que se utilizan en programas de mejoramiento en América Latina y el Caribe. El objetivo principal ha sido identificar los factores relacionados específicamente con la respuesta de materiales altamente recalcitrantes del tipo indica (adaptados a condiciones de riego tropical o subtropical) y de tipo para sabana (secano, adaptados a suelos ácidos). El arroz indica se caracteriza por una baja inducción de callos, mientras que el de tipo secano tiene una baja regeneración de plantas verdes.

En esta publicación se informa sobre la metodología desarrollada, la cual es aplicable a una gran diversidad de genotipos (Lentini et al., 1995). El Programa de Mejoramiento de Arroz del CIAT utiliza actualmente el CA para las siguientes actividades: desarrollar plantas doble haploides (DH) tolerantes al frío, con alto rendimiento y buena calidad del grano; incrementar la recombinación entre materiales genéticamente distantes con resistencia a piricularia y al virus de la hoja blanca, y con tolerancia a la sequía; y facilitar la producción de materiales adecuados para el mapeo genético con marcadores moleculares (Lentini y Martínez, 1992).

También se incluye aquí una revisión de la genética y la biología del CA, se presentan ejemplos de la aplicación de esta técnica en el mejoramiento genético, y se evalúan las implicaciones económicas del uso de la misma en el desarrollo de variedades de arroz. Finalmente, se describen los procedimientos de laboratorio, invernadero y campo para la producción masiva de DH con fines de fitomejoramiento. La estructura de la información resalta la importancia del trabajo interdisciplinario entre especialistas en cultivo de tejidos y fitomejoradores.

Es la intención de los autores de la presente publicación que la información que se describe aquí sirva de guía a investigadores interesados en introducir el CA, como una herramienta para el mejoramiento del arroz.

Genética de las Plantas Doble Haploides

En las plantas superiores, las haploides son esporófitos que poseen un número de cromosomas igual al del gametófito. Mediante el doblaje espontáneo o artificial de los cromosomas es posible obtener, a partir de esas plantas haploides, homocigotos completos; estas plantas se denominan doble haploides (DH). Los materiales DH permiten al fitomejorador fijar sistemas genéticos de gametos individuales, sin pasar por el proceso de endogamia normal, lo cual facilita y acelera el proceso de selección.

Los métodos que se usan más para la obtención de haploides y DH pueden basarse en la fertilización interespecífica o intergenérica (vía partenogénesis o mediante la reducción cromosómica), en el cultivo de esporas masculinas, esto es, de anteras o polen (androgénesis), o en el cultivo de esporas femeninas, o sea, de ovarios u óvulos (ginegénesis) (Figura 1).

De los métodos señalados, el más rápido y aplicable a un mayor número de especies para la producción de DH es el cultivo de anteras (CA) o

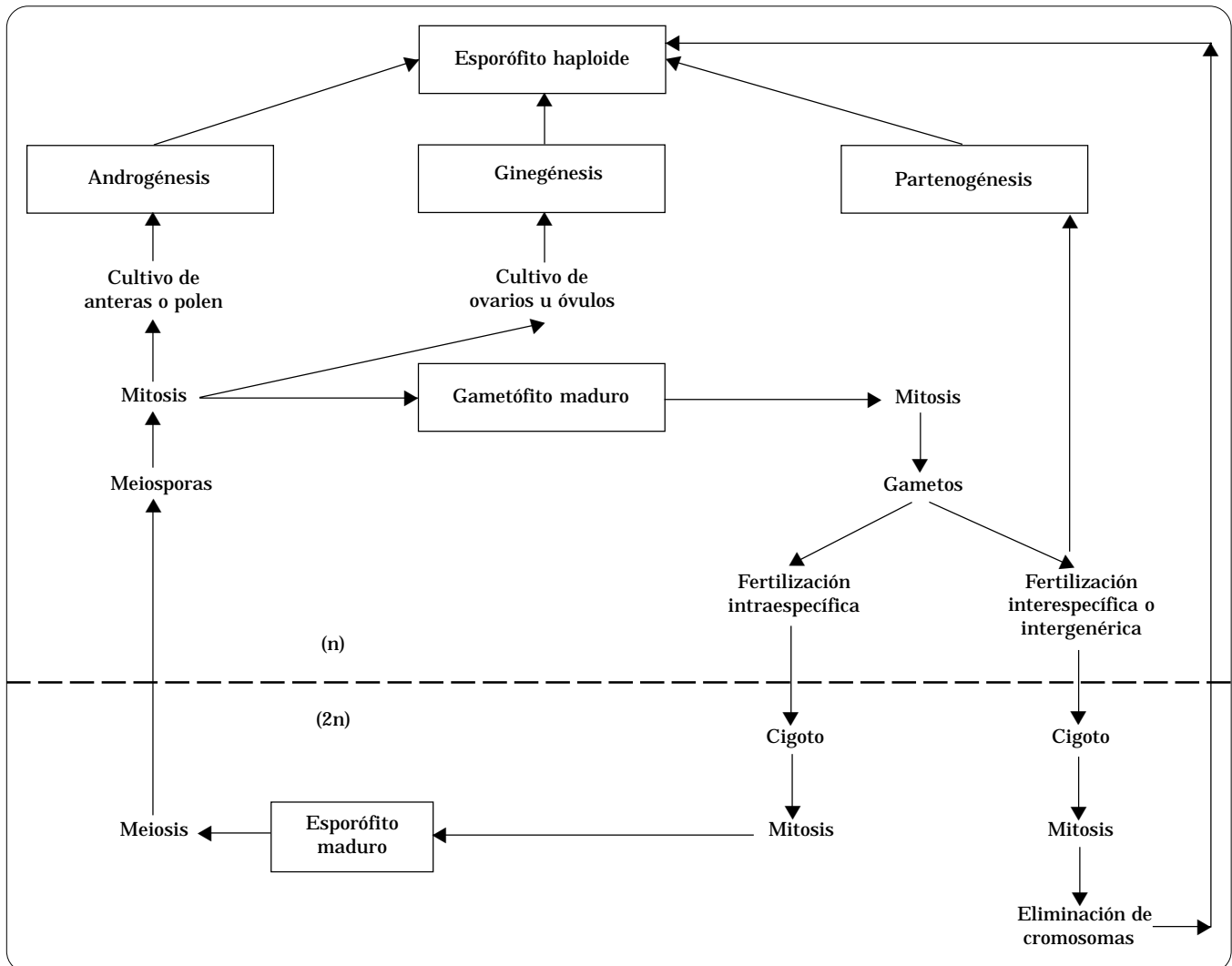


Figura 1. Diversas rutas hacia la haploidía en plantas superiores, y su relación con la alternación de generaciones gametofíticas y esporofíticas.

polen aislado, ya que el cultivo de ovarios y óvulos in vitro no ha tenido éxito, salvo unas pocas excepciones. Asimismo, la obtención de haploides como resultado de la división mitótica del óvulo (partenogénesis) o la eliminación de los cromosomas de uno de los genomas de los padres, inducidas por fertilización interespecífica o intergenérica, se aplica a muy pocas especies.

A continuación se presenta una revisión de las implicaciones genéticas del uso de DH en fitomejoramiento.

El Doblamiento de Cromosomas, un Camino Corto hacia la Homocigosis

Puesto que cada grano de polen proveniente de plantas híbridas F_1 representa un gameto diferente, la población de plantas DH muestra la variabilidad genética esperada en una generación F_2 , y la ventaja adicional de que

cada individuo tendrá un genotipo homocigoto, es decir, fijado definitivamente (Figura 2).

Al aplicar la técnica del CA, se pueden obtener líneas homocigotas (DH, R_2) en sólo 8 a 9 meses, contabilizados a partir de la siembra de la semilla híbrida F_1 o F_2 . En cambio, con el sistema de mejoramiento por pedigrí, comúnmente utilizado en arroz, esta misma estabilidad se logra generalmente sólo después de cinco a seis generaciones de autopolinización (Figura 3).

Por consiguiente, con el CA se pueden realizar mucho antes las evaluaciones en ensayos de rendimiento. En condiciones tropicales, donde es posible tener dos ciclos por año, esos ensayos de rendimiento se pueden iniciar a los 2 años con CA, mientras que con el método de pedigrí se pueden iniciar a los 4 años (Figura 3). En condiciones templadas, donde normalmente se evalúa un ciclo por año, esos tiempos se duplican. Lo anterior representa una mayor ventaja comparativa en tiempo para el CA.

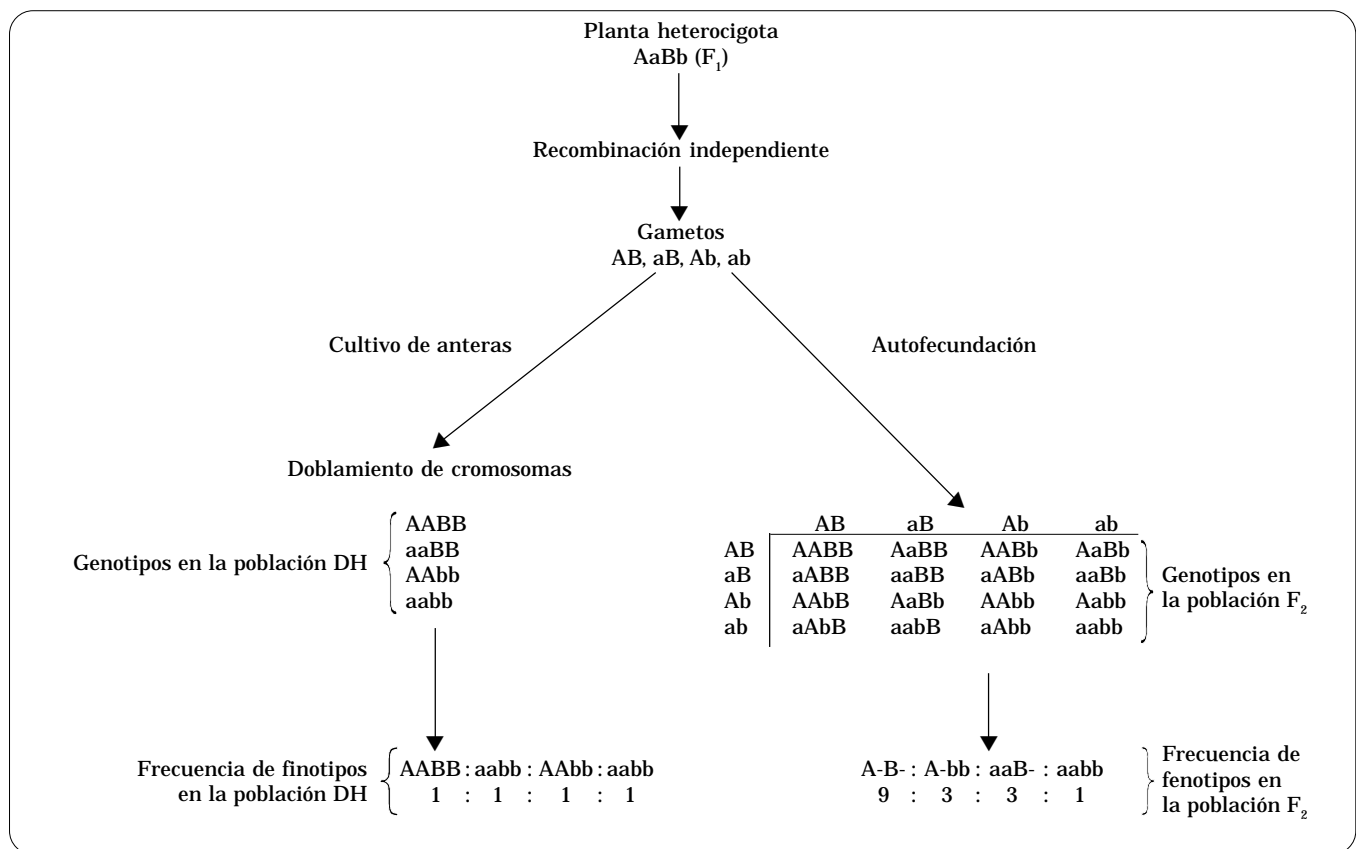


Figura 2. Segregación de genotipos y fenotipos en poblaciones F_2 y DH, a partir de una planta heterocigota para dos genes que recombinan independientemente.

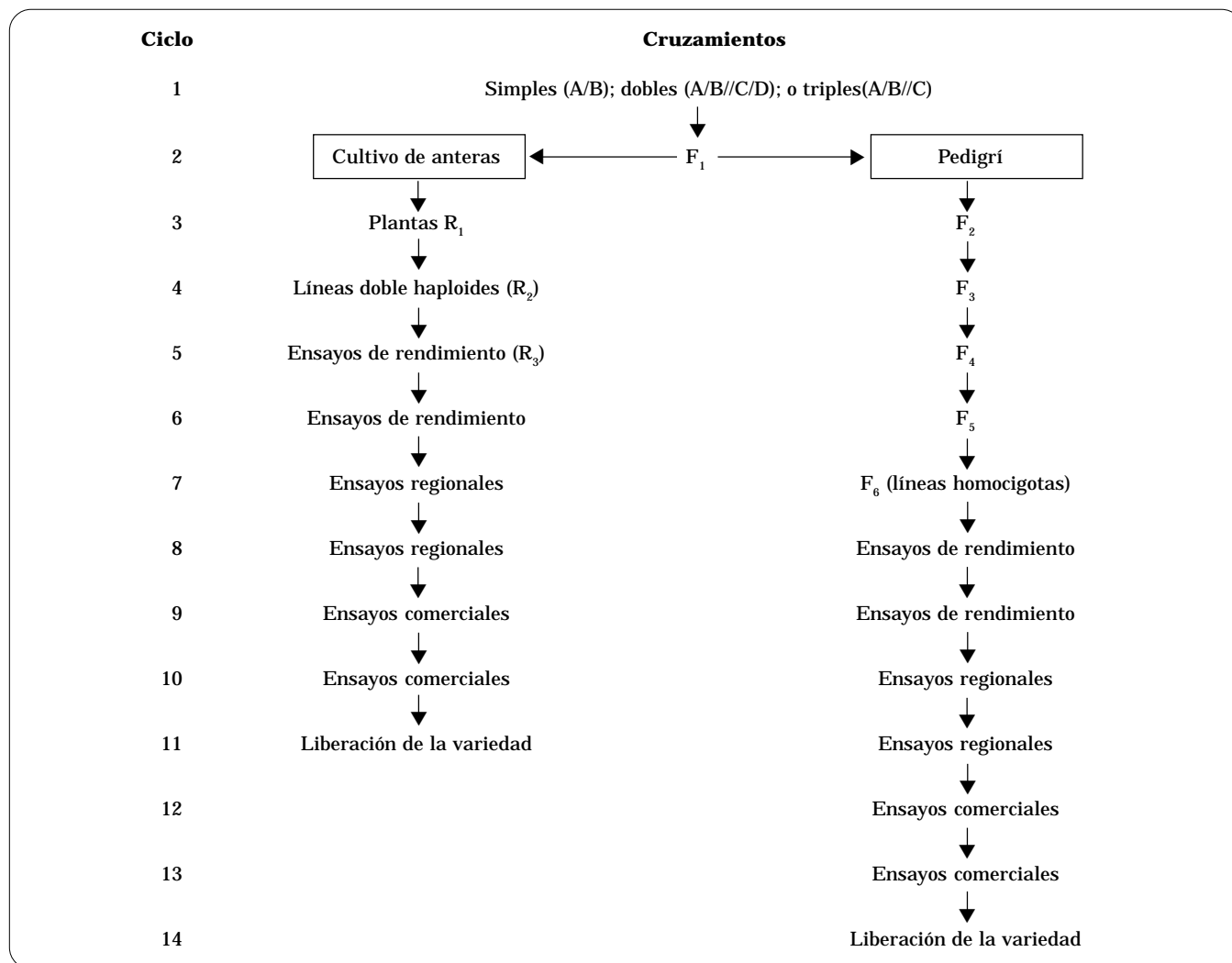


Figura 3. Diagrama comparativo del desarrollo de variedades con cultivo de anteras y pedigrí. Los tiempos se basan en dos ciclos en el campo por año, en condiciones tropicales.

La Selección, un Proceso Eficiente en los Doble Haploides

El CA mejora la eficiencia de la selección, en comparación con la selección en las generaciones tempranas efectuada en el sistema de pedigrí. Tal aumento en la eficiencia ocurre tanto para caracteres cualitativos como para caracteres cuantitativos, y eso facilita la identificación de los genotipos superiores (Snape, 1989).

La selección de individuos en una población F₂ es más efectiva cuando los alelos deseables son dominantes, mientras que si se trata de alelos recesivos solamente se pueden detectar en una proporción de (1/4)ⁿ. En una población de DH, por

el contrario, los genotipos recesivos tienen una frecuencia mayor, esto es, (1/2)ⁿ (Figura 2), y eso facilita la selección de genes recesivos deseables, ya que no son enmascarados por los genes dominantes.

Teóricamente, si los padres del híbrido tienen 'n' pares de alelos que recombinan independientemente, la eficiencia en la selección de un genotipo homocigoto determinado, dentro de una población, es de (1/2)²ⁿ en el caso de mejoramiento con diploides y de (1/2)ⁿ en el caso de mejoramiento con DH. Esto sugiere que la eficiencia de la selección en el mejoramiento con DH es 2ⁿ veces más alta que aquella del mejoramiento con diploides (Baenziger y Schaeffer, 1983).

La mayor eficiencia en la selección con CA ha permitido el desarrollo de cultivares de arroz, a partir de poblaciones de DH más pequeñas que las poblaciones normalmente requeridas al usar el método de pedigrí. Se ha estimado que, para los propósitos de selección de los genotipos deseables, son suficientes cerca de 150 plantas provenientes del CA de una F_1 , en lugar de 4,000 a 5,000 plantas F_2 (Shen et al., 1983).

El aumento en la eficiencia de la selección mediante el CA se considera una ventaja, especialmente cuando la varianza genética de la dominancia es significativa. Tal varianza está definida por la variación debida a la desviación del heterocigoto con respecto al valor medio del progenitor que no está presente en una línea homocigota (Raina, 1989). Griffing (1975) demostró que las varianzas fenotípicas para poblaciones diploides y DH son:

$$\text{Diploides: } V_{P_2} (D) = V_{A_2} + V_{D_2} + V_{E_2}$$

$$\text{Doble haploides: } V_{P_2} (DH) = 2V_{A_2} + V_{E_2}$$

donde:

V_{P_2} = Varianza fenotípica (variación debida a las diferencias entre líneas)

V_{A_2} = Varianza genética aditiva (variación debida a diferencias entre homocigotos en un solo locus)

V_{D_2} = Varianza genética de dominancia (descrita anteriormente)

V_{E_2} = Varianza ambiental (variación debida a efectos ambientales).

En el mejoramiento convencional, las líneas en generación temprana (F_2 a F_4) muestran diferencias fenotípicas para las cuales contribuyen los efectos aditivos de dominancia. En contraste, las líneas DH muestran solamente varianza aditiva y, por lo tanto, una alta heredabilidad debida a la ausencia de los efectos de dominancia. Así, para los propósitos de selección de los recombinantes deseados, se requiere un menor número de DH en comparación con la población F_2 requerida (Raina, 1989).

A este respecto, Baenziger y Schaeffer (1983) citaron el ejemplo hipotético de un cruzamiento, en donde hay segregación de tres genes recesivos y tres genes dominantes. Si se deseara seleccionar los tres genes recesivos, una octava parte (1/8) de la

población DH cumpliría con esa condición, mientras que en la población F_2 sólo lo haría la sesenta y cuatroava parte (1/64) de esa población; las líneas seleccionadas en ambos casos serían homocigotas.

En el ejemplo anterior, si se hiciera la selección para los tres genes dominantes, se seleccionaría la octava parte (1/8) de la población DH y veintisiete sesenta y cuatroavos (27/64) de la población F_2 . En la población de DH, todos los individuos serían homocigotos, pero no así en la población F_2 , en donde sólo una sesenta y cuatroava parte (de los 27/64 individuos seleccionados sobre la base del fenotipo) sería homocigota. Si en la generación F_3 se seleccionara una familia segregante, se necesitarían más evaluaciones en la F_4 y en las generaciones subsiguientes para encontrar los homocigotos deseados.

En las generaciones tempranas del sistema de pedigrí, la selección de caracteres cuantitativos es difícil, debido a la presencia de dominancia, a la segregación intrafamiliar y a la competencia entre plantas. Por el contrario, en el sistema DH hay ausencia de efectos de dominancia y, además, hay el doble de la varianza aditiva entre los recombinantes de un cruzamiento con respecto a las generaciones F_2 y F_3 , aun en caracteres con dominancia completa.

La variación ambiental entre plantas F_2 es probablemente mayor que entre F_3 o DH. Además, en los DH se puede incrementar el número de repeticiones con el fin de disminuir la varianza ambiental 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 es, son homocigotos y homogéneos; esto facilita la selección visual de las mejores líneas en generaciones tempranas.

Según Snape (1989), en el método de pedigrí la heterocigosis y la segregación dentro de las parcelas afectan también el grado de selección de individuos de una generación a otra. Por el contrario, en las líneas DH, al ser genéticamente idénticas, la selección de individuos guarda una correlación igual a la unidad entre generaciones.

Estas propiedades genéticas únicas de la población DH permiten efectuar una discriminación entre cruzamientos y entre

genotipos dentro de los cruzamientos, mejor que la que se hace en generaciones tempranas obtenidas por autofecundación; por consiguiente, los DH aumentan la probabilidad de avance genético y de éxito en un programa de mejoramiento (Griffing, 1975; Snape, 1989).

En varios estudios teóricos se ha determinado el número mínimo de DH necesarios para poder encontrar un homocigoto que reúna todas las características necesarias para producir una variedad. El estudio más reciente es el descrito por Jansen (1992), donde formula probabilidades para genes ligados y no ligados. En el caso de selección de loci múltiples no ligados, el tamaño mínimo de la población de DH está definido por:

$$N = \log(1-p) / \log[1-(1/2)^k]$$

donde:

N = Número de DH

K = Número de loci

p = Probabilidad

Utilizando esta fórmula, Jansen (1992) estimó las probabilidades de obtener un genotipo determinado a partir de un cruzamiento entre dos padres homocigotos. En el caso de un carácter controlado por cinco loci no ligados, encontró que para garantizar que un genotipo específico esté presente, por lo menos una vez, con una probabilidad del 95%, se deben producir 95 líneas DH. En contraste, en el sistema de pedigrí sería necesario evaluar 4^5 plantas, es decir, un total de 1,024 plantas para encontrar un genotipo con los cinco loci (Briggs y Knowles, 1967).

Variabilidad Genética en Poblaciones de Doble Haploides

Varios estudios demuestran que la variabilidad en las características cualitativas y cuantitativas en poblaciones de DH es similar a la obtenida en poblaciones derivadas por los métodos de pedigrí o de avance generacional rápido, con la ventaja adicional de que las poblaciones de DH se desarrollan en un tiempo más corto. Walsh (1974), aplicando modelos de simulación, encontró que cuando se utilizan DH en cultivos autógamos se obtiene un mayor avance genético en la selección de caracteres con baja heredabilidad como lo es el

rendimiento, en comparación con el obtenido con el sistema de pedigrí.

Estudios detallados en cebada sugieren que la estructura genética de las poblaciones DH y las de pedigrí son similares en relación con sus características agronómicas, particularmente en cuanto al rendimiento (Park et al., 1976; Friedt y Foroughi-Wehr, 1986). Similarmente, el comportamiento medio y la distribución fenotípica de las familias DH y de avance generacional rápido son similares para varias características como lo son el rendimiento, la floración, la altura y la resistencia a enfermedades (Choo et al., 1982; Park et al., 1976; Morden et al., 1989; Caligari et al., 1987; Powell et al., 1992; Baezinger et al., 1989).

En arroz, Curtois (1993) estudió la distribución de los parámetros genéticos (media, varianza, sesgo y curtosis) en doce caracteres cuantitativos relacionados con el rendimiento en líneas derivadas de CA y de avance generacional rápido, y encontró que ambos métodos son igualmente efectivos para producir líneas de arroz útiles en mejoramiento.

En relación con la selección gamética, experimentos realizados en arroz (Chen et al., 1983; Siva Reddy et al., 1989; Chung, 1987; Curtois, 1991), utilizando marcadores morfológicos, indican que no hay selección gamética durante el proceso de CA, o que si ocurre es a un nivel no detectable. Guiderdoni (1991) estudió la segregación de marcadores moleculares en cruzamientos índica x japónica, y encontró que la población DH presentaba una pequeña y parcial selección gamética que, sin embargo, era neutral ya que no afectaba estadísticamente las frecuencias alélicas esperadas con respecto a poblaciones F_2 . Estos resultados sugieren que las plantas DH pueden ser integradas en estudios genéticos sin ningún inconveniente.

Con frecuencia se cuestiona la estabilidad y la uniformidad de las plantas obtenidas por CA. Sin embargo, investigaciones realizadas por investigadores como Ying (1986b) sugieren que más del 90% de los DH son uniformes y estables, aproximadamente un 8% presentan variaciones pequeñas en algunos caracteres de importancia agronómica, y el 0.7% presenta variaciones grandes (Raina, 1989). La estabilidad se mantiene a lo largo de varias generaciones. La experiencia acumulada en el laboratorio del CIAT desde 1986 concuerda con estas observaciones.

Las variaciones o segregaciones observadas en los DH se pueden deber a alguno de los siguientes factores:

- Variación somática. El DH se produce a partir del tejido somático (la pared de la antera, el filamento, etc.), el cual es diploide. Si el tejido es heterocigoto, entonces se presentará segregación de caracteres en la progenie.
- Mutación inducida durante el proceso de formación del callo. Si la mutación es inducida antes del doblamiento cromosómico, la planta aparecerá como homocigota, pero si es inducida después del doblamiento, la planta será heterocigota, y en ese caso se observará segregación en la progenie. En cultivo de tejidos, las mutaciones simples o poligénicas ocurren con baja frecuencia.
- Hibridación espontánea. Generalmente las plantas R1 presentan cierto grado de esterilidad lo cual, bajo condiciones de campo, facilita la polinización cruzada dando como resultado un híbrido.
- Variaciones en el número y la estructura de los cromosomas. Estas variaciones pueden ser la causa principal de la segregación observada en los DH, ya que se pueden encontrar casos de plantas heteroploides, aneuploides y quimeras estructurales de híbridos. En estos casos se pueden observar diversos patrones de segregación en las progenies.

Genética de la Respuesta al Cultivo de Anteras

La producción de DH mediante el CA es mucho mayor a partir del arroz tipo japónica que del indica. Estudios de herencia, realizados con generaciones F_1 del cruzamiento entre genotipos japónica de alta respuesta y

materiales indica de baja respuesta, sugieren que la habilidad para formar callos se hereda como un carácter recesivo controlado por un bloque simple de genes, donde los efectos aditivos son significativos y la dominancia de la no respuesta es parcial (Miah et al., 1985).

En la regeneración de plantas verdes en familias F_1 , la respuesta es altamente recesiva y controlada por pocos genes, la no respuesta muestra dominancia parcial, no hay indicaciones de interacciones interalélicas, no hay efecto materno, y la predominancia de efectos aditivos es clara (Quimio y Zapata, 1990).

Estudios recientes en el CIAT, utilizando un análisis dialélico de familias F_1 , confirman la dominancia parcial de la no respuesta, tanto para la inducción de callos como para la regeneración de plantas verdes. Ambas características están controladas por un sistema génico simple oligogénico de alta heredabilidad en el sentido estricto, y no se encuentra un efecto materno significativo. Un análisis de medias generacionales con familias F_2 y retrocruzamientos con el padre que responde, que se hizo simultáneamente con tales estudios, sugiere que la inducción de callos y la regeneración de plantas están controladas por sistemas genéticos diferentes. Para la inducción de callos, los efectos aditivos y de dominancia son más importantes y significativos estadísticamente, mientras que para la regeneración de plantas verdes, los efectos aditivos son los más significativos.

La segregación en cuanto a la respuesta al CA es independiente de la relacionada con el tipo de grano. Actualmente se está evaluando la segregación con respecto a la respuesta al CA en combinación con la correspondiente a otros caracteres de importancia agronómica, con la finalidad de determinar si es posible introgresar la alta respuesta del arroz japónica dentro del material tipo indica de riego.

Biología del Cultivo de Anteras

El cultivo de anteras (CA) es la manipulación, in vitro, de los granos de polen inmaduros (microsporas) contenidos dentro de la antera, para inhibir el desarrollo gametofítico (formación de granos de polen maduros) e inducir el desarrollo esporofítico (formación de plantas). En el caso del arroz este proceso, que se inicia mediante la formación de un tejido no diferenciado que se denomina callo y culmina en la formación de embriones y plantas, se conoce como androgénesis (Niizeki y Oono, 1968).

De las plantas producidas por medio de CA, aproximadamente un 40% a 70% puede ser haploide, triploide o tetraploide, mientras que el otro 30% a 60% es diploide y fértil (doble haploide, DH); éste es el de mayor interés para el fitomejorador (Nishi y Mitsuoka, 1969).

A continuación se describen algunos principios básicos morfológicos, citológicos y fisiológicos del desarrollo de plantas de arroz a partir de las microsporas.

Morfología de la Inflorescencia del Arroz

La inflorescencia del arroz es una panícula (Figura 4) compuesta de unidades florales denominadas espiguillas. La espiguilla consta de la raquilla, dos lemas estériles y la flor (Figura 5).

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.

La flor consta de las brácteas superiores, llamadas glumas florales o simplemente lema y palea, y de un pistilo y seis estambres (Figura 5). 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; éste puede presentar, según la variedad, diferentes colores: blanco, verde pálido, amarillo, púrpura pálido o

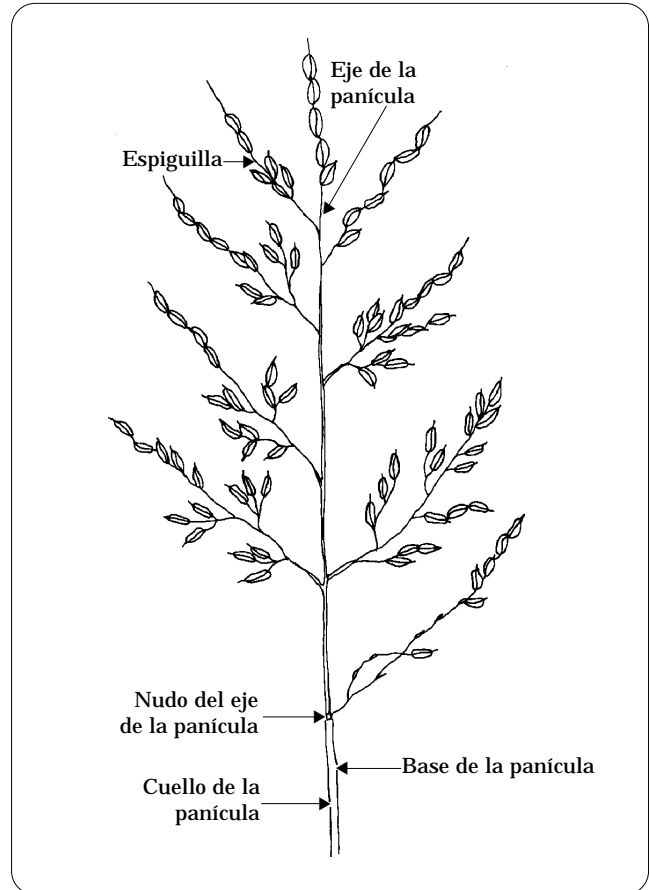


Figura 4. Partes de la panícula de arroz.

FUENTE: Yoshida, 1981.

púrpura. Los estambres, por su parte, son filamentos delgados que sostienen las anteras alargadas y bífidas, las cuales contienen los granos de polen.

En la base de la flor se encuentran dos lodículas, protuberancias redondeadas y transparentes responsables de la apertura floral. Durante la antesis, las lodículas se ponen turgentes logrando que la lema y la palea se separen; simultáneamente, los estambres se alargan y las anteras emergen. La dehiscencia de las anteras se puede efectuar antes de que se abran las glumas, o al mismo tiempo, con una tendencia a la cleistogamia.

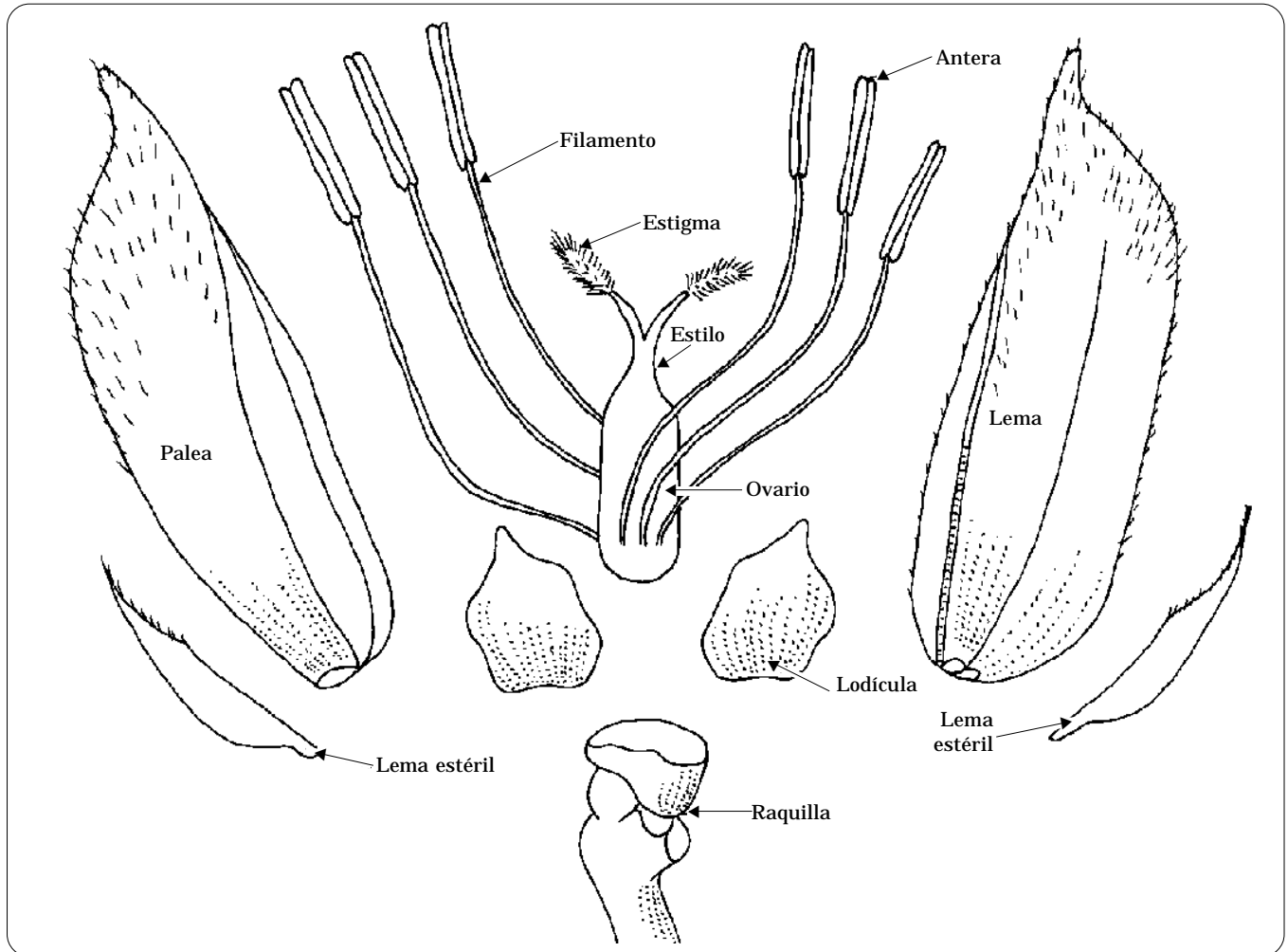


Figura 5. Estructuras de la espiguilla del arroz.

FUENTE: Yoshida, 1981.

La antera

Al hacer un corte transversal en la antera joven se aprecia un tejido conectivo (al centro), por donde se conecta al filamento, y cuatro cavidades denominadas sacos polínicos; dos de ellas son anteriores y dos posteriores (Figura 6A). 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 6B).

La zona más importante de la estructura de la antera es el arquesporio, parte interna de los sacos polínicos, en donde se forman los granos de polen a partir de las células madres (Figura 6A). El arquesporio está recubierto con un tejido glandular, conocido como el tapete, que produce enzimas, nutrimentos y materiales estructurales críticos

para la microsporogénesis. El conjunto de sacos polínicos de la antera está rodeado por el llamado estrato fibroso, compuesto por capas de células con paredes delgadas. Finalmente, en el exterior de todas estas capas se encuentra la pared de la antera, que es una capa altamente especializada responsable de la dehiscencia de la misma (Figura 6B).

El polen y su desarrollo en la antera

Dentro de los sacos polínicos se originan células jóvenes diploides, denominadas células madres del polen o microsporocitos primarios (Figura 7A). 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, con la mitad del número de cromosomas que

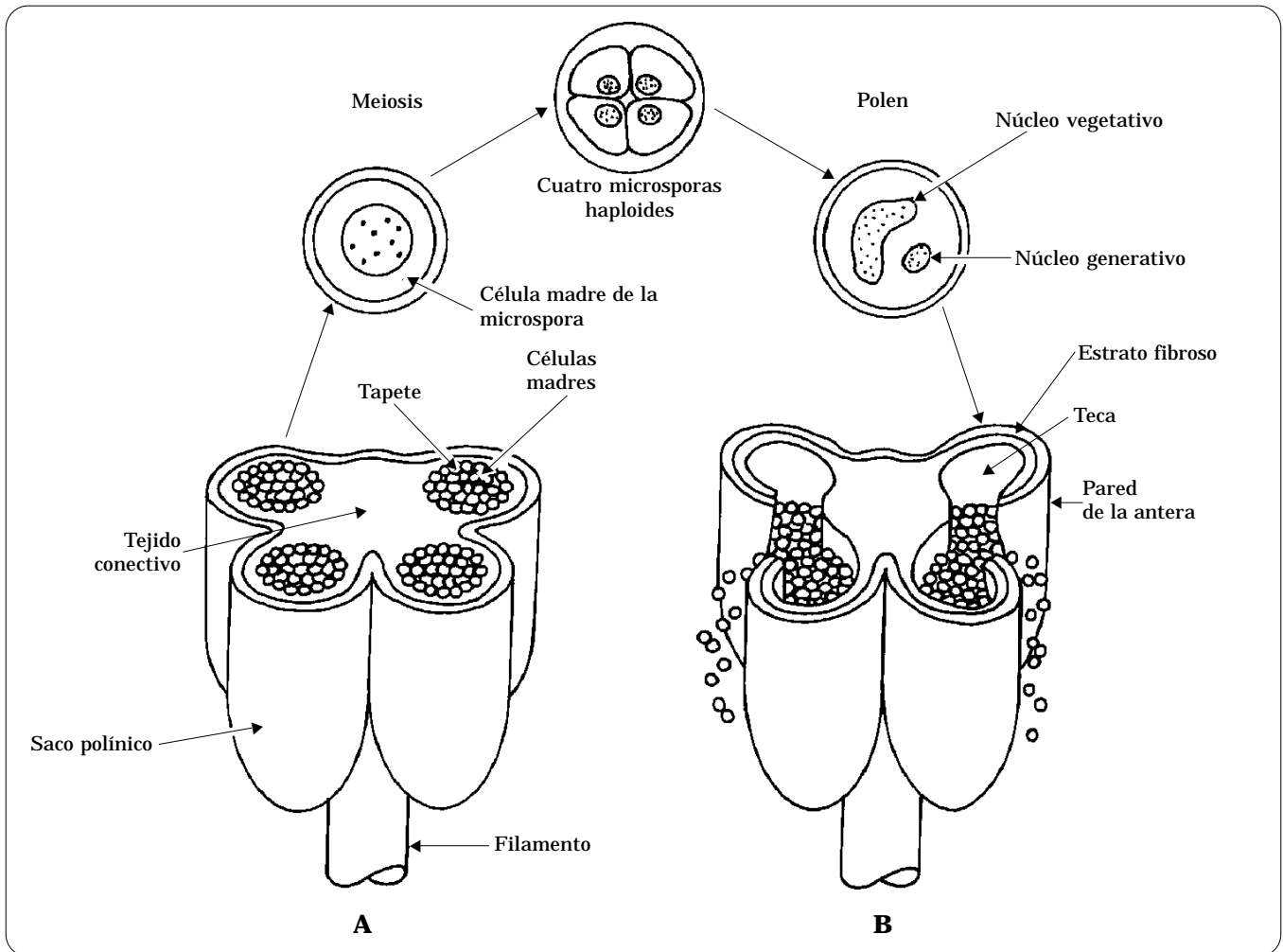


Figura 6. Diagrama de una antera y del desarrollo de los granos de polen.

FUENTE: Fosket, 1994.

existe en las células somáticas del arroz; así se forman dos microsporocitos secundarios haploides. Enseguida, 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 (Figuras 7A; Figura 8A, Láminas en Color).

Las microsporas se separan posteriormente, para iniciar así su ciclo en estado uninucleado, el cual comprende tres etapas: a) uninucleado temprano (Figura 8B, Láminas en Color), cuando la doble pared de la microspora (intina y exina) no está bien conformada todavía, y el núcleo está situado en el centro de la microspora; b) uninucleado medio, cuando la doble pared está bien definida y el núcleo empieza a desplazarse hacia un costado, debido a la presencia de una vacuola grande y c) uninucleado tardío cuando el

núcleo está localizado en el costado de la microspora, se presenta agigantado con pequeñas vacuolas nucleolares, y listo para entrar en mitosis (Figura 7B; Figura 8C, Láminas en Color).

Luego viene el estado binucleado de la microspora, el cual comprende el binucleado temprano y el tardío. El binucleado temprano se presenta inmediatamente después de la primera división mitótica del núcleo, a partir de la cual se forman dos núcleos: el vegetativo, que es generalmente de mayor tamaño, y el generativo o espermático más pequeño (Figura 7B; Figura 8D, Láminas en Color). El binucleado tardío se presenta cuando se forman gránulos de almidón en el citoplasma (Figura 8E, Láminas en Color). El núcleo generativo sufre una segunda división mitótica, y se obtiene así un conjunto de tres núcleos haploides que constituyen el grano de polen (Figura 7B).

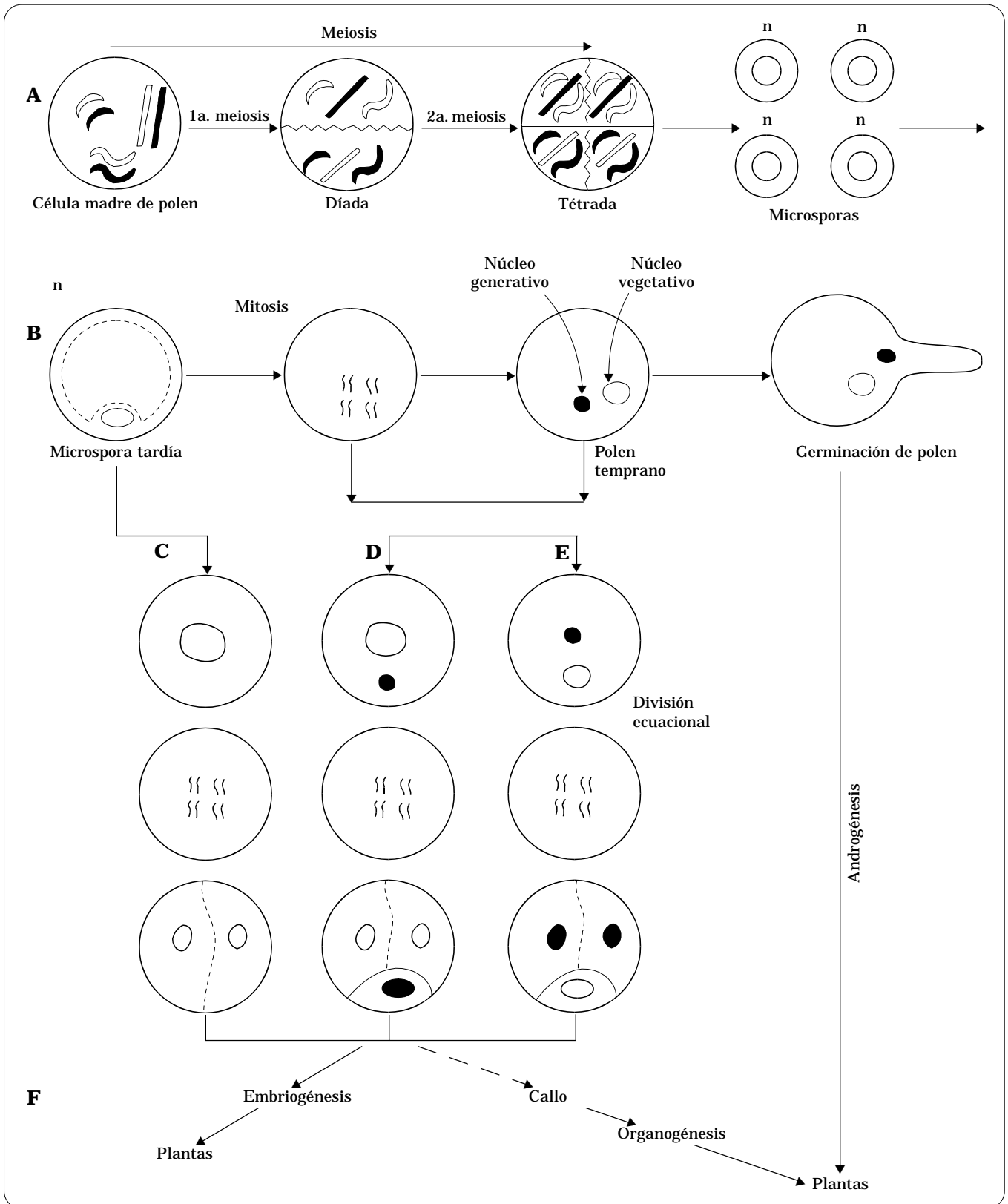


Figura 7. Eventos citológicos durante la microsporogénesis y la androgénesis: A) formación de microsporas; B) maduración del grano de polen; C), D) y E) división mitótica, respectivamente, de la microspora tardía, la binucleada temprana y la binucleada tardía; F) formación de plantas vía embriogénesis u organogénesis a partir del callo.

Normalmente el grano de polen (Figura 8F, Láminas en Color) germina unas pocas horas después de entrar en contacto con el estigma, originando el tubo polínico (Figura 7B). El núcleo vegetativo se degenera y uno de los núcleos generativos se fusiona con el núcleo de la ovocélula para formar el cigoto.

Desarrollo del Cultivo de Anteras

El CA se desarrolla en dos etapas principales: inducción de microcallos y regeneración de plantas verdes.

Inducción de microcallos

En una primera fase del CA, se induce la formación de microcallos colocando las anteras en un medio cuya composición estimule selectivamente la división mitótica de las microsporas, a expensas de las células somáticas presentes en el filamento, el tejido conectivo y la pared de la antera. El medio para inducir esa formación debe tener altas concentraciones de auxinas.

En arroz, el estado del polen óptimo para esa inducción es el comprendido entre el uninucleado medio y el tardío (Figura 8C). Después de 2 días de cultivo ocurre la primera división mitótica de la microspora, división que da como resultado la formación de dos núcleos que están separados por una membrana (Figura 7C). Alrededor del quinto día de cultivo in vitro se inicia la segunda división mitótica. En las primeras divisiones generalmente se originan membranas celulares que permiten la formación de núcleos independientes, cuyo número puede variar de dos a ocho, por cada microspora. A los 20 días de cultivo se forma una masa de tejido amorfo denominada microcallo, el cual contiene más de 100 células por cada microspora involucrada en el proceso. El microcallo (Figura 9, Láminas en Color) alcanza un tamaño de 2 mm alrededor de los 30 ó 50 días, dependiendo del genotipo. Este momento se considera como el más apropiado para iniciar el proceso de regeneración de las plantas (Figura 10, Láminas en Color).

Aún no se sabe con exactitud cómo sucede el doblamiento cromosómico en el 30% al 60% de las plantas de arroz que se pueden regenerar en un CA. Observaciones citológicas del desarrollo de las microsporas en esta etapa permiten suponer dos

formas mediante las cuales puede ocurrir la diploidización o poliploidización.

La primera forma, llamada fusión nuclear, puede ocurrir cuando el cultivo se inicia de microsporas en estado uninucleado medio a tardío y no hay formación de la membrana celular entre los núcleos en las primeras divisiones mitóticas; esto hace posible la fusión de dos o más núcleos, lo cual origina callos diploides o poliploides. También puede haber fusión nuclear cuando el proceso de cultivo se ha realizado a partir de microsporas en estado binucleado temprano; el núcleo vegetativo se fusiona con el núcleo generativo y se origina un callo diploide.

En la segunda forma de diploidización o poliploidización, llamada endoreduplicación, puede presentarse la mitosis de las células haploides, pero no hay separación de los cromosomas duplicados; eso conduce a la formación de un solo núcleo con un número doble de cromosomas.

Si la duplicación de los cromosomas no ocurre, la planta regenerada es haploide. Si la duplicación ocurre una vez, la planta resultante es diploide (DH), y si ocurre más de una vez el resultado será un poliploide. En algunos casos, el doblamiento cromosómico puede ser incompleto, dando como resultado aneuploidías; dependiendo del nivel del desbalance genético, éstas darán como resultado diferentes grados de esterilidad.

Diferenciación celular para regenerar plantas

Una vez los microcallos han alcanzado un tamaño de 2 mm, se transfieren a otro medio de cultivo que contenga bajas concentraciones de auxinas, pero altas de citocininas; éstas estimulan la diferenciación de las células del microcallo hasta regenerar plantas.

En sus primeros estados de desarrollo, el microcallo es una masa de células sin diferenciación (Figura 10A, Láminas en Color); posteriormente, las células desarrollan vacuolas y se empieza a formar el tejido parenquimatoso. En este tejido se diferencian meristemas, algunos de los cuales se localizan en la periferia y se denominan meristemas periféricos; otros están dispersos dentro de la masa parenquimatoso y se denominan endomeristemas dispersos.

Los meristemas periféricos originan los puntos de crecimiento o yemas de la plántula (Figura 10B, Láminas en Color), mientras que los endomeristemas dispersos dan origen a 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, y se conforma así la nueva plántula, que se denomina R_1 (Figura 10C, Láminas en Color). Estas plántulas tienden a macollar dentro del medio de cultivo, y a los 30 ó 45 días después de ocurrida la transferencia de los callos al medio de regeneración desarrollan hojas típicas (Figura 10D, Láminas en Color).

Factores que Influyen en el Cultivo de Anteras

Los siguientes factores influyen en la producción de plantas DH derivadas del CA 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 la siembra de las anteras
- El tratamiento de las anteras antes de sembrarlas en el medio de inducción
- La pared de la antera
- El medio de cultivo
- Las condiciones físicas de incubación de las anteras

El genotipo

El genotipo es el factor que más influye en la frecuencia de anteras productoras de callos, en la capacidad del callo para diferenciar plantas, en la proporción de plantas verdes y albinas, y en la ploidía de las plantas regeneradas. Mientras en arroz japónica de riego es posible producir un alto número de DH de muchas variedades e híbridos, en la mayoría de las índica y las japónica de secano la producción de callos y la regeneración de plantas verdes es baja (Chen et al., 1991). Este tipo de diferencias genotípicas encontradas con materiales

asiáticos también se obtuvo en estudio realizado por el CIAT con materiales latinoamericanos, correspondientes a 151 índica, 113 japónica de secano, 199 índica x japónica de secano, y 99 índica x japónica de riego (Cuadro 1).

La razón de esas diferencias genotípicas no es del todo clara todavía. Sin embargo, hay evidencias de que la androgénesis *in vitro* está bajo control genético simple, como se explicó en el capítulo anterior. Estudios de herencia sugieren que: a) la inducción de callos y la regeneración de plantas están controladas por un bloque simple de genes recesivos diferentes; b) la dominancia de la no respuesta es parcial; c) no hay efecto materno; y d) el efecto de genes aditivos es significativo (Miah et al., 1985; Quimio y Zapata, 1990). Por otra parte, aparentemente la respuesta *in vitro* no está ligada a otros caracteres de interés agronómico.

La experiencia del CIAT también ha demostrado que híbridos índica x japónica presentan una respuesta mayor que la de los híbridos índica (Cuadro 1); de esos cruzamientos se han podido recobrar fenotipos que combinan características agronómicas de ambos genotipos. Esto sugiere la posibilidad de mejorar, mediante manipulaciones genéticas, la respuesta al CA del arroz tipo índica.

El albinismo

La producción de plantas albinas es un fenómeno común en el CA de cereales. En arroz, la aparición de plantas carentes de clorofila varía con el genotipo; en algunos casos se puede obtener una alta tasa de regeneración de plantas, pero el porcentaje de albinas puede variar desde un 10% hasta un 100% (Wang et al., 1978; Tsay et al., 1981) (Figura 11, Láminas en Color).

El albinismo es particularmente predominante en plantas derivadas de polen inmaduro de híbridos interespecíficos o de híbridos intraespecíficos entre las subespecies japónica e índica (Tsay et al., 1981); así, el albinismo constituye un obstáculo importante para el uso del CA en cruzamientos entre progenitores distantes genéticamente. Otros factores como son el estado de degeneración del ADN de los cloroplastos de la microspora en el momento del cultivo y las condiciones del cultivo *in vitro*, pueden también afectar la prevalencia de este fenómeno.

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

Tipo de arroz	Medio ^a	Cruza- mientos	Anteras cultivadas (no.)	Callos/antera (%)		Plantas verdes/antera (%)		Doble haploides/antera (%)	
				Media ^b	Rango	Media ^b	Rango	Media ^b	Rango
Indica	Papa-2	100	592,500	0.01 (0.002)	0.0-0.03	0.01 (0.01)	0.0-0.06	0.005 (0.001)	0.0-0.03
	A	51	275,250	4.3 (0.6)	0.0-8.6	0.2 (0.05)	0.0-0.6	0.1 (0.04)	0.0-0.4
Japónica secano	Papa-2	74	778,500	0.1 (0.03)	0.0-0.4	0.1 (0.01)	0.0-0.2	0.06 (0.002)	0.0-0.08
	A	39	165,500	28.7 (3.4)	7.5-49.9	0.9 (0.2)	0.0-2.1	10.6 (0.1)	0.0-1.2
Indica x japónica secano	Papa-2	127	1,009,000	0.2 (0.01)	0.1-0.3	0.5 (0.06)	0.0-1.2	0.2 (0.02)	0.0-0.4
	A	72	397,500	14.4 (1.5)	1.7-27.1	0.7 (0.1)	0.0-1.5	0.5 (0.07)	0.0-1.3
Indica x japónica riego	Papa-2	10	39,100	38.4 (5.2)	22.0-54.8	3.7 (1.2)	0.0-7.5	2.2 (0.3)	1.3-3.1
	A	89	240,750	91.5 (5.6)	38.7-100	6.6 (0.2)	4.7-8.5	4.0 (0.1)	3.0-5.0

a. Ver la composición de los medios en el Cuadro 2.

b. Los números entre paréntesis corresponden al error estándar (desviación estándar/n^{1/2}).

FUENTE: Lentini et al., 1995.

Algunos estudios sugieren que la formación de plantas albinas se debe a alteraciones de los plastidios durante la microsporogénesis *in vitro*. El albinismo está relacionado con el deterioro del ADN de los cloroplastos (Day y Ellis, 1985) y con deficiencias en el ARN de los plastidios (Chen et al., 1991). La producción de plantas albinas también se puede deber a la falta de expresión de los genes responsables del desarrollo normal de los cloroplastos y de la síntesis de clorofila bajo las condiciones de cultivo *in vitro*.

Por otra parte, la frecuencia de plantas albinas se incrementa con factores como la edad del callo (> 2 mm de diámetro); la temperatura en la inducción y la regeneración de las plantas (> 26 °C); la clase y la concentración de los reguladores de crecimiento (2,4-D > 2 mg/lit); la concentración de sacarosa en el medio de inducción (> 6%); la concentración de sales en el medio de cultivo (< 0.4 miliequivalentes de Fe⁺²) y el estado de desarrollo del polen durante la excisión y el CA (> uninucleado tardío, Figura 8C) (Chen et al., 1991). El manejo adecuado de estos factores, por lo tanto, puede ayudar a minimizar la frecuencia de plantas albinas en el proceso.

Condiciones ambientales y estado fisiológico de la planta donante

Observaciones *in vivo* de granos maduros de polen en anteras de arroz muestran dos tipos de tales granos con diferencias morfológicas y fisiológicas contrastantes. Este factor diferencial, denominado dimorfismo del polen, consiste en que algunos granos presentan el estado morfológico normal, mientras otros, considerados anormales, son de menor tamaño, presentan tinción débil del citoplasma y generalmente tienen divisiones anormales, similares a las del 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 las anteras se someten 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 por el estado fisiológico de las plantas donantes (Heberle-Bors, 1985).

Condiciones de crecimiento de las plantas donantes, tales como el fotoperíodo, la intensidad de la luz, la temperatura, la nutrición mineral, las variaciones estacionales, los 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 de radiación solar. Los resultados de 2 años de estudio en el CIAT muestran que en el arroz tipo *indica* la respuesta es altamente afectada por los niveles de radiación solar recibidos durante los 2 últimos meses antes de cosechar las anteras, mientras que en el de tipo *japónica* la respuesta es afectada durante todo el período de crecimiento (Figura 12).

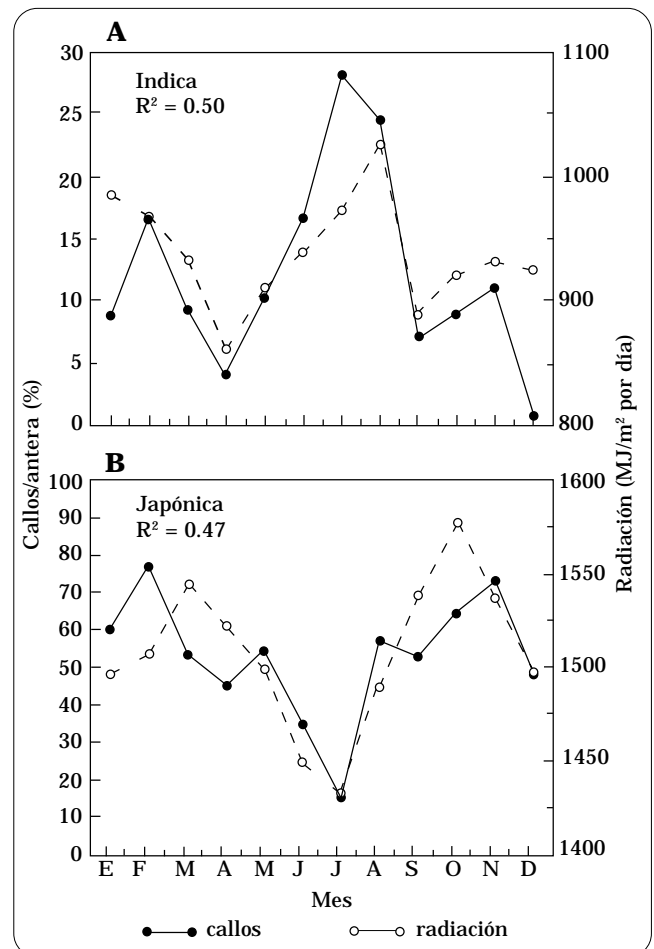


Figura 12. Efecto de la radiación sobre la inducción de callos. Los niveles de radiación corresponden a los recibidos por las plantas donantes de las anteras durante: A) los 2 meses previos a la cosecha de las panículas en el campo, y B) durante los 3 meses previos.

Las anteras de plantas desarrolladas a bajas temperaturas (15 y 20 °C para la noche y el día, respectivamente) son más afectadas que aquellas desarrolladas a altas temperaturas (30 a 35 °C). Pero las anteras de plantas que crecen a temperaturas superiores a los 30 °C tienden a producir un mayor porcentaje de plantas albinas (Chen et al., 1991). Las temperaturas óptimas para el crecimiento de las plantas son 19 y 29 °C para la noche y el día, respectivamente (Ying, 1986a).

En algunos casos, la deficiencia de nitrógeno en las plantas donantes incrementa la respuesta de las anteras al cultivo in vitro, y la aplicación de gametocidas a las panículas en sus estados iniciales de desarrollo puede también dar como resultado una mayor respuesta (Chen et al., 1991).

El estado fisiológico de la planta donante, justo en el momento en que se cosechan las panículas, también influye en los resultados obtenidos. Las investigaciones del CIAT sugieren que las anteras de las primeras inflorescencias, cosechadas en días soleados, y entre las 8 a.m. y las 10 a.m. tienen una capacidad de respuesta mayor que las que provienen de la etapa final de la floración y se cosechan 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).

Estado de desarrollo del polen al iniciarse la siembra de las anteras

El estado de desarrollo del polen en el momento en que las anteras se cultivan in vitro es un factor determinante en el tipo de respuesta obtenido. Estudios comparativos sugieren que, en el caso del arroz, el estado óptimo de desarrollo del polen para el CA es el comprendido entre el estado uninucleado medio y el uninucleado tardío (Chen et al., 1991) (Figura 8C). Si la siembra de las anteras en el medio de inducción se realiza cuando el estado de desarrollo del polen está en una etapa anterior o posterior a la mencionada, la producción de callos decrece notablemente.

Tratamiento de las anteras antes de sembrarlas en el medio de inducción

Por muchos años se mantuvo la práctica rutinaria de aislar las flores de la planta donante,

separar sus anteras e inmediatamente colocarlas bajo las condiciones definitivas de incubación. Sin embargo, en los últimos 20 años, esa práctica se ha sustituido por la aplicación de un tratamiento de bajas temperaturas a las panículas, antes de sembrar las anteras en el medio de cultivo. En la actualidad, ese tratamiento es una práctica esencial dentro de la técnica utilizada para el CA, porque incrementa significativamente la producción de callos.

Varios investigadores han estudiado los efectos que el pretratamiento con bajas temperaturas tiene sobre la respuesta del CA de arroz. No existe un efecto significativo cuando dicho tratamiento se aplica después de que las anteras se han cultivado en el medio de inducción (Tsay y Chen, 1984). La inducción óptima se consigue en anteras con microsporas en estado uninucleado medio a tardío (Figura 8C), con un pretratamiento de 8 a 10 °C por 7 días y en la oscuridad. Este tratamiento no solamente incrementa la formación de callo sino también la diferenciación de plantas verdes. Un pretratamiento en frío por más de 14 días reduce la capacidad de regeneración de plantas de los callos, e incrementa la producción de albinas (Tsay y Chen, 1984).

Según investigaciones sobre la fisiología de las anteras, los efectos benéficos del tratamiento con frío y en la oscuridad se deben a que dicho tratamiento reduce la actividad respiratoria de las anteras, disminuyendo el consumo de reservas de la pared de la antera, prolongando la actividad biológica del arquesporio que alberga los granos de polen, manteniendo la viabilidad de los mismos, evitando la dehiscencia prematura de las anteras en el cultivo, y retrasando la senescencia del polen (Sunderland, 1978). Actualmente se piensa que el pretratamiento con frío podría, además, inhibir la expresión de los genes que controlan el desarrollo gametofítico, o la actividad de las enzimas producto de su expresión, permitiendo la inducción del desarrollo esporofítico (Chen et al., 1991).

Además de las bajas temperaturas, existen otros tratamientos físicos como el pretratamiento con 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 la colchicina y el ethrel al medio de cultivo. Sin embargo, el tratamiento con bajas temperaturas sigue siendo el más utilizado y el de mejores resultados.

La pared de la antera

En experimentos con cultivo de microsporas aisladas, las microsporas muestran divisiones celulares sólo cuando han permanecido dentro de las anteras en el medio de cultivo, por lo menos durante 1 semana antes de ser aisladas. Igualmente, en cultivos donde la senescencia de las anteras ocurre hacia el final del período de cultivo, después de la cuarta semana, la inducción de callos y la posterior regeneración de plantas es mayor que cuando la senescencia aparece en los primeros 15 días (Pelletier e Ilami, 1972; Mii, 1976; Tsay, 1982).

Estos hallazgos son evidencia clara de la importancia que tienen las sustancias fisiológicamente activas que se encuentran en el tapete o la pared de la antera; tales sustancias inducen la morfogénesis de las microsporas durante los primeros días de cultivo, y son necesarias para que estas células sean autónomas para proseguir su desarrollo esporofítico. En el caso de la senescencia prematura de las anteras, también es probable que las quinonas producidas sean tóxicas para las microsporas.

En el CIAT se realizaron varios intentos para reducir la senescencia precoz de las anteras. En los genotipos índica, la senescencia ocurre generalmente durante las primeras 2 semanas de cultivo. Se adicionó carbón activado para absorber los polifenoles que se liberan al medio de inducción, pero este compuesto inhibió totalmente la inducción de callos. Por su parte, agentes antioxidantes tales como la L-cisteína para minimizar la oxidación de compuestos fenólicos, no ejercieron ningún efecto. El ácido cítrico incrementó la inducción de callos en un 55% de los genotipos evaluados, pero la mayoría de éstos mostraron una baja regeneración de plantas verdes.

El medio de cultivo

La iniciación de la división de las microsporas puede ser independiente de los aditamentos nutricionales, pero éstos se requieren para las divisiones subsecuentes, que conllevan a la formación del callo, y a 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 por 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 unas de otras. Estas diferencias pueden deberse a la influencia que ejercen el genotipo, las condiciones ambientales y fisiológicas de la planta donante, el estado de desarrollo del polen y el pretratamiento de frío dado a las anteras. Sin embargo, esto no le resta importancia a 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.

Nutrimentos inorgánicos y vitaminas. El crecimiento y la diferenciación de los callos están determinados por las concentraciones de sales inorgánicas, especialmente las de amonio; por eso, la relación entre la concentración de amonio (NH_4^+) y la de nitrato (NO_3^-) es uno de los principales factores en la composición del medio. Las altas concentraciones de amonio presentes en el medio MS (Murashige y Skoog, 1962) inhiben la formación del callo de microsporas de arroz y de otros cereales (Cuadro 2). Basados en las observaciones anteriores, Chu et al. (1975) desarrollaron el medio básico N_6 (Cuadro 2), en el cual se usa aproximadamente una tercera parte (1/3) de los niveles de amonio del MS, el triple del fosfato, una tercera parte (1/3) del calcio, la mitad del magnesio, una tercera parte (1/3) del cloruro, 1.5 veces la cantidad de potasio y el doble del sulfato.

Las vitaminas del medio basal satisfacen la necesidad que tiene el polen de cofactores enzimáticos. El medio N_6 contiene usualmente ácido nicotínico (0.5 mg/lit), piridoxina (0.5 mg/lit), tiamina (1.0 mg/lit) y glicina (2 mg/lit) (Cuadro 2). Este medio ha sido ampliamente adoptado para el CA de arroz japónica.

Para el tipo índica, sin embargo, existen otros requerimientos nutricionales. Siva Reddy et al. (1985) encontraron que el medio He_2 incrementa la frecuencia de inducción de callos y la regeneración de plantas verdes de genotipos índica; eso sugiere que este tipo de arroz es altamente susceptible al amonio y al magnesio, ya que el medio He_2 es una

Cuadro 2. Composición de los medios Papa-2, N₆, A, B, C y MS.

Componentes	Composición según el medio (mg/lt)					
	Papa-2 ^a	N ₆	A	B	C	MS
Extracto de papa	100	0	0	0	0	0
NH ₄ NO ₃	0	0	0	0	0	1650
(NH ₄) ₂ SO ₄	100	463	231.5	231.5	231.5	0
KNO ₃	1000	2830	2830	3134	3134	1900
KH ₂ PO ₄	200	400	540	540	540	170
MgSO ₄ ·7H ₂ O	126	185	3.7	185	185	370
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0	166	166	150	150	440
KCl	36	0	0	0	0	0
H ₃ BO ₃	0	1.6	1.6	6.2	6.2	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	0	4.4	4.4	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0	1.5	1.5	8.6	8.6	8.6
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0	0	0	0.25	0.25	0.25
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0	0	0	0.025	0.025	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0	0	0	0.025	0.025	0.025
KI	0	0.83	0.83	0.83	0.83	0.83
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3	37.3
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8	27.8
M-inositol	0	0	0	0	0	100
Tiamina-HCl	0	1	1	2.5	2.5	0.1
Acido nicotínico	0	0.5	0.5	2.5	2.5	0.5
Piridoxina-HCl	0	0.5	0.5	2.5	2.5	0.5
Glicina	0	2	2	2.5	2.5	2.0
2,4-D	2	2	2	2	2	0
Picloramo	0.07	0.07	0.07	0.07	0.07	0
ANA	0	0	0	0	0	1
Cinetina	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	4
AgNO ₃	0	0	0	0	10	0
Sacarosa (g/lt)	50	50	50	0	0	30
Maltosa (g/lt)	0	0	0	50	50	0
Phytigel (g/lt)	0	0	0	0	0	1.8
pH	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8	5.8

a. Contiene extracto de papa.

modificación del medio N_6 que contiene la mitad del NH_4^+ de este último, dos veces su nivel de PO_4^- y una quinta parte de su nivel de Mg^{2+} . En el Cuadro 2, el medio He_2 se denomina medio A porque contiene otra composición hormonal.

En el CIAT se realizaron estudios comparativos (Lentini et al., 1995) con el fin de determinar la composición óptima del medio basal para la inducción de callos y su efecto sobre la regeneración de plantas verdes; se usaron 23 genotipos indica y 11 japónica, comúnmente cultivados o utilizados en programas de mejoramiento en América Latina y el Caribe (Cuadro 3). Se comparó la respuesta obtenida con

los medios basales N_6 y Papa-2, ampliamente utilizados en el CA de cereales (Chen et al., 1978) con la obtenida con el medio A. El medio de Papa-2 (Cuadro 2) está hecho a base de extracto de papa, contiene niveles dos a cuatro veces más bajos en macronutrientes que los medios N_6 y A, y no tiene micronutrientes ni vitaminas.

La inducción de callos y la regeneración de plantas verdes en las indica fue significativamente mayor en el medio A que en los medios N_6 y Papa-2 (Figura 13). Las japónica formaron callos en el medio de Papa-2, pero con el N_6 o el A se incrementó la regeneración de plantas verdes. El medio de Papa-2 no solamente produjo una

Cuadro 3. Genotipos^a utilizados para optimizar las condiciones de inducción de callos y regeneración de plantas.

Indica		Japónica	
Variedad	Origen	Variedad	Origen
Amistad	Cuba	Araguaia	Brasil
Anayansi	Panamá	Bluebelle	EE.UU.
BR-IRGA 409	Brasil	Buli Inia	Chile
CEA 1	Paraguay	Ceysvoni	Surinam
Centa A5	El Salvador	CT 6241-17-1-5-1	Colombia
Cica 8	Colombia	Diamante	Chile
Cimarrón	Venezuela	El Paso 227	Uruguay
CR 1821	Costa Rica	Guaraní	Brasil
El Paso 144	Uruguay	Oryzica Sabana 6	Colombia
GZ 864-2-3-1	Egipto	Rustico	EE.UU.
Icta Motagua	Guatemala	Tox 1011-4-1	Nigeria
INIAP 415	Ecuador		
INTI	Perú		
IR8	Filipinas		
IR42	Filipinas		
IR43	Filipinas		
IRAT 124	Madagascar		
Juma 58	Rep. Dominicana		
Morelos	México		
Oryzica 1	Colombia		
Oryzica Llanos 5	Colombia		
P 5446-6-6-1-13	Colombia		
Sinaloa A68	México		

a. El tipo de arroz se determinó siguiendo la clasificación isoenzimática de Glaszmann (1987).

senescencia temprana de las anteras, sino que también redujo el número de callos diferenciados. Tendencias similares se observaron con un mayor número de genotipos (Cuadro 1).

Se hicieron nuevas modificaciones del medio A, al usar 231.5 mg/lit de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 3134 mg/lit de KNO_3 , 540 mg/lit de KH_2PO_4 , micronutrientes del MS, y 2.5 mg/lit de vitaminas del N_6 , para obtener el medio B (Cuadro 2). Con este medio se incrementó tres veces la inducción de callos y cinco veces la regeneración de plantas verdes de arroz indica con respecto al medio A. En las japónica no hubo cambios significativos con el medio B respecto al medio A (Figura 13).

Para la diferenciación de plantas, a partir de callos de anteras de arroz, el medio MS es el más utilizado; en el CIAT se emplea este medio con

callos que provienen de los distintos medios de inducción. El tipo de agente gelificante también influye en la regeneración de plantas; utilizando phytigel (1.8 g/lit) o gel-rite (1.5 g/lit) se obtienen mejores resultados que usando agar. En el CIAT, el phytigel es el gelificante que se utiliza rutinariamente.

Carbohidratos. Los carbohidratos (azúcares) del medio basal satisfacen los requerimientos de moléculas de carbono como fuente de energía. Por lo general, altos niveles de sacarosa estimulan la inducción de callos de anteras de arroz; se han recomendado concentraciones de 4% a 6% (Chen et al., 1991). En general, para la inducción de callos se requieren niveles más altos de sacarosa que para la regeneración de plantas. La mayoría de los investigadores utilizan generalmente sacarosa al 3% en el medio de diferenciación.

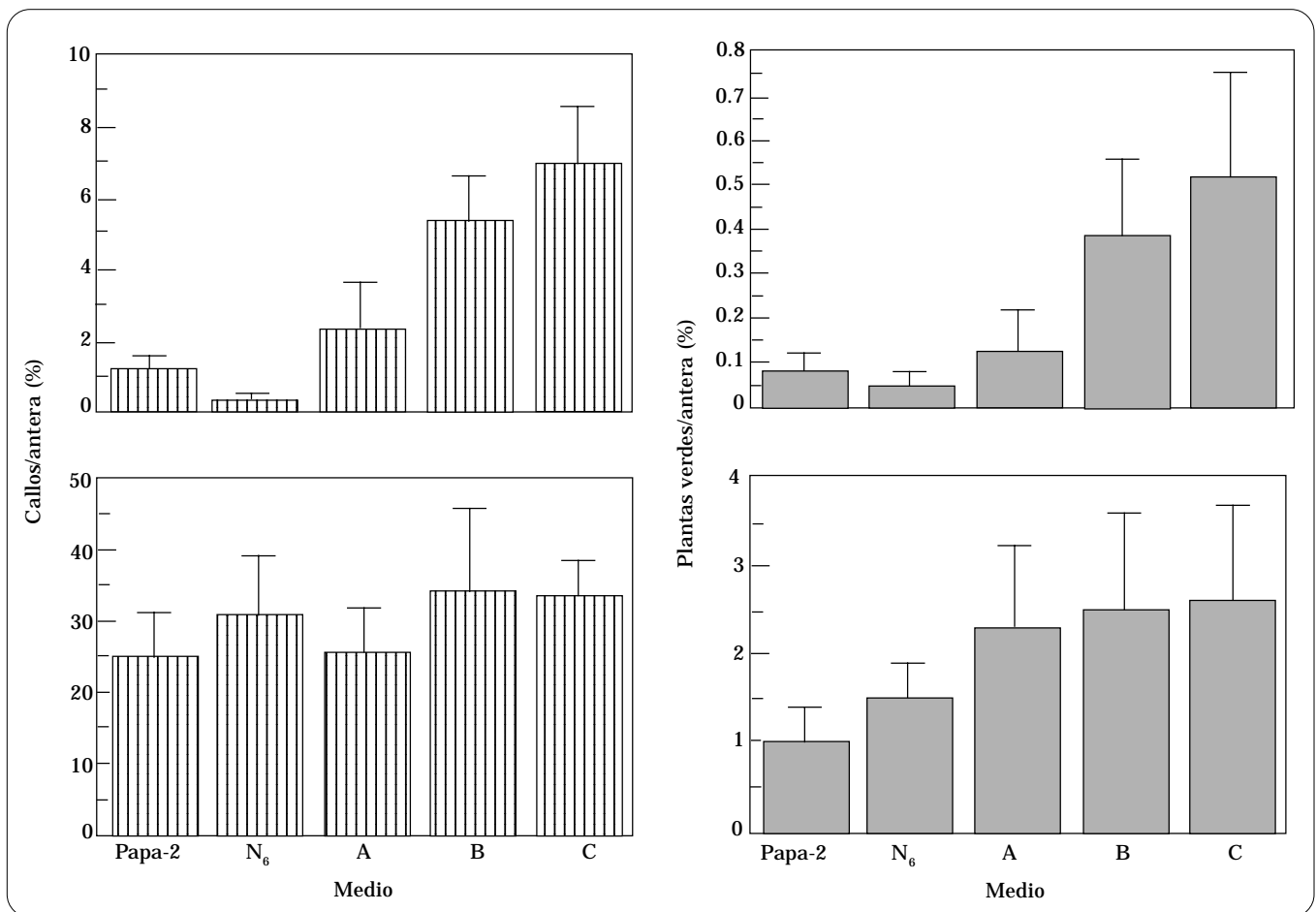


Figura 13. Respuesta al cultivo de anteras en genotipos comúnmente cultivados o utilizados en fitomejoramiento. Los dos gráficos de arriba corresponden a 23 genotipos del tipo indica, y los dos de abajo a 11 del tipo japónica.

Estudios realizados en el CIAT (Lentini et al., 1995) mostraron que al reemplazar la sacarosa al 5% (146 mM) por maltosa al 5% (146 mM), se obtiene un incremento significativo en la inducción de callos de genotipos indica recalcitrantes y japónica de secano (Figura 14A). Al 5%, la maltosa es más inductiva que al 1% (29 mM), o al 3% (88 mM). Investigaciones recientes indican que para algunos genotipos se obtiene una mayor inducción de callos con maltosa al 8% (234 mM) o al 10% (292 mM), pero lo más notable es que la producción de plantas verdes de callos inducidos con estas concentraciones se incrementa significativamente (Figura 14B). En algunos genotipos, la maltosa incrementa también la proporción entre plantas verdes y albinas (Figura 14C).

Además de la maltosa, se evaluaron otros carbohidratos y se observó que la glucosa al 5% (292 mM) inhibe la inducción de callos. También se observó que la combinación de 2% de maltosa (58 mM) con 3% de manitol (167 mM) o con 7% de almidón de arroz, y la de 2% de sacarosa (58 mM) con 3% ó 5% manitol (167 ó 274 mM, respectivamente) son menos inductivas que la maltosa al 5%. A diferencia de lo que ocurre en la inducción de callos, en el medio de regeneración la sustitución de sacarosa por maltosa no incrementa la formación de plantas verdes.

Los carbohidratos pueden servir no sólo como fuentes de carbono sino como reguladores osmóticos en el medio de cultivo (Last y Brettell, 1990; Roberts-Oehlschlager et al., 1990). Estas dos funciones son críticas para el desarrollo de callos y embriones.

La sacarosa se hidroliza rápidamente en glucosa y fructosa, incrementando la osmolalidad del medio a los 3 días de cultivo; después de este período, no se detecta sacarosa en el medio (Last y Brettell, 1990). A consecuencia de la hidrólisis de la sacarosa, la osmolalidad del medio se duplica. La hidrólisis puede ser el resultado de una alta actividad de la enzima invertasa, que se encuentra en las paredes de la antera; esta actividad se puede incrementar después de que la antera se aísla y se cultiva in vitro, o como resultado de la senescencia de la antera.

La fructuosa tiene un efecto significativamente inhibitorio sobre el desarrollo de embriones originados de microsporas en trigo (Navarro-Alvarez et al., 1994). Ese efecto puede ser más significativo que los cambios en el potencial

osmótico del medio producidos por la hidrólisis de la sacarosa (Last y Brettell, 1990). Por otra parte, la sacarosa también estimula la producción de etileno en tejidos cultivados in vitro (Meir et al., 1984); la acumulación de etileno dentro del recipiente de cultivo está asociada con el desarrollo deficiente y la necrosis alta de los callos de arroz producidos a partir de semillas (Adkins et al., 1990).

La hidrólisis de la glucosa, la maltosa o el manitol no es detectable en el medio de cultivo (Roberts-Oehlschlager et al., 1990). Inicialmente, la glucosa puede estimular los primeros estados de desarrollo en el CA, pero posteriormente puede ser inhibitoria, a menos que se metabolice rápidamente por acción de las anteras inducidas (Roberts-Oehlschlager et al., 1990). El manitol promueve los estados iniciales de inducción, pero no puede mantener el desarrollo hasta la formación del callo. Un estudio reciente realizado en cebada muestra que las microsporas, cultivadas con sacarosa, glucosa o fructuosa en concentraciones de 2 a 175 mM, mueren en 3 a 11 días. Sin embargo, la viabilidad de las microsporas se incrementa significativamente cuando la concentración de maltosa se aumenta de 20 mM (1%) a 175 mM (6%) (Scott y Lyne, 1994).

Reguladores del crecimiento. Los constituyentes más cruciales en el CA de arroz son las auxinas y las citocininas, entre las cuales se destacan:

- Auxinas: ANA (ácido naftalenacético); 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético); AIA (ácido indolacético); AIB (ácido indolbutírico); Picloramo; Dicamba y AFA (ácido fenilacético).
- Citocininas: BAP (6-benzilaminopurina); 2 iP (N_6 -2-iso penteniladenina); Cinetina (6-furfurilamonopurina); Zeatina y Thiadazuron.

Para el desarrollo de callos, las auxinas, en concentraciones medias y altas, actúan sinérgicamente con las citocininas en concentraciones bajas. Para la etapa de diferenciación, las auxinas, a bajas concentraciones, estimulan el enraizamiento, mientras que las citocininas, en altas concentraciones, favorecen el desarrollo de los brotes, tallos y hojas, pero inhiben el enraizamiento. Para regenerar plantas enraizadas es muy importante realizar una combinación de auxinas y citocininas en una proporción de 1:4 ó de 1:2.

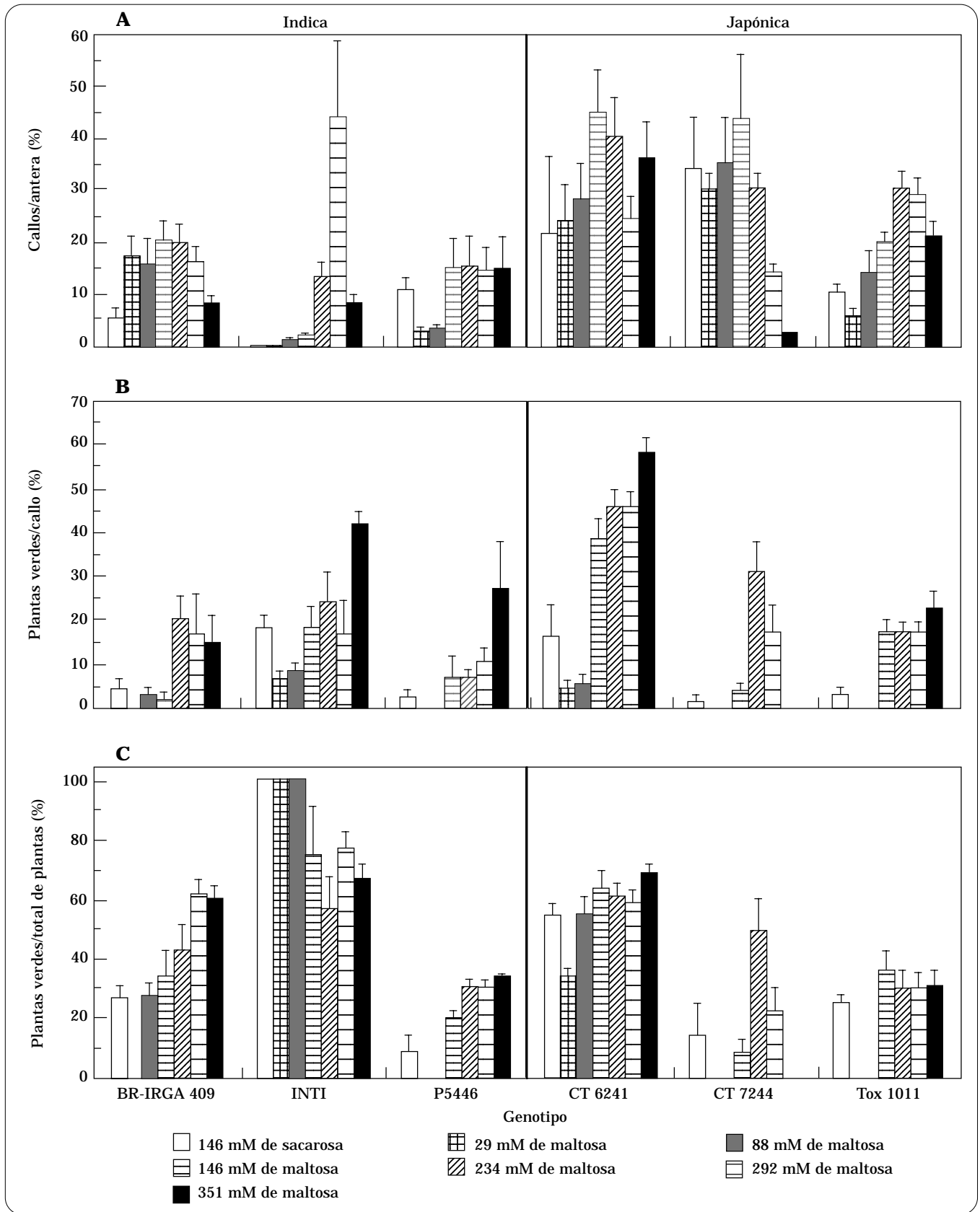


Figura 14. Efecto de la sacarosa y la maltosa: A) en la inducción de callos en el medio basal B; B) y C) en la regeneración de plantas verdes de los callos inducidos al transferirlos al medio MS. Las barras representan el error estándar.

El 2,4-D, como fuente de auxinas, generalmente se utiliza para la inducción de callos, puesto que tiende a inhibir la organogénesis; en cambio, el ANA, además de favorecer la producción de callos, no impide la diferenciación posterior.

El resultado de investigaciones realizadas en cultivo de arroz, en varios laboratorios, indican que: a) es necesario incluir al menos una auxina y una citocinina 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 cinetina mayores que 1 mg/lit en el medio de inducción promueven la producción de albinas; d) concentraciones de 1 mg/lit de ANA y 4 mg/lit de cinetina en el medio de regeneración incrementan la formación de plantas verdes.

Los resultados del CIAT muestran que la embriogénesis de callos se puede promover utilizando conjuntamente 2 mg/lit de 2,4-D y 0.07 mg/lit de picloramo en el medio de inducción (Lentini et al., 1995). La adición de 2,4-D o de ANA solos tiene un efecto menos inductivo. Por su parte, Dicamba, con o sin Picloramo, promueve una inducción de callos en forma similar al 2,4-D, pero la regeneración de plantas a partir de esos callos es altamente inhibida. En contraste con Dicamba, el AFA en concentraciones de 2, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/lit inhibe significativamente la inducción de callos, inclusive de aquellos genotipos con mayor respuesta; además, muy pocos callos se diferencian en plantas. La inducción de callos con 0.5 mg/lit de Cinetina es equivalente a la obtenida con 0.1 mg/lit de Zeatina.

La regeneración de plantas verdes es óptima cuando se utilizan ANA y Cinetina en una proporción de 1 mg/lit:4 mg/lit. Thiadazuron, compuesto con una fuerte acción similar a la de las citocininas, inhibe la diferenciación de plantas cuando está en concentraciones de 0.1, 0.5 y 1.0 mg/lit, y las pocas plantas verdes formadas son anormales. Sería interesante evaluar concentraciones más bajas de este compuesto.

Otros aditamentos. La adición de 5 a 10 mg/lit de nitrato de plata (AgNO_3) en el medio de inducción reduce notablemente la senescencia de las anteras de arroz tipo índica recalcitrantes; como resultado, para algunos genotipos hay un incremento en la inducción de callos, hasta de siete veces la obtenida sin ese producto (Figura 15). Concentraciones mayores que 15 mg de AgNO_3 son inhibitorias para la mayoría de los genotipos.

El AgNO_3 ha sido utilizado para estimular la inducción y la regeneración de plantas verdes de varias especies, a partir de callos embriogénicos. En arroz, a diferencia de lo que ocurre en otras especies, la presencia del AgNO_3 en el medio de regeneración inhibe la diferenciación de plantas. El ion plata es un inhibidor de la acción del etileno.

Estos resultados indican que el etileno acumulado en el envase del cultivo puede estar inhibiendo la formación de callos de arroz índica, efecto que probablemente es revertido con la aplicación del AgNO_3 .

En estudios sobre los factores que afectan la formación de plantas verdes, se ha encontrado que al reducir la concentración de sacarosa del 3% al 2%, y simultáneamente adicionar 10 mg/lit de putrescina, se incrementa la diferenciación de plantas de un 30% a un 50%; esto se ha observado en un genotipo japonico tropical de secano que el Programa de Mejoramiento de Arroz del CIAT usa frecuentemente para buscar la adaptación a suelos ácidos. La putrescina, un tipo de poliamina, tiene un efecto mayor cuando el medio de regeneración contiene 2% sacarosa.

Observaciones preliminares mostraron que la reducción de sacarosa del 3% al 2% en el medio de regeneración incrementa el número de callos con puntos de diferenciación; sin embargo, solamente un 20% de éstos desarrollan plantas. En los genotipos índica estudiados no se observó ningún efecto.

La putrescina incrementa el alargamiento de los coleóptilos de arroz in vivo bajo condiciones anaeróbicas (Reggiani et al., 1989). Esto sugiere que los bajos niveles de oxígeno dentro del envase del cultivo pueden ser inhibitorios para la diferenciación de plantas de genotipos de arroz de secano, pero que posiblemente no afectan aquellos genotipos adaptados a condiciones de inundación. Es necesario evaluar un mayor número de genotipos de secano para establecer si la putrescina se puede utilizar rutinariamente.

Medio óptimo. En investigaciones del CIAT se ha comparado el medio Papa-2 con el medio de inducción C (Cuadro 2), el cual es suplementado con: 2 mg/lit de 2,4-D; 0.07 mg/lit de Picloramo; 1 mg/lit de Cinetina; 5% de maltosa y 10 mg/lit de AgNO_3 . Los resultados (Cuadro 4) sugieren que en las variedades índica es posible incrementar la inducción de callos de 0.6% en Papa-2 a 20.6% (34 veces) en el medio C; en las japónica de secano

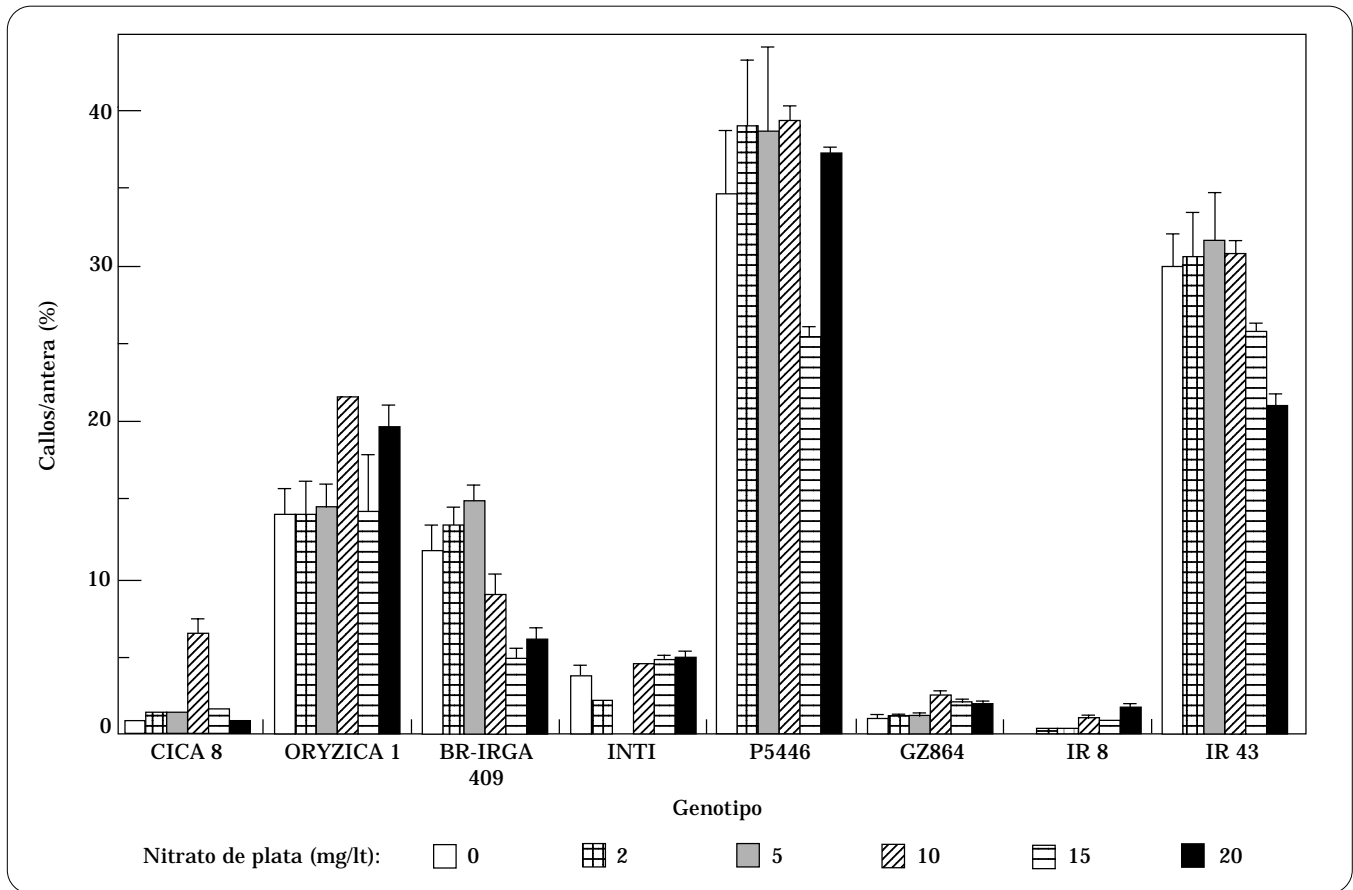


Figura 15. Efecto del nitrato de plata en la inducción de callos de arroz tipo indica.

se puede incrementar de 11.2% a 32.2% (2.9 veces) (Lentini et al., 1995).

Callos inducidos en el medio C aumentan 35 veces la formación de plantas verdes en el caso de las indica, y 12 veces en el de las japónica de secano, con respecto al medio Papa-2, cuando tales callos se someten a diferenciación en: medio MS, 1 mg/lt de ANA, 4 mg/lt de Cinetina, 3% de sacarosa y 0.18% de phytagel. Un promedio del 60% de las plantas verdes son diploides (DH) en las indica, y 42% en las japónica de secano (Cuadro 4), lo que da como resultado un rendimiento de 1.3 DH por cada 100 anteras cultivadas tipo indica, y 2.3 DH por 100 anteras japónica de secano.

En contraste, utilizando un medio más simple como el medio A, y genotipos japónica de riego de alta respuesta como el cruzamiento Teuyuake x Tashiro-Mochi, se puede obtener un rendimiento promedio de 21 DH por cada 100 anteras

sembradas. El medio C ha demostrado ser óptimo para los 23 genotipos indica evaluados (Figura 13) y para un gran número de genotipos con baja respuesta, como los japónica de secano procesados en el laboratorio del CIAT para la producción de líneas de mejoramiento (Lentini et al., 1995).

Actualmente se utiliza maltosa al 8% en forma rutinaria. En los genotipos japónica de riego no se encuentran diferencias significativas entre los medios A y C (Figura 13).

Condiciones físicas de incubación para la inducción de callos y la 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

Cuadro 4. Respuesta^a al cultivo de anteras de diferentes tipos de arroz, en los medios A, B y C.^b

Tipo de arroz	Genotipo	Callos/anteras (%)			Plantas verdes/anteras (%)			DH ^c (%)
		A	B	C	A	B	C	C
Indica	CICA 8	0.2	0	16.3	1.6	0.8	0.6	33
	Oryzica 1	1.8	14.0	21.4	0	0	0.4	56
	BR-IRGA 409	8.8	14.3	26.3	0	0	2.1	50
	Inti	0.6	4.6	7.4	0	2.2	4.8	74
	GZ 864-2-3-1	3.3	4.1	22.5	1.4	0.3	2.0	80
	P 5446-6-6-1-13	9.2	21.5	39.3	0	2.8	4.4	38
	IR 8	0.1	0.2	0.9	0	0.1	0.1	100
	IR 43	26.6	22.0	30.6	1.4	1.8	2.0	50
	Media	6.3	10.1	20.6**	0.6*	1.0*	2.1**	60
	Error estándar	3.1	3.2	4.4	0.3	0.4	0.6	8
Coeficiente de variación	133	84	56	130	104	80	13	
Japónica secano	CT 6241-17-1-5-1	21.4	44.5	46.5	3.5	15.4	17.0	36
	Ceysvoni	2.5	3.6	15.3	0	0	0.1	42
	Tox 1011-4-1	10.4	24.4	22.1	0.31	1.3	3.3	50
	Oryzica Sabana 6	34.0	43.5	45.2	0.4	1.4	1.7	40
	Media	17.1	29.0	32.2	1.1	4.5	5.5	42
	Error estándar	6.8	9.7	7.9	0.8	3.6	3.9	3
	Coeficiente de variación	80	67	49	156	161	140	14

a. Promedio de al menos tres repeticiones, cada una de 3250 anteras/genotipo por tratamiento.

b. Ver la composición de los medios A, B y C en el Cuadro 2.

c. DH = doble haploide.

* y ** Diferencia significativa a un nivel de probabilidad de 0.05 y 0.01, respectivamente.

FUENTE: Lentini et al., 1995.

de plantas está entre 24 y 26 °C. A temperaturas superiores a 28 °C, las anteras se degeneran rápidamente, hay una disminución en la formación de callos y en la tasa de regeneración de plantas y un aumento en la presencia de plantas albinas.

La luz no es necesaria para la fase de inducción, y el crecimiento de los callos se favorece con la oscuridad. Sin embargo, una vez que los callos se transfieren al medio de regeneración, se necesita la luz para el proceso de fotosíntesis en el desarrollo de las plantas verdes. El cambio de oscuridad a luz debe ser progresivo, exponiendo primero 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 son la composición de la atmósfera del recipiente de cultivo (Johanson 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).

Las investigaciones del CIAT muestran que el uso de AgNO_3 , un inhibidor del etileno, incrementa la inducción de callos de genotipos indica, pero no tiene efecto en la diferenciación de plantas (Lentini et al., 1995). También se evaluó el efecto de la densidad de las anteras inoculadas, incrementándola de 25 anteras/ml en medio líquido, que es la densidad normalmente utilizada en el CIAT, a 50 anteras/ml, densidad óptima para la cebada; sin embargo, la inducción de callo fue similar en ambos casos.

Los resultados del CIAT también sugieren que en medio líquido la senescencia de las anteras se reduce y la inducción de callos se aumenta respecto al medio sólido o al semisólido. Resultados similares fueron obtenidos por Tsay y Chen, 1984.

Utilización del Cultivo de Anteras en Mejoramiento

Se han realizado numerosos estudios teóricos y experimentales para definir las condiciones en las cuales el mejoramiento con cultivo de anteras (CA) puede ser de utilidad, particularmente para el desarrollo de variedades en cultivos autógamos. A continuación se presentan algunas observaciones y ejemplos que ilustran las implicaciones genéticas y prácticas del uso del CA en un programa de mejoramiento de arroz.

Evaluación y Selección de Doble Haploides

Las plantas doble haploides (DH) obtenidas de CA son homocigotas y, por consiguiente, podrían pasar directamente a ensayos de rendimiento.

Sin embargo, antes de su formación, esas plantas no han pasado por un proceso de evaluación y selección por otras características agronómicas como resistencia a enfermedades, resistencia a insectos, calidad de grano, tolerancia a distintos problemas bióticos y abióticos, y adaptación a un ecosistema determinado. Es una situación bastante diferente a lo que ocurre con los materiales genéticos desarrollados mediante los métodos estándar de mejoramiento, como lo es el de pedigrí; estos materiales generalmente llegan a la generación F_5 o F_6 ya evaluados y seleccionados sobre la base de una serie de características deseables.

En otras palabras, el hecho de que se obtengan líneas DH no quiere decir que de por sí ellas constituyan variedades mejoradas superiores. En realidad, la población DH representa el punto de partida para que el fitomejorador empiece su ciclo de evaluación y selección.

El proceso de evaluación y selección de los DH podría empezar en la generación R_1 (plantas regeneradas provenientes del laboratorio). Sin embargo, como estas plantas han pasado por un gran estrés *in vitro* y luego por un proceso de aclimatación, se sugiere que en esta generación no se aplique una presión de selección fuerte.

Es muy importante recordar que, como consecuencia del CA, en la R_1 aparecen plantas con

distintos niveles de ploidía (haploides, diploides, aneuploides, poliploides, etc.), las cuales presentarán diferentes grados de esterilidad y de características morfológicas. Desde el punto de vista práctico, las plantas más importantes para el mejorador son las diploides, las cuales tendrán una apariencia normal.

De cada planta R_1 seleccionada se debe cosechar toda la semilla por separado y, dependiendo de la cantidad de esa semilla en la generación R_2 , se podrán realizar evaluaciones de calidad de grano y tolerancia a plagas y enfermedades, entre otras. En esta R_2 sí se puede aplicar una presión de selección alta, y las mejores líneas se pueden pasar a ensayos de rendimiento (Figura 16). De aquí en adelante, el proceso de evaluación y selección es idéntico al seguido en el método convencional de mejoramiento.

Uso de Doble Haploides. Algunos Ejemplos

El CA ha demostrado ser una técnica útil para acelerar la introgresión de características deseables en distintos tipos de poblaciones. En el Cuadro 5 se mencionan 32 variedades obtenidas mediante este método y liberadas en un lapso de 16 años (1975 a 1991).

Con el CA se facilita el proceso de generación de germoplasma, ya que las líneas obtenidas por ese método son homocigotas; tales líneas se pueden sembrar inmediatamente en ensayos preliminares de rendimiento, para evaluarlas y seleccionarlas bajo las condiciones deseadas y de acuerdo con los problemas locales. En 1 año, las líneas homocigóticas (R_3) están listas para ser ensayadas en las áreas de interés. Por duplicación espontánea de los cromosomas, por lo menos un 50% de las plantas regeneradas se tornan homocigóticas; además, un 90% de la progenie del DH es homogénea y estable.

De esa forma, los investigadores pueden acortar el tiempo requerido para desarrollar una variedad, y pueden también utilizar tales materiales como progenitores en programas de cruzamiento.

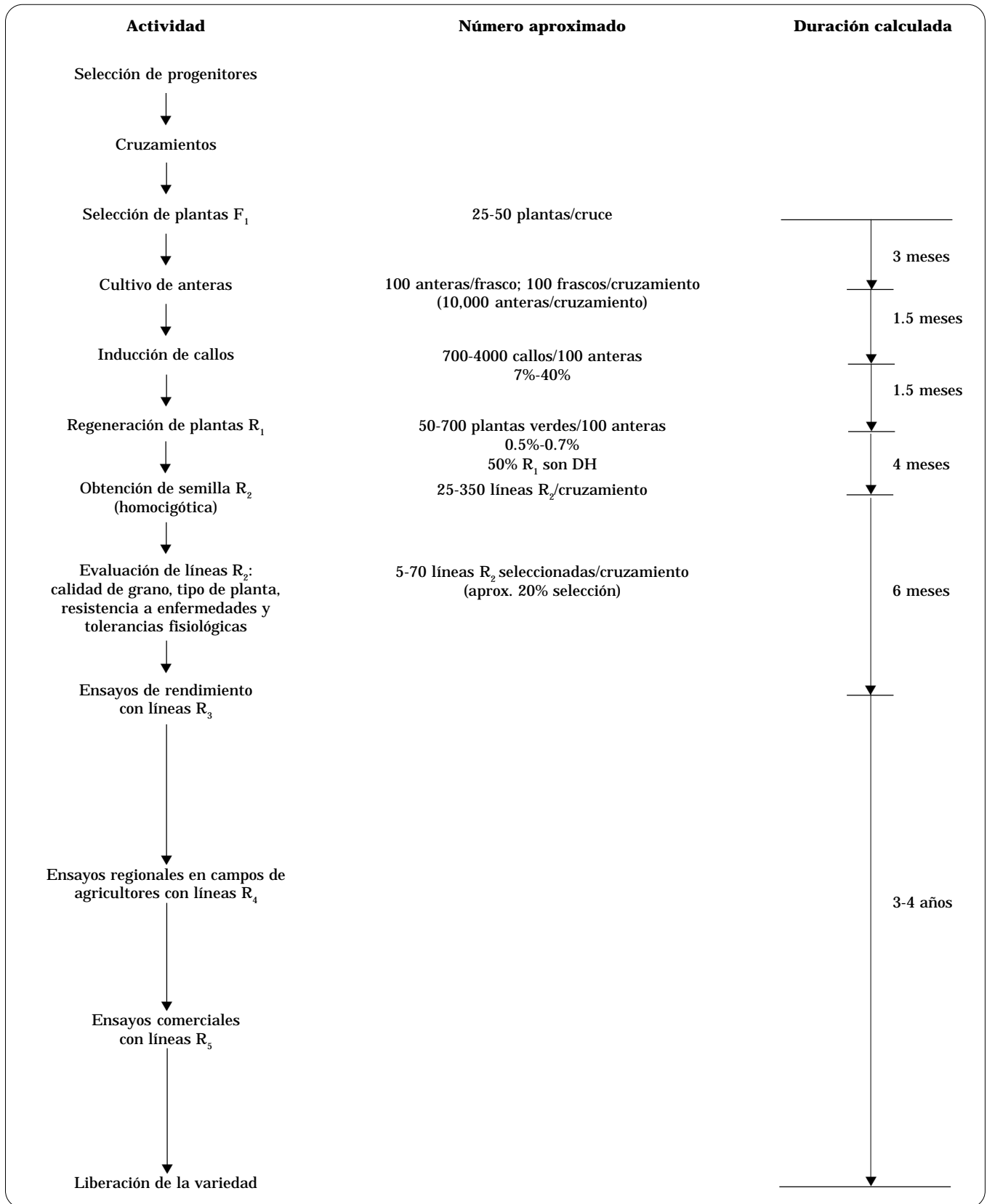


Figura 16. Procedimiento general para el mejoramiento de arroz mediante el cultivo de anteras.

Cuadro 5. Variedades de arroz desarrolladas utilizando cultivo de anteras^a.

Variedad	Año de liberación	País	Características
Late keng 959	1975	China	Alta productividad
Xin Xion	1975	China	s.i.
Hua Yu 1	1976	China	Alto rendimiento en suelos ácidos
Hua Yu 2	1976	China	s.i.
Xin Xun	1976	China	Alto rendimiento
Zhengen 66	1979	China	Tolerante al frío, resistente a piricularia, buena calidad de grano, alto rendimiento, resistente a <i>Xanthomonas</i>
Tafene 1	1980	China	s.i.
Zong Hua 2	1980	China	s.i.
Zong Hua 6	1980	China	s.i.
Zong Hua 10	1980	China	s.i.
Zong Hua 11	1980	China	s.i.
Zong Hua 12	1980	China	s.i.
Huahanzhao	1981	China	Temprana, buena calidad de grano, tolerante al frío, resistente a enfermedades
Zhe Keng 66	1982	s.i.	Resistente al añublo bacteriano 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	s.i.
369	1983	China	s.i.
Yinghua 2	1983	China	s.i.
Hwaseongbyeon	1985	Corea	Temprana, enana, alto rendimiento, resistente a piricularia, añublo bacteriano y rayado de la hoja, tolerante al frío y buena calidad de grano
Huayu 15	1985	s.i.	Alto rendimiento
Hirohikari	1986	Japón	Temprana, resistente al vuelco, buena calidad de grano
Hirohonami	1986	Japón	Temprana, resistente a piricularia, alto rendimiento, buena calidad de grano
Milyang 90	1987	Corea	Resistente a insectos y al virus de rayado, buena calidad de grano
Hwajinbyeon	1988	Corea	Madurez media-tardía, enana, alto rendimiento, resistente a piricularia, añublo bacteriano y rayado de la hoja, tolerante al frío y de buena calidad
88-26	s.i.	s.i.	Temprana, resistente al vuelco, alto rendimiento
Hua Pei 438	s.i.	s.i.	Resistente al añublo bacteriano de la hoja, alto rendimiento, buena calidad de grano
Fan 5	s.i.	s.i.	Resistente al añublo bacteriano de la hoja, alto rendimiento, buena calidad de grano

a. s.i. = sin información.

Germoplasma tolerante al frío

En el Programa de Arroz del CIAT, el CA ha facilitado y acelerado el desarrollo de líneas con características específicas para determinados ecosistemas latinoamericanos.

Un ejemplo de lo anterior es el caso de Chile, donde se requieren variedades tolerantes a bajas temperaturas, precoces y de buena calidad molinera y culinaria. En esas latitudes sólo es posible sembrar arroz una vez al año, lo cual implica que para obtener una variedad mejorada por los métodos estándar de mejoramiento se requieran de 12 a 15 años. Utilizando el CA, el proceso se reduce significativamente.

En 1985 se realizaron cruzamientos triples entre los cultivares chilenos Diamante y Quillas (tolerantes a bajas temperaturas) y la variedad Lemont (de alta calidad de grano) procedente de los Estados Unidos. Estos cruzamientos se procesaron por medio de CA para desarrollar líneas R_2 y, además, se sometieron a selección mediante el método de pedigrí. Se observó que mientras las generaciones F_1 y F_2 presentaron alta esterilidad, y sólo se produjeron 234 familias F_2 , por el CA se obtuvieron 941 líneas R_2 .

Las líneas producidas se evaluaron y seleccionaron en Chile por tolerancia al frío, calidad, precocidad, rendimiento y adaptación; así se identificaron 18 de ellas como promisorias, las cuales pasaron luego a pruebas demostrativas en fincas de agricultores. En 1995, una de tales líneas fue lanzada como variedad en Francia, con el nombre de INCA; esta variedad supera las convencionales en términos de calidad de grano, precocidad y potencial de rendimiento. Asimismo, posiblemente en corto tiempo Chile también lance una o dos de esas líneas como variedades.

Todo ese material ha servido, además, como base para generar germoplasma adecuado para otros lugares de Brasil (Río Grande do Sul), de Uruguay, de Argentina y de Cuba, en donde el arroz se ve afectado por temperaturas bajas en ciertas épocas del año.

Germoplasma para condiciones de secano

Al igual que en las regiones afectadas por temperaturas bajas, en el trópico el CA abre nuevas

perspectivas para la obtención más rápida de variedades, especialmente para las condiciones de secano en suelos ácidos de sabana, donde la distribución de las lluvias sólo permite una cosecha anual.

En los cruzamientos entre arroz de secano y de riego, al igual que en cruzamientos amplios entre materiales índica y japónica, la esterilidad es con frecuencia muy alta. Ese problema se ha podido obviar, en parte, mediante el CA; en el laboratorio del CIAT se han obtenido DH fértiles a partir de cruzamientos estériles entre cultivares de riego y secano (Cuadro 6).

No es claro por qué el CA permite recobrar un mayor número de líneas fértiles. Es posible que la esterilidad en estos cruzamientos sea del tipo gametofítico, lo que permite regenerar plantas a partir de las microsporas segregantes con carga genética asociada a la fertilidad. La obtención de estas plantas fértiles, a partir de cruzamientos entre variedades de riego y de secano, ha facilitado el desarrollo de líneas DH, como la línea CT 9586-14-CA7 (Cuadro 7), que presenta el tipo de planta y la calidad de grano característicos del germoplasma de riego, y las raíces tipo secano asociadas con tolerancia a la sequía (Figura 17, Láminas en Color).

Germoplasma con otras características útiles

Bruzzone (1991) estudió el comportamiento de progenies derivadas del CA de plantas F_1 y F_2 provenientes de cuatro cruzamientos entre cultivares de riego y secano. El encontró que los DH originados a partir de la F_1 eran superiores en términos de fertilidad y peso de 1000 granos, y que para otros parámetros estudiados como altura,

Cuadro 6. Número de líneas fértiles obtenidas a partir de cruzamientos altamente estériles, entre cultivares de riego y secano.

Cruzamiento no.	Líneas según método (no.)	
	Pedigrí	Cultivo de anteras
CT 9985	0	42
CT 10015	0	78
CT 10053	4	136
CT 10058	0	63

Cuadro 7. Características agronómicas de doble haploides seleccionados de un híbrido seco x riego.

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

a. Contenidos de amilosa en algunos cultivares: IR8 = 33%; Blubonet 50 = 26%; Colombia 1 = 21%.

floración, número de granos por panícula y número de panículas por metro cuadrado no había diferencias entre estas generaciones.

Recientemente, en un estudio realizado por el Programa de Arroz del CIAT (Pérez-Almeida, 1993) se comparó la diversidad genética obtenida en cuanto a resistencia a piricularia de la hoja y del cuello, en poblaciones DH y líneas S₂ obtenidas a partir de 11 cruzamientos dobles utilizados en un programa de selección recurrente. Por cada cruzamiento se evaluaron 10 líneas DH y 10 líneas S₂ escogidas al azar.

En ese estudio se encontró que el rango de variación por resistencia a piricularia de la hoja y del cuello, y para otras características agronómicas, fue mayor en el caso del CA (Figura 18). Esto sugiere que el CA produjo extremos de variación no encontrados en el caso de poblaciones segregantes convencionales, lo que para el fitomejorador puede significar la obtención de genotipos de mucho valor.

Por otra parte, el Programa de Arroz del CIAT también viene utilizando el CA para acelerar la diversificación y la ampliación de la base genética presente en el germoplasma de arroz en América Latina y el Caribe, y para facilitar el mapeo con marcadores moleculares de genes de importancia económica, como son los de resistencia al virus de la hoja blanca, y a piricularia (Figura 19, Láminas en Color).

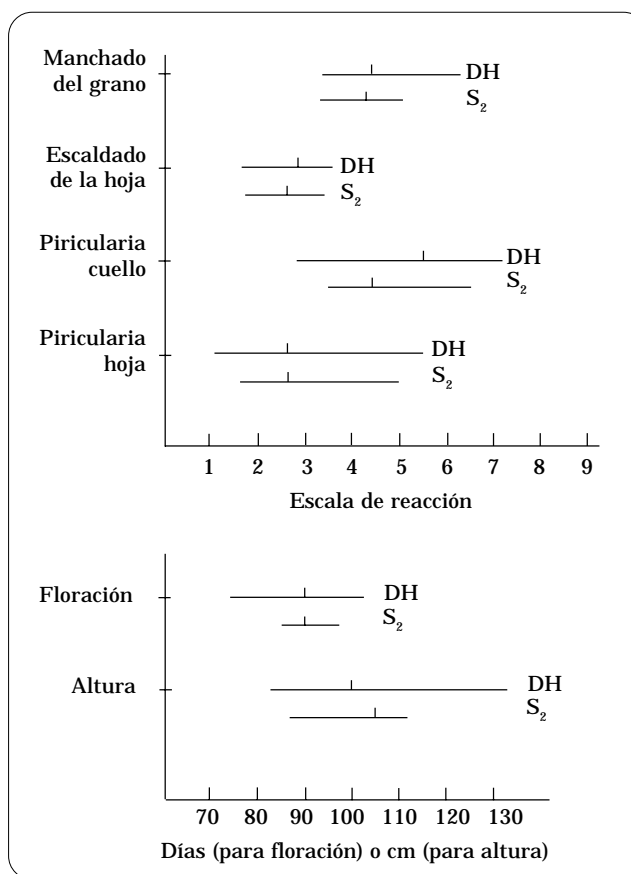


Figura 18. Variación entre líneas doble haploides (DH) y las obtenidas por pedigrí (S₂). Las líneas horizontales frente a cada parámetro denotan los rangos de reacción en una escala donde 1 = inmune y 9 = altamente susceptible. Toda reacción ≤ 4 indica resistencia. Las pequeñas líneas verticales señalan la media de la población.

Implicaciones Económicas del Cultivo de Anteras en el Desarrollo de Variedades

Muy poco se sabe de las implicaciones económicas que tiene el uso del cultivo de anteras (CA) en el desarrollo de variedades. Sin embargo, tal información es necesaria para facilitar la toma de decisiones acerca de la incorporación de esa técnica como una herramienta para el fitomejoramiento.

El Programa de Arroz del CIAT realizó un análisis económico de los costos y beneficios del CA en el desarrollo de variedades, comparándolo con el método de pedigrí (Cuadro 8), que se usa comúnmente en el mejoramiento de arroz (Sanint et al., 1993).

Estimación de los Costos en el Método de Pedigrí

Para estimar los costos en relación con el método de pedigrí, se consideró el desarrollo de las variedades Oryzica Llanos 4 y 5, del tipo indica, para condiciones tropicales con riego, durante 7 años. Se incluyeron los costos desde la F_1 hasta la F_6 , los de los ensayos de rendimiento regionales y comerciales, y los correspondientes a los salarios.

Esas estimaciones condujeron a un costo aproximado de US\$204,000 (Cuadro 8) por variedad para las condiciones tropicales con riego (indica, dos siembras por año durante 7 años). En

el caso de las condiciones templadas con riego (japónica para riego) y en seco (sabana tropical, japónica sin riego) y con una siembra por año durante 12 años, los costos se calcularon incrementando en 71% los US\$204,000 estimados para las variedades indica en condiciones tropicales con riego; eso dio como resultado, para las condiciones templadas, un total de US\$350,000 por variedad (Cuadro 8).

Estimación de los Costos en el Cultivo de Anteras, y Observaciones

Para estudiar la respuesta al CA se consideraron 570 genotipos adaptados a diversos ecosistemas, y los costos fijos y variables que, a nivel de laboratorio en el CIAT, se requerían para producir, por lo menos, una línea con todas las características necesarias para su liberación como variedad. El análisis incluyó cinco niveles de operación (siembras de 5,500, 50,000, 100,000, 150,000 y 200,000 anteras por semana) para buscar un óptimo.

Los costos considerados se refieren a una inversión inicial de US\$60,000 (para infraestructura, equipos, y recipientes y utensilios de vidrio), y un presupuesto semestral de

Cuadro 8. Costos totales estimados para obtener una variedad con cultivo de anteras (CA), en comparación con los costos calculados para la obtención por el método de pedigrí (MP).

Tipo de arroz	MP Costos (US\$)	CA			Actividad óptima (anteras/semana)
		Costos (US\$)	Ahorro respecto a MP (US\$)	(%)	
Indica	203,791	121,385 ^a	82,046	29	60,000
Indica	203,791	119,791 ^b	84,500	30	34,000
Japónica riego	348,483	195,438 ^a	153,044	44	5,500
Japónica seco	349,799	213,442 ^a	135,240	40	117,000
Indica x japónica seco	349,799	128,849 ^a	74,942	37	150,000

a. Callos inducidos en medio A.

b. Callos inducidos en medio C.

US\$11,000 (para el pago de salarios, reactivos y costos de depreciación). El laboratorio opera con un equipo humano de cinco técnicos y un asistente de investigación, más el 20% del tiempo de un supervisor. Su capacidad de procesamiento es de 150,000 anteras por semana.

En el presente estudio se observó que el nivel óptimo de operación para obtener mayor ahorro en el CA, varió desde 5,500 anteras por semana para el tipo japónica de riego, hasta 150,000 anteras por semana para índica x japónica de seco (Cuadro 8). Con estos niveles de operación es posible sembrar, en 3 meses, el número de anteras requerido para desarrollar una variedad para condiciones templadas con riego (japónica para

riego), y en 7.5 meses para desarrollar una variedad para los otros ecosistemas (tropical de riego y seco).

El estudio indicó que, en comparación con el método de pedigrí, el CA puede reducir los costos entre US\$75,000 (índica x japónica seco) y US\$153,000 (japónica de riego) por variedad desarrollada, dependiendo del genotipo y del ecosistema considerados. Esto representa un ahorro hasta del 44% por parte del CA.

El análisis que se hizo sugiere que la puesta en ejecución del cultivo de anteras ofrece una tasa marginal interna de retorno del 28% al 60% en el desarrollo de variedades.

Procedimiento General para el Cultivo de Anteras de Arroz

El cultivo de anteras (CA) consiste básicamente en colocar las anteras, que son las que contienen los granos de polen inmaduros, en un ambiente que sea estéril y pueda mantenerse en esa condición, y proveerlas de las sustancias químicas y los regímenes de temperatura y luz apropiados para el desarrollo del callo y la posterior diferenciación de las plantas.

Este capítulo contiene el protocolo completo que se utiliza actualmente en el CIAT, desde la siembra de las anteras hasta la evaluación de las plantas regeneradas, en el campo. Los procedimientos aquí descritos estarán sujetos a las modificaciones que sean necesarias, de acuerdo con las investigaciones que se realicen.

Producción y Selección del Material Donante de Anteras

Siembra del material donante

La semilla de las plantas F_1 o F_2 se siembra en bandejas, eras, o camas con suelo estéril, donde permanecen durante 20 a 25 días. Para esterilizar el suelo, primero se debe homogeneizar y adicionarle los correctivos químicos necesarios; luego se lo coloca en un vagón esterilizador, a vapor, a una temperatura de 70 a 80 °C, por 1½ a 2 horas.

A los 20 a 25 días, las plántulas se trasplantan al campo, sembrándolas a distancias de 30 cm entre sí, y de 40 cm entre surcos. Estas distancias permiten un buen desarrollo de las plantas y facilitan el desplazamiento de las personas dentro del cultivo para la selección y la cosecha de las panículas (Figura 20, Láminas en Color). En el campo, el material recibe todas las prácticas normales de manejo del cultivo del arroz (Tascón y García, 1985).

Cuando no es posible sembrar por trasplante, la semilla se puede sembrar directamente en surcos espaciados unos 30 cm, a razón de 0.3 g de semilla por metro.

Selección de las plantas donantes

Para seleccionar las panículas de donde se extraerán las anteras, se escogen las mejores plantas de acuerdo con los objetivos propuestos y teniendo en cuenta el estado óptimo fitosanitario de las mismas, es decir, verificando que estén completamente sanas.

Esa selección de plantas y de panículas se hace a los 60 a 70 días de edad (de acuerdo con el ciclo vegetativo del material genético), en la etapa de embuchamiento. La etapa de embuchamiento se caracteriza por la diferenciación de las espiguillas en la inflorescencia y su crecimiento dentro de la vaina de la hoja bandera.

Selección de las panículas

Es aconsejable seleccionar aproximadamente 100 panículas por cada cruzamiento. De cada planta seleccionada se cosechan dos a tres panículas, conservando su entrenudo y la vaina de la hoja para protegerlas de la contaminación con patógenos del campo.

Al seleccionar las panículas, se debe tener en cuenta que la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas esté en un rango de 4 a 8 cm (Figura 21A, Láminas en Color), aunque puede variar según el genotipo de la planta y las condiciones ambientales en que ella se encuentre. Esa distancia está asociada con el estado de desarrollo de las microsporas correspondiente a las fases uninucleado medio o tardío, que es el óptimo para el CA. Otro criterio que facilita la selección en el momento de la siembra de las anteras es la presencia de flores con glumas de color amarillo verdoso y consistencia frágil (Figura 21B, Láminas en Color), la cual está altamente correlacionada con esos estados.

Para mayor precisión y cuando el tiempo lo permita, la observación al microscopio de los granos de polen ayuda a determinar el estado de desarrollo en que éstos se encuentran.

Para obtener una mayor respuesta al CA, es preferible recolectar las panículas en días soleados, antes de las 10:00 a.m. Justamente después de cosechadas, las panículas se colocan en bolsas de plástico para evitar que se deshidraten. En el laboratorio se limpian externamente con etanol al 70%, se colocan en una bolsa limpia, y se incuban a 8 a 10 °C, por 7 a 8 días.

Cómo determinar el estado de desarrollo del polen

Para seleccionar las panículas en el campo, en especial cuando no se tiene suficiente práctica, es aconsejable determinar el estado de desarrollo en que se encuentra el polen. Esto facilita precisar las características morfológicas indicadoras del estado óptimo para el CA de cada genotipo en estudio, características que pueden variar según la condición ambiental donde se desarrollen las plantas donantes de las anteras. Ese análisis citológico se realiza así:

1. Se incuban las anteras sumergiendo las flores durante 24 horas, a temperatura ambiente, en una solución fijadora compuesta de tres partes de etanol absoluto y una parte de ácido acético glacial, al cual se le agrega cloruro férrico al 0.5%.

Cuando se necesite hacer una determinación rápida, se pueden colocar las flores en la solución fijadora en baño de María a 70 °C por 45 min.

2. Se trituran las anteras con la cabeza de un clavo de hierro, sobre un portaobjetos con dos a tres gotas de acetocarmín al 0.5%.
3. Por último se remueve el exceso de acetocarmín, se coloca el cubreobjetos, y se observa al microscopio con la lente 40X - 100X, para determinar la fase de desarrollo en que se encuentra el polen (Figura 8, Láminas en Color).

Esterilización Superficial de las Panículas

Las panículas, previamente tratadas con una temperatura de 8 a 10 °C por 7 a 8 días, se manejan así:

1. Se sacan de la vaina de la hoja y se toman de la base, sosteniéndolas en forma invertida para

cortar el primer tercio, con tijeras, y desecharlo. Enseguida se corta el tercio medio, que es la única parte de la inflorescencia que se aprovecha (Figura 22, Láminas en Color); al cortarlo se debe evitar el contacto con la mano.

2. El material seleccionado se sumerge en etanol al 70% durante 1 min.
3. Enseguida, las espiguillas se sumergen durante 3 min en un recipiente estéril, que contenga una solución de: a) hipoclorito de sodio al 10% (10 ml de Clorox comercial NaOCl con 5.25% de compuesto activo, y 90 ml de H₂O); b) Tween 80 como agente dispersante (tres gotas por 100 ml de solución), y c) cinco gotas de HCl 1N por cada 100 ml de solución, como acidificante, para aumentar la efectividad del hipoclorito.
4. Luego se lava cuatro a cinco veces el material, en agua destilada estéril.
5. Las panículas desinfectadas se colocan en una caja de petri estéril, con papel filtro humedecido en agua estéril. Esta operación se debe realizar en un lugar limpio, sin corrientes de aire o polvo y preferiblemente en una cámara de flujo laminar de aire estéril.

Aislamiento y Siembra de las Anteras

Con el fin de aislar las anteras de los filamentos, las flores se cortan por su base (Figura 23, Láminas en Color). Entonces, para efectuar la siembra se toman cuatro o cinco flores por el extremo no cortado, por medio de unas pinzas, y se golpean contra el borde interior del frasco que contiene el medio de cultivo para la inducción de callos (medio de inducción) (Figura 24, Láminas en Color).

El frasco tiene 4 cm de diámetro y 7 cm de altura (frasco de compota para bebé) y contiene 10 ml de medio líquido nutritivo. En cada frasco se pueden sembrar las anteras hasta de 50 flores, o sea, un total de 150 a 200 anteras por frasco, teniendo en cuenta que por cada flor caen al medio entre tres y cuatro anteras.

Después de la siembra, los frascos se tapan con papel aluminio asegurándolo alrededor con papel Parafilm adherente, o con tapas de plástico.

Puesto que una panícula generalmente provee 20 flores de las cuales sale un promedio de

70 anteras, por cada 100 panículas resultan aproximadamente 7,000 anteras (40 frascos).

Cultivo de las Anteras y Formación de Microcallos

Tan pronto como se siembran las anteras en el medio de cultivo, los frascos se tapan y se colocan en un lugar oscuro a una temperatura entre 24 y 26 °C, durante 4 a 6 semanas (Figura 25, Láminas en Color). Bajo estas condiciones ocurre la división mitótica de las microsporas, lo cual conduce a la formación de los microcallos. Estos empiezan a aparecer alrededor de los 20 días de cultivo (Figura 26, Láminas en Color) y proliferan entre los 35 y 45 días; a los 40 a 50 días alcanzan un tamaño de 1 a 2 mm, apropiado para ser transferidos al medio de regeneración.

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 60 a 80 ml de un medio sólido de cultivo que promueve la regeneración de plántulas (medio de regeneración). La transferencia de los callos se realiza vaciando un poco del medio líquido de inducción que contiene los microcallos, y utilizando una espátula o bisturí para esparcirlos (Figura 26).

Suponiendo que cada microcallo proviene de un grano de polen inmaduro, es conveniente mantenerlos separados aproximadamente 0.5 cm. Para lograrlo, la transferencia se puede hacer en forma individual, o en grupo para separarlos después, 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 a 15 callos por frasco.

Durante la incubación, los frascos deben mantenerse a una temperatura de 24 a 26 °C. Inicialmente se colocan en una estantería con luz indirecta, por 1 semana. Luego se llevan a una luz directa de 80 a 100 $\mu\text{e.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, la cual se logra con lámparas fluorescentes tipo luz día con alto porcentaje de color azul, y se exponen a un fotoperíodo de 16 horas (Figura 27, Láminas en Color).

Adaptación de las Plántulas para el Trasplante al Suelo

A los 30 a 40 días, cuando las plantas han alcanzado suficiente desarrollo foliar y radical, se retiran manualmente del frasco. Entonces sus raíces se lavan con agua, con el fin de eliminar de ellas los residuos de callos y de medio, y se sumergen en agua por varios días. Esta operación se realiza en el laboratorio (Figura 28, Láminas en Color).

Luego se llevan las plantas al invernadero o a la casa de malla donde se trasplantan a bandejas con suelo estéril y fangueado o sobresaturado (Figura 29, Láminas en Color). La temperatura ambiental no debe ser mayor que 28 a 30 °C, y las plantas se deben proteger del sol directo para evitar su deshidratación. Después de 8 días se fertilizan con una mezcla que contenga 30% de N, 7% de P_2O_5 y 6% de K, aplicando 4 g de fertilizante NPK por litro de agua. Posteriormente, las plantas se pasan a la luz directa en las mismas bandejas.

A las 2 ó 3 semanas, las plantas se trasplantan al campo, donde reciben el manejo propio del cultivo de arroz (Figura 30, Láminas en Color). Cada planta regenerada R_1 es potencialmente un genotipo diferente y se maneja con ese criterio. Se debe tener un cuidado especial para evitar la polinización cruzada, especialmente cuando se utilizan los DH en estudios genéticos.

Evaluación de las Plantas R_1 y las Líneas R_2 , y Selección de la Semilla R_3

Cuando las plantas R_1 han alcanzado la madurez, se evalúan morfológicamente por el nivel del ploidía (Figura 31, Láminas en Color). Las plantas haploides ($n = x$) son, por lo general, pequeñas, débiles, con problemas de crecimiento y estériles. Las diploides DH ($n = 2x$) son plantas fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla. Las poliploides son plantas que generalmente muestran un mayor crecimiento, con estructuras florales más desarrolladas, granos con aristas largas, y parcialmente estériles.

La semilla de las plantas DH se cosecha para su posterior evaluación.

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 situaciones de estrés en su desarrollo y, debido a esto, es posible que ciertas características fenotípicas tales como altura, floración, macollamiento, fertilidad, y centro blanco, puedan verse afectadas y no se expresen 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, y se obtiene así la generación R_2 (Figura 32, Láminas en Color). Su semilla, denominada R_3 , se siembra de nuevo para obtener la generación R_3 . En cada generación, el material se evalúa y selecciona de acuerdo con los objetivos del programa de mejoramiento.

Formulación y Preparación de los Medios de Cultivo

La preparación y el almacenamiento de los medios de cultivo son críticos para garantizar una respuesta exitosa en el cultivo de anteras (CA), ya que de ello depende la composición química del medio y la disponibilidad de los nutrientes para el tejido vegetal cultivado in vitro.

La composición del medio es afectada por el manejo y el almacenamiento de los reactivos, así como por la preparación y el almacenamiento de las soluciones madre. A continuación se presentan algunas observaciones que se deben tener en cuenta en esta etapa.

Preparación y Almacenamiento de Soluciones Madre de Medios de Cultivo

Las sales (macronutrientes y micronutrientes) que se incluyen en los medios de cultivo usados comúnmente en cultivos in vitro se obtienen normalmente en el comercio en forma individual. Sin embargo, algunas de ellas se pueden conseguir comercialmente en forma de premezcla.

Las premezclas son útiles, sobre todo en aquellos laboratorios donde se cultiva a gran escala y existen limitaciones de personal. Tienen además la ventaja de garantizar calidad y resultados reproducibles. Sin embargo, presentan la desventaja de ser más costosas que preparar el medio con sales individuales. Por otra parte, en la investigación se necesita frecuentemente preparar medios experimentales con modificaciones en cuanto a su composición y a la cantidad de los constituyentes, hecho que limita el uso de las premezclas.

En el caso de utilizar sales individuales para la preparación del medio, se aconseja preparar inicialmente soluciones concentradas de los ingredientes (soluciones madre), ya que la mayoría de las sales involucradas en el medio se requieren en niveles relativamente bajos. Algunas observaciones al respecto son:

1. Tanto para la preparación de las soluciones madre como para el medio se debe usar agua

de alta pureza y que esté libre de iones; es decir, debe ser agua destilada y deionizada.

2. Los cristales de las sales inorgánicas se disuelven fácilmente en agua, en las cantidades prescritas para la preparación de soluciones madre.
3. Algunas sustancias orgánicas, tales como las auxinas, las citocininas y las giberilinas, son difíciles de disolver en agua. Las citocininas, 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). Como guía general, se puede usar una proporción de 0.3 ml del ácido o base por 10 mg de citocininas o auxinas.
4. Frecuentemente se necesita agitar vigorosamente con una barra agitadora, para lograr una completa disolución. La muestra predisuelta se lleva luego a un volumen final con agua.
5. Las soluciones madre se deben almacenar sin ajustar el pH, para así disminuir la precipitación; los ajustes del pH se hacen después de incluir todas las soluciones madre en el medio final.
6. Se pueden necesitar cosolventes orgánicos, tales como la acetona y el alcohol, para disolver ciertas sustancias orgánicas neutrales. Sin embargo, estos cosolventes son relativamente fitotóxicos y, por lo tanto, sólo se pueden usar en cantidades pequeñas. La dilución final, con agua, de las soluciones madre preparadas con cosolventes orgánicos se debe hacer rápidamente, para evitar la precipitación.
7. Para el almacenamiento de soluciones madre de muchos químicos orgánicos se recomienda la refrigeración. En cambio, las soluciones madre de la mayoría de las sales inorgánicas no requieren la refrigeración.

8. Algunos compuestos, como las giberilinas, el ácido ascórbico y ciertas auxinas (ej., el ácido indolacético, AIA), son extremadamente inestables y sus soluciones madre se deben preparar al momento de usarlas.
9. Las soluciones de algunos químicos, tales como las sales de hierro, se deben proteger de la luz, almacenándolas en frascos oscuros o ámbar.
10. Antes de utilizar una solución madre, es aconsejable verificar que esté libre de precipitación y contaminación.
11. Como norma general, se aconseja familiarizarse con la forma de disolver y almacenar los reactivos antes de preparar las soluciones madre, para así garantizar una adecuada composición de la solución. La información correspondiente puede ser suministrada, junto con el producto, por el proveedor comercial; también se puede obtener en catálogos de caracterización química de compuestos (ej., Merck).
12. Las premezclas y los reactivos puros se deben almacenar 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 9 se resumen las condiciones óptimas recomendadas para el almacenamiento de los reactivos utilizados en los protocolos descritos en este material.

Medidas de Seguridad en el Manejo de Reactivos

Si bien el tipo de reactivos que se utilizan en cultivos de tejidos y células vegetales son por lo general inocuos, hay algunos que se deben manejar teniendo en cuenta ciertas precauciones para evitar un posible daño a la salud del operario y de otras personas del laboratorio.

Como norma general, se aconseja que antes de utilizar por primera vez un reactivo, la persona se familiarice con las especificaciones y recomendaciones del fabricante sobre el manejo del producto. En el Cuadro 10 se detallan los reactivos que se utilizan comúnmente en el CA de arroz, y que se deben manejar con cierta precaución.

Cuadro 9. Condiciones óptimas para el almacenamiento de reactivos.

Reactivo	Almacenamiento ^a	
	Cristal	Solución
Macronutrientes		
NH ₄ NO ₃	TA	TA
(NH ₄) ₂ SO ₄	TA	TA
KNO ₃		
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		
M-inositol	TA	TA
Tiamina-HCl	TA	TA(D)
Acido nicotínico	TA	TA
Piridoxina-HCl	TA	TA
Glicina	TA	TA
Reguladores de crecimiento		
2,4-D	TA	0-5 °C
Picloramo	TA	TA
ANA	TA(D)	0-5 °C
Cinetina	0 °C	0 °C
Otros compuestos		
AgNO ₃	TA	TA
Gelrite	TA(D)	TA
Phytigel	TA(D)	TA
Sucrosa	TA	TA
Maltosa	TA	TA

a. TA = temperatura ambiente; D = desecador.

Cuadro 10. Recomendaciones de seguridad en el manejo de los reactivos que se utilizan normalmente en el cultivo de anteras de arroz.

Reactivo	Manejo
2,4-D y picloramo	Herbicida. Cancerígeno. El reactivo en polvo se debe manipular con guantes y mascarilla; su contacto causa irritación en los ojos y disturbios gastrointestinales. El reactivo en solución se debe pipetear con pipeteador manual o automático.
FeSO ₄ ·7H ₂ O	Tóxico. El reactivo en polvo se debe manipular con mascarilla y guantes; su contacto puede causar disturbios gastrointestinales (estreñimiento, diarrea y cólico). En los niños, la ingestión de grandes cantidades puede causar vómito, daño hepático, taquicardia y colapso vascular.
AgNO ₃	Tóxico. El reactivo en polvo se debe manipular con mascarilla y guantes; es un 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 se debe manipular con mascarilla y guantes, y en cámara extractora. Se puede mezclar o disolver en un solvente orgánico para su incineración.
Hipoclorito de calcio	Tóxico. El reactivo en polvo se debe manipular con mascarilla y guantes, y en cámara extractora. La inhalación puede causar severa irritación bronquial y edema pulmonar; el contacto prolongado con los ojos puede ocasionarles irritación. La ingestión puede causar corrosión de las membranas mucosas, perforación gástrica y edema de la laringe.
HCl	Altamente tóxico. Se debe manipular con mascarilla y 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. La ingestión produce corrosión de las membranas mucosas, el esófago y el estómago, náuseas, vómito, diarrea, y sed intensa. Puede producir colapso circulatorio y muerte.
KOH	Altamente tóxico y extremadamente corrosivo. Se debe manipular con mascarilla y guantes, y en cámara extractora. Soluciones concentradas causan quemaduras severas. La ingestión puede producir fuerte dolor en la garganta y colapso.

Formulación de los Medios Basales para la Inducción de Callos y la Regeneración de Plantas

Para la etapa de inducción de callos se están utilizando, en general, dos tipos de medios básicos denominados A y C (Cuadro 2) (Lentini et al., 1995). Estos medios, formulados para los genotipos japónica e índica, respectivamente, han permitido un incremento significativo en la producción de callos.

Para la regeneración de plantas se utiliza el medio MS (Cuadro 2).

Preparación de los medios A y C para la inducción de callos

En los Cuadros 11 y 12 se detallan los componentes de los medios A y C, y la cantidad que

se debe tomar de cada solución madre para preparar 1 lt de medio de cultivo. Como se puede observar en los cuadros, hay varias sustancias que se pueden combinar para reducir el número de soluciones madre; otras sustancias, que son inestables, se preparan solas, y los reactivos que puedan precipitarse no se mezclan. En las soluciones se utiliza siempre agua destilada y deionizada.

Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven, por separado, el Na₂EDTA y el FeSO₄·7H₂O, en la cuarta parte del volumen final de la solución. Al disolver el Na₂EDTA 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 se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente.

Cuando al preparar la solución con tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe

Cuadro 11. Soluciones madre para preparar 1 litro de medio A, para la inducción de callos de genotipos japónica.

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

calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante 1 ó 2 meses.

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

La solución de Picloramo, por su parte, se prepara adicionando los 7 mg del compuesto a 5 ml de etanol del 70%; se calienta suavemente, y se ajusta el volumen a 100 ml.

La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 100 mg del compuesto en aproximadamente 5 ml de HCl 0.5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 100 ml. Esta solución se divide en alícuotas de aproximadamente 10 ml cada una, para almacenar en el congelador a 0 °C. Antes de usar cada alícuota se debe descongelar en baño de María, y el remanente se almacena a 4 °C (refrigerador) por un máximo de 1 mes.

Para preparar 1 lt de medio A proceda así:

1. Coloque 500 ml de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio.
2. Adicione las cantidades de las soluciones madre indicadas en el Cuadro 11, siguiendo el mismo orden y con agitación continua.
3. Adicione 50 g de sacarosa.
4. Lleve el volumen a 1 lt.
5. Ajuste el pH a 5.8.
6. Envase 10 ml del medio en cada frasco de inducción (de 7 cm x 4 cm, frasco de compota para bebé).
7. Esterilice los frascos en un autoclave a 122 °C de temperatura y 20 psi de presión, durante 15 min.
8. Deje enfriar y almacene los frascos a una temperatura de 8 a 10 °C. En estas condiciones (cuarto frío), el medio puede permanecer hasta por 2 meses.

Para preparar 1 lt de medio C, proceda de forma similar a la descrita para el medio A, pero adicionando las cantidades de las soluciones madre indicadas en el Cuadro 12. Sustituya la sacarosa por 50 g de maltosa, y adicione 10 mg de AgNO₃.

Cuadro 12. Soluciones madre para preparar 1 litro de medio C, para la inducción de callos de genotipos indica.

Solución	Componentes	Cantidad (mg)	H ₂ O (ml)	Solución madre/litro del medio (ml)
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	2320	1000	100
	KNO ₃	31340		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	1860		
	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1500		
2	H ₃ BO ₃	620	100	1
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1690		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860		
	KI	83		
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25		
	CoCl ₂ ·6H ₂ O (2.5 mg/ml)	1 ml		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (2.5 mg/ml)	1 ml		
3	Tiamina-HCl	125	50	1
	Acido nicotínico	125		
	Piridoxina-HCl	125		
	Glicina	125		
4	KH ₂ PO ₄	5400	100	10
5	Na ₂ EDTA	750	100	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	550		
6	2,4-D	50	100	4
7	Picloramo	7	100	1
8	Cinetina	100	100	0.5

Cambio de concentración en una solución madre. En el caso de que se quiera cambiar la concentración indicada en el cuadro, para calcular el volumen que se debe agregar de cada solución madre se aplica la siguiente fórmula:

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

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 que se va a preparar, o sea, 1000 ml.

Ejemplo: Se quieren preparar 1000 ml de medio A, con una concentración final de 4 mg/lit de

Cinetina, y se tiene una solución madre de 200 mg/lit. ¿Cuántos mililitros de esta solución madre hay que adicionar?

$$C_1V_1 = C_2V_2$$

$$200 \text{ mg/lit} \times X = 4 \text{ mg/lit} \times 1000 \text{ ml}$$

$$X = \frac{4 \text{ mg/lit} \times 1000 \text{ ml}}{200 \text{ mg/lit}}$$

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

Preparación del medio de Murashige y Skoog (MS) para la regeneración de plantas

El medio MS se utiliza para inducir la diferenciación de plantas a partir de los callos inducidos. El método más simple para prepararlo es utilizando medios prefabricados, en forma de cristales que contienen las sales inorgánicas del medio MS; de esa manera ahorra mucho tiempo. Sin embargo, se puede optar por preparar la solución madre lo cual, aunque demanda tiempo y

Cuadro 13. Soluciones madre para preparar 1 litro de medio MS para regeneración de plantas.

Solución	Componentes	Cantidad (mg)	H ₂ O (ml)	Solución madre/litro del medio (ml)
1	NH ₄ NO ₃	82500	1000	20
	KNO ₃	95000		
	MgSO ₄ ·7H ₂ O	18500		
	KH ₂ PO ₄	8500		
2	H ₃ BO ₃	620	100	1
	MnSO ₄ ·H ₂ O	1690		
	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	860		
	Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	25		
	CoCl ₂ ·6H ₂ O (2.5 mg/ml)	1 ml		
	CuSO ₄ ·5H ₂ O (2.5 mg/ml)	1 ml		
3	KCl	83	100	1
4	CaCl ₂ ·2H ₂ O	1500	100	29
5	Na ₂ EDTA	750	100	5
	FeSO ₄ ·7H ₂ O	550		
6	M-inositol	5000	500	10
7	Tiamina-HCl	10	100	1
	Acido nicotínico	50		
	Piridoxina-HCl	50		
	Glicina	200		
8	ANA	200	200	1
9	Cinetina	500	500	4

cuidado, permite realizar cambios cualitativos y cuantitativos en los constituyentes del medio, de acuerdo con la necesidad.

En el Cuadro 13 se detallan las sustancias que componen el medio MS. Las indicaciones para la preparación de las soluciones madre son las mismas dadas para el medio de inducción.

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

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

Recomendaciones Generales

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

1. Asegurarse siempre de llevar un buen control de las soluciones madre, para evitar excesos o faltantes.
2. No olvidar ajustar el pH de los medios de cultivo a 5.8.
3. Revisar el buen estado de las soluciones, es decir, que no presenten precipitaciones o contaminaciones, y asegurarse de que estén debidamente marcadas.
4. Antes de empezar a preparar cualquiera de los medios, tener todas las sustancias necesarias a mano. Esto ahorrará tiempo y trabajo, y evitará errores.
5. Evitar riesgos de contaminación de las soluciones y del equipo empleado.

Referencias

- Adkins, S. W.; Shiraishi, T.; y McComb, J. A. 1990. Rice callus physiology identification of volatile emissions and their effects on culture growth. *Physiol. Plant.* 78:526-531.
- Baenziger, P. S. y Schaeffer, G. W. 1983. Dihaploids via anthers culture in vitro. En: Owens, L. D. (ed.). *Genetic engineering: Applications to agriculture. Simposio sobre Investigación Agrícola*, Beltsville, Rowman Allanheld, Nueva Jersey, E.U. p. 269-284.
- Baenziger, P. S.; Wesenberg, D. M.; Smail, V. M.; Alexander, W. L.; y Schaeffer, G. W. 1989. Agronomic performance of wheat doubled-haploids lines derived from cultivars by anther culture. *Plant Breeding* 103:101-109.
- Briggs, F. N. y Knowles, P. F. (eds.). 1967. *Introduction to plant breeding*. Reinhold Publishing Corporation, Nueva York, E.U. 426 p.
- Bruzzone, C. B. 1991. Bridging upland-irrigated rice (*Oryza sativa* L.) gene pools via anther culture. Tesis (Ph.D.). Oregon State University, Corvallis, OR, E.U. 145 p.
- Caligari, P. D.; Povell, W.; y Jinks, J. L. 1987. A comparison of inbred lines derived by doubled haploidy and single seed descent in spring barley (*Hordeum vulgare*). *Ann. Appl. Biol.* 111:667-675.
- Chen, C. C. y Lin, C. M. 1981. Genotypic differences in plant production in anther culture of rice. En: Chang, W. C. (ed.). *Proceedings of a Symposium on Plant Cell Tissue Culture*. Academia Sinica, Taipei, Taiwán. p. 199-203.
- Chen, C. C.; Chin, W. L.; Yu, L.; Ren, S. S.; Yu, W. J.; y Lin, M. H. 1983. Genetic analysis on anther-derived plants of rice: Independent assortment of unlinked genes. *Can. J. Genet. Cytol.* 25:324-328.
- Chen, C. C.; Tsay, H. S.; y Huang, C. R. 1991. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer Verlag, Berlin, Alemania. vol. 14, p. 193-215.
- Chen, T.; Tso, C. H.; Wang, J. F.; y 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. En: Hu, H. (ed.). *Proceedings of a Symposium on Anther Culture*. Science Press, Beijing, China. p. 40-49.
- Choo, T. M.; Reinbergs, E.; y Park, S. J. 1982. Comparison of frequency distributions of doubled haploid and single seed descent lines in barley. *Theor. Appl. Genet.* 61:215-218.
- Chu, C. C.; Wang, C. C.; Sun, C. S.; Chen, H.; Yin, K. C.; Chuc, Y.; 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.
- Chung, G. S. 1987. Application of anther culture techniques for rice improvement. En: *Proceedings of a Symposium on Plant Tissue Culture in Korea-China*. Korean Society on Plant Tissue Culture and Agriculture Science, and Institute of Botany of the Academia Sinica, Suweon, Corea. p. 36-55.
- Curtois, B. 1991. Variabilité des descendances de trois croisements de riz (*Oryza sativa* L.) fixés par haplodiploidisation et par filiation unipare. Tesis (Ph.D.). Universidad de Montpellier, Francia.
- Curtois, B. 1993. Comparison of single-seed descent and anther culture-derived lines of three single crosses of rice. *Theor. Appl. Genet.* 85(5):625-631
- Day, A. y Ellis, T. H. N. 1985. Deleted forms of plastid DNA in albino plants from cereal anther culture. *Curr. Genet.* 9(8):671-678.
- Fang, P. Y. 1991. Breeding new rice strains through anther culture. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). *Biotechnology in agriculture and forestry*. Springer Verlag, Berlin, Alemania. vol. 14, p. 216-229.
- Fosket, D. E. (ed.). 1994. *Plant growth and development*. Academic Press, San Diego, CA, E.U. 580 p.
- Friedt, W. y Foroughi-Wehr, B. 1986. Agronomic value of androgenetic doubled haploid lines as compared to conventional selected spring barley. En: *Genetic manipulation in plant breeding*. Walter de Gruyter, Berlin, Alemania. p. 299-302.
- 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.
- Guideroni, E. 1991. Gametic selection in anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 81:406-412.

- Han, H. 1985. Use of haploids in crop improvement. En: Biotechnology in international agricultural research. Memorias del seminario a nivel de centros sobre la investigación agropecuaria en los centros internacionales (IARCs, en inglés) y la biotecnología. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. p. 76-95.
- Heberle-Bors, E. 1985. In vitro haploid formation from pollen: A critical review. *Theor. Appl. Genet.* 71:361-374.
- Huang, H. S.; Ling, T. H.; Tseng, P. L.; Shien, Y. L.; y Shi, P. 1981. Studies on medium component in anther culture of *Oryza sativa* subsp. *Shien* by mathematical methods. En: Plant tissue culture. Memorias del Simposio de Beijing. Pitman Publishing, Londres, Inglaterra. p. 244-246.
- Jansen, R. C. 1992. On the selection for specific genes in doubled haploids. *Heredity* 69:92-92.
- Johanson, L.; Anderson, B.; y 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.
- Last, D. I. y Brettell, R. I. S. 1990. Embryo yield in wheat anther culture is influenced by the choice of sugar in the culture medium. *Plant Cell Rep.* 9:14-16.
- Lentini, Z. y Martínez, C. P. 1992. Applications of anther culture in rice breeding (cartelera). En: Cuevas-Pérez, F. (ed.). Rice in Latin America: Improvement, management, and marketing. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 230.
- Lentini, Z.; Reyes, C. P.; Martínez, C. P.; y Roca, W. 1995. Androgenesis of high recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Sci.* 110:127-138.
- Liang, S. y Huang, S. 1991. Huayu 15, a high-yielding rice variety bred by anther culture. En: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer Verlag, Berlín, Alemania. vol. 14, p. 230-247.
- Lynch, P. T.; Finch, R. P.; Dave, M. R.; y Cocking, E. C. 1991. Rice tissue culture and its application. En: Khush, G. S. y Toenniessen, G. H. (eds.). Rice biotechnology. Commonwealth Agricultural Bureaux International (CABI), Londres, Inglaterra. p. 135-156.
- Maheshwari, S. C.; Tagi, A. K.; y Malhotra, K. 1980. Induction of haploid from pollen grains in angiosperms: The current status. *Theor. Appl. Genet.* 58:193-206.
- Meir, S.; Philosoph-Hadas, S.; Epstein, E.; y Aharoni, N. 1984. Role of sucrose in the metabolism of ZAA-conjugates as related to ethylene production by tobacco leaf discs. En: Fuchs, Y. y Chalutz, E. (eds.). Biochemical, physiological and applied aspects. Junk Publishers, La Haya, Holanda. p. 97-98.
- Miah, M. A. A.; Earle, E. D.; y Khush, G. S. 1985. Inheritance of callus formation ability in anther culture of rice. *Theor. Appl. Genet.* 70:113-116.
- Mii, M. 1976. Relationships between anther browning and plantlet formation in anther culture of *Nicotiana tabacum* L. *Pflanzenphysiol.* 80: 206-214.
- Morden, L. P.; Rossnagel, B. G.; y Kao, K. N. 1989. Performance of anther-culture derived breeding lines of barley versus lines developed by pedigree, single seed descent and the *Hordeum bulbosum* techniques: Field comparisons. *Can. J. Plant Sci.* 69:546.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-479.
- Navarro-Alvarez, W.; Baenziger, P. S.; Eskridge, K. M.; Shelton, D. R.; Gustafson, V. D.; y Hugo, M. 1994. Effect of sugars in wheat anther culture media. *Plant Breeding* 112:53-62.
- Niiseki, H. y Oono, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* 44:554-557.
- Nishi, T. y 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.; y Martínez, C. P. 1989. El cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 60 p.
- Park, S. J.; Walsh, E. J.; Reinbergs, E.; Song, S. P.; y Kasha, K. J. 1976. Field performance of doubled haploid barley lines in comparison with lines developed by the pedigree and single seed descent methods. *Can. J. Plant Sci.* 56: 467-474.
- Pelletier, G. e Ilami, M. 1972. Les facteurs de l'androgenese in vitro chez *Nicotiana tabacum* L. *Z. Pflanzenphysiol.* 68:97-114.
- Pérez-Almeida, I. B. 1993. Variabilidad genética en la reacción a *Pyricularia oryzae* Cav. de dos poblaciones de arroz obtenidas por cultivo de anteras y pedigrí. Tesis (M.S.). Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía, Maracay, Venezuela. 124 p.

- Powell, W.; Thomas, W. T. B.; y Thompson, D. M. 1992. The agronomic performance of anther culture derived plants of barley produced via pollen embryogenesis. *Ann. Appl. Biol.* 120:137-150.
- Quimio, C. A. y Zapata, F. J. 1990. Diallel analysis of callus induction and green plant regeneration in rice anther culture. *Crop Sci.* 30:188-192.
- Raina, S. K. 1989. Tissue culture in rice improvement: Status and potential. *Adv. Agron.* 42:339-397.
- Reggiani, R.; Hochkoeppler, A.; y Bertani, A. 1989. Polyamines and anaerobic elongation of rice coleoptile. *Plant Cell Physiol.* 30(6):893-898.
- Roberts-Oehlschlager, S. L.; Dunwell, J. M.; y Falks, R. 1990. Changes in the sugar content of barley anthers during culture on different carbohydrates. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 22:77-85.
- Sanint, L. R.; Martínez, C. P.; Ramírez, A.; y Lentini, Z. 1993. Rice anther culture versus conventional breeding: A cost/benefit analysis. En: Trends in CIAT commodities. Documento de trabajo 128. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. p. 74-96.
- Scott, P. y Lyne, R. L. 1994. The effect of different carbohydrate sources upon the initiation of embryogenesis from barley microspores. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 36:129-133.
- Shen, J.; Fang, L. M.; Quan, C.; y Hua, Z. Z. 1983. Improving rice by anther culture. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press, Beijing, China.
- Siva Reddy, V.; Leelavathi, S.; y Sen, S. K. 1985. Influence of genotype and culture medium on microspore callus induction and green plant regeneration in anthers of *Oryza sativa*. *Physiol. Plant.* 63:309-314.
- Siva Reddy, V.; Leelavathi, S.; y Sen, S. K. 1989. In vitro segregation of marker genes in anther cultures of rice. *In vitro Cell & Dev. Biol.* (Journal of the Tissue Culture Association) 23:515-518.
- Snape, J. W. 1989. Doubled haploid breeding: Theoretical basis and its practical applications. En: Mujeeb-Kazi, A. y Sitch, L. A. (eds.). Review of advances in plant biotechnology, 1985-1989. Segundo simposio internacional sobre manipulación genética de especies cultivadas. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), México, e International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. p. 1930.
- Sunderland, N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. En: Proceedings of a Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Beijing, China. p. 65-86.
- Sunderland, N.; Xu, Z. H.; y Huang, B. 1981. Recent advances in barley anther culture. En: Proceedings of the 4th International Barley Genetics Symposium. University Press, Edinburgo, Reino Unido. p. 699-703.
- Tascón, E. y García, E. (eds.). 1985. Arroz: Investigación y producción. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia. 696 p.
- Tsay, H. S. 1982. Autotoxicity in tobacco and rice anther culture. En: Chou, C. H. y Walter, G. R. (eds.). Allelochemicals and pheromones. Academia Sinica, Taipei, Taiwán. p. 283-292.
- Tsay, H. S. y Chen, L. J. 1984. The effects of cold shock and liquid medium on callus formation in rice anther culture. *Agric. Res. China* 33:24-29.
- Tsay, H. S.; Teng, Y. C.; Lai, P. C.; y Chi, N. C. 1981. The culture of rice anthers of japonica X indica crosses. En: Fujiwara, A. (ed.). Plant tissue culture. Maruzen, Tokio. p. 561-562.
- Walsh, E. J. 1974. Efficiency of the haploid method of breeding autogamous diploid species: A computer simulation study. En: Kasha, K. J. (ed.). Haploids in higher plants. Universidad de Guelph, Canadá. p. 195-209.
- Wang, C. C.; Sun, C. S.; Chu, C. C.; y Wu, S. C. 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice. En: Proceedings of a Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Beijing, China. p. 149-147.
- Ying, C. 1986a. Anther and pollen culture of rice. En: Han, H. y Honguan, Y. (eds.). Haploids of higher plants *in vitro*. China Academic Publishers, Beijing y Springer-Verlag, Nueva York, E.U. p. 3-25.
- Ying, C. 1986b. The inheritance of rice pollen plant and its applications in crop improvement. En: Han, H. y Honguan, Y. (eds.). Haploids of higher plants *in vitro*. Academic Publishers, Beijing y Springer-Verlag, Nueva York. p. 118-136.
- Yoshida, S. (ed.). 1981. Fundamentals of rice crop science. International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas. 269 p.

Apéndice

Equipo de laboratorio indispensable para cultivar 60,000 anteras por semana, durante 6 meses, con dos operarios

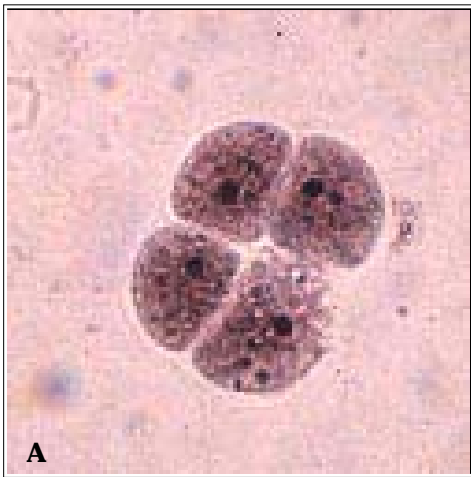
Implementos	Unidades	Implementos	Unidades
Frascos de: 7 x 4 cm para la inducción	1,500	Erlenmeyers, de: 125 ml	12
10 x 10 cm para la regeneración	3,000	250 ml	12
Mecheros de alcohol	2	500 ml	6
Mangos para bisturí	4	1000 ml	6
Cuchillas para bisturí No. 10	100	Reactivos	g/mes
Pinzas medianas de punta gruesa	4	NH ₄ NO ₃	400
Pinzas largas de punta gruesa	2	KNO ₃	600
Rollos de algodón	20	(NH ₄) ₂ SO ₄	15
Cajas de petri (150 x 20 mm)	48	KH ₂ PO ₄	50
Cámaras de doble flujo laminar	1	MgSO ₄ ·7H ₂ O	120
Balanzas: para pesar pequeñas cantidades	1	CaCl ₂ ·2H ₂ O	70
para pesar grandes cantidades	1	H ₃ BO ₃	4
Plato agitador y calentador	1	MnSO ₄ ·H ₂ O	10
Barras: agitadoras magnéticas grandes	3	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	6
agitadoras magnéticas pequeñas	3	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	1
Autoclave simple	1	CuSO ₄ ·5H ₂ O	1
Carros de laboratorio	2	KI	1
Potenciómetro	1	Na ₂ EDTA	8
Refrigerador	1	FeSO ₄ ·7H ₂ O	6
Bandejas plásticas	6	Piridoxina - HCl	1
Bandejas metálicas	4	Reactivos	g/6 meses
Estereoscopio binocular	1	Tiamina-HCl	1
Microscopio binocular	1	Glicina	1
Porta objetos y cubre objetos	10	Acido nicotínico	1
Espátulas	5	M-inositol	15
Pipetas graduadas, de: 1 ml	5	Acido naftalenacético	1
2 ml	5	Acetocarmín	25
5 ml	5	2,4-D	1
10 ml	5	Picloramo	1
Vasos graduados, de: 100 ml	12	Cinetina	50
250 ml	12	*Sacarosa (kg)	23
500 ml	6	Maltosa	900
1000 ml	6	AgNO ₃	1
Lavadoras plásticas, de: 250 ml	4	Phytigel	500
Probetas, de: 25 ml	4	Etanol	180 lt
50 ml	4	Hipoclorito de sodio	6 lt
100 ml	4		
500 ml	2		
1000 ml	2		

* Se puede usar azúcar del mercado, cristalizado.

Lista de Abreviaturas

2,4-D	ácido 2,4 diclorofenoxiacético	BAP	6-benzilaminopurina
2 iP	N ₆ -2-iso penteniladenina	CA	cultivo de anteras
AFA	ácido fenilacético	DH	doble haploides
AIA	ácido indolacético	lt	litro(s)
AIB	ácido indolbutírico	min	minuto(s)
ANA	ácido naftalenacético	MS	medio Murashige y Skoog

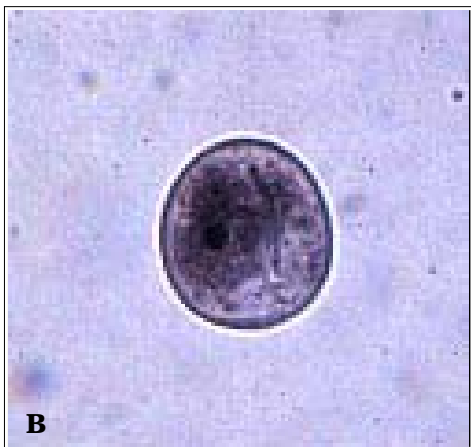
Láminas en Color



A
Tétrada de microsporas.



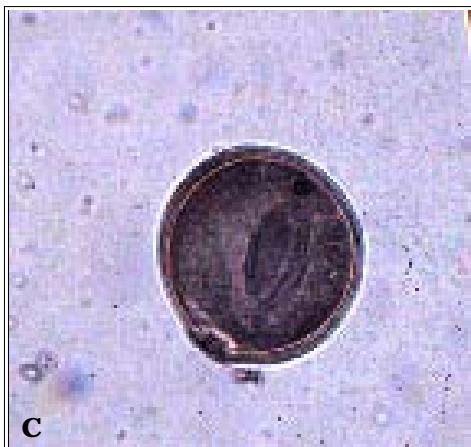
D
Binucleado temprano.



B
Uninucleado temprano.



E
Binucleado tardío.



C
Uninucleado tardío.



F
Grano de polen maduro.

Figura 8. Estados de desarrollo de la microspora in vivo, dentro de la antera (A-F).

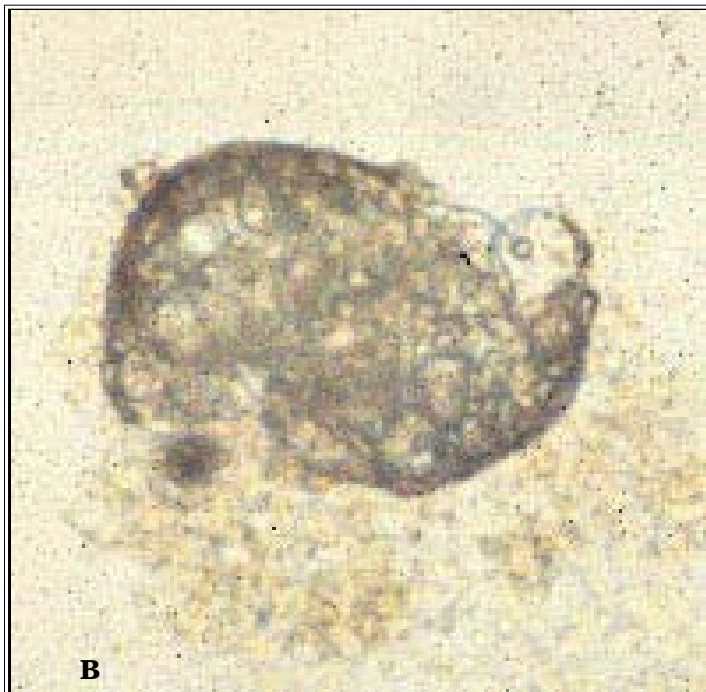


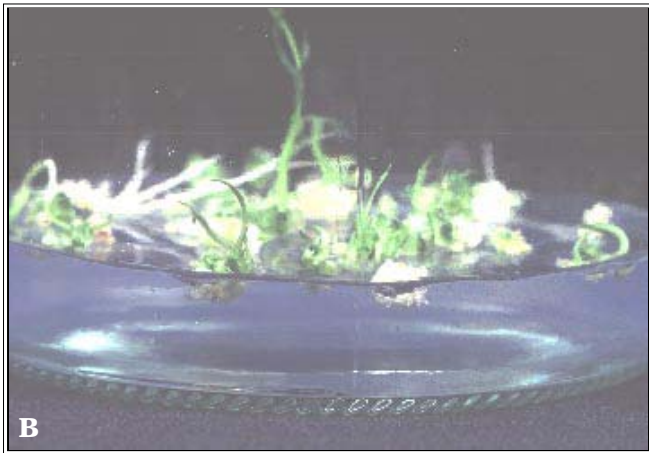
Figura 9. Formación del callo a partir de la microspora (A-D).



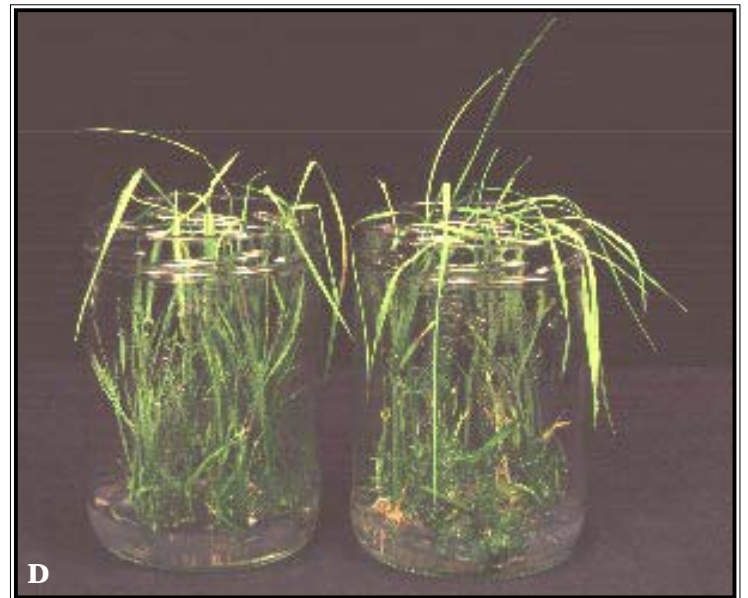
A
Microcallo de 1-2 mm.



C
Enraizamiento.



B
Diferenciación de tallos.



D
Plántulas ya formadas, listas para el trasplante al suelo.

Figura 10. Formación de plantas a partir del microcallo (A-D).



Figura 11. Plantas regeneradas del cultivo de anteras predominantemente verdes (izquierda) y albinas (derecha).

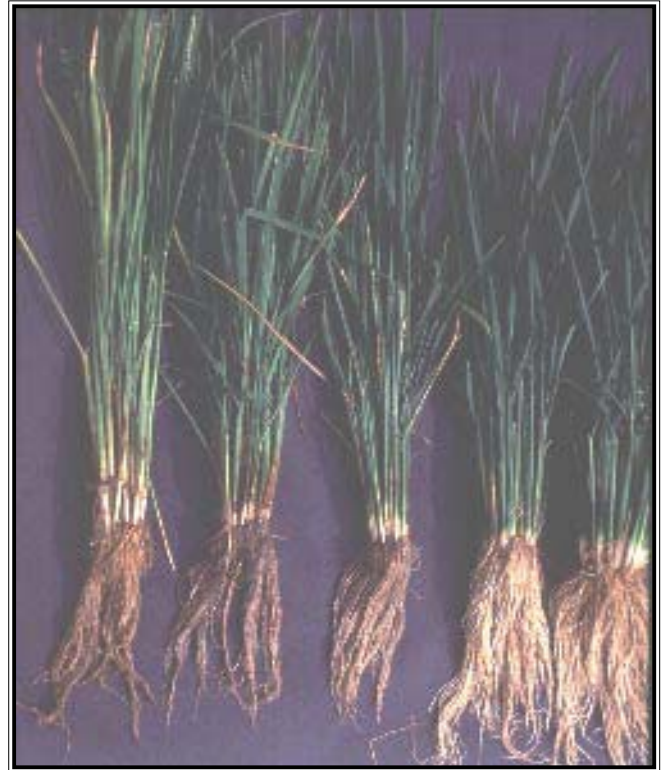


Figura 17. Tipos de planta y de raíz característicos de variedades de riego como CICA 8, IR8, IR36 (de izquierda a derecha), y de dos plantas doble haploides obtenidas de un cruzamiento de riego x seco.

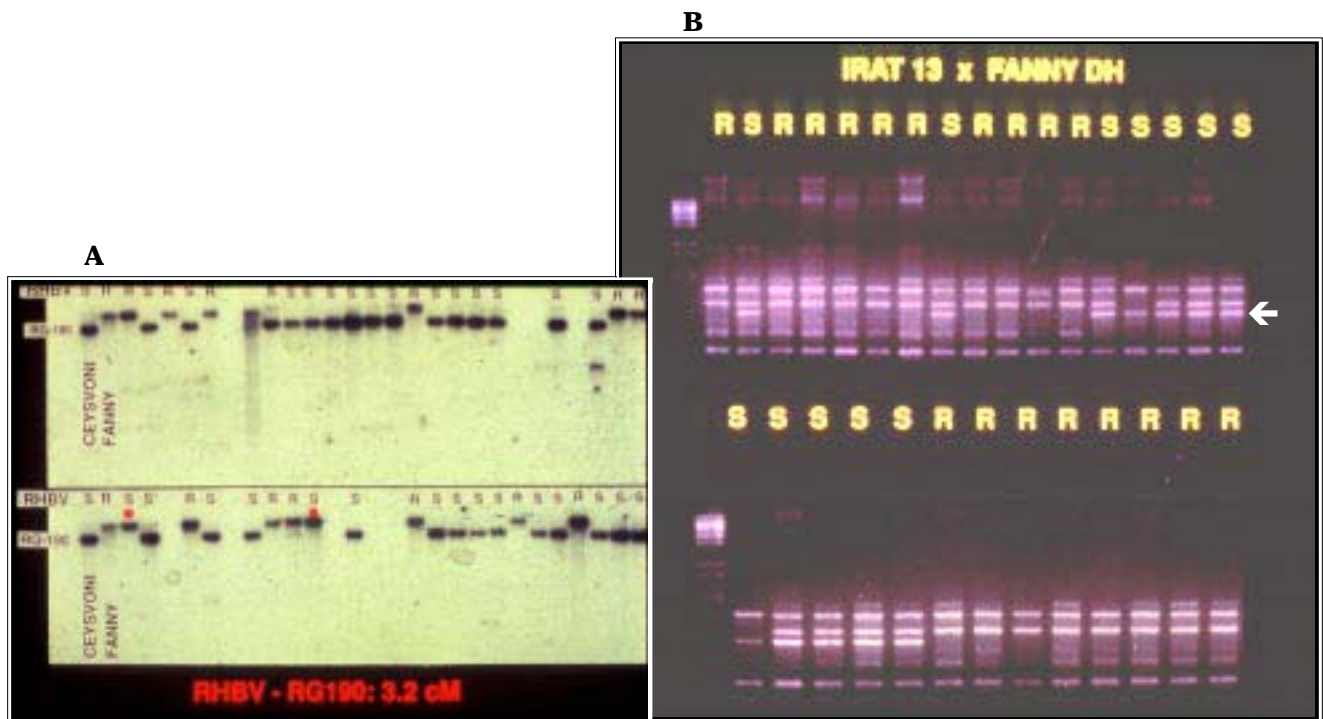
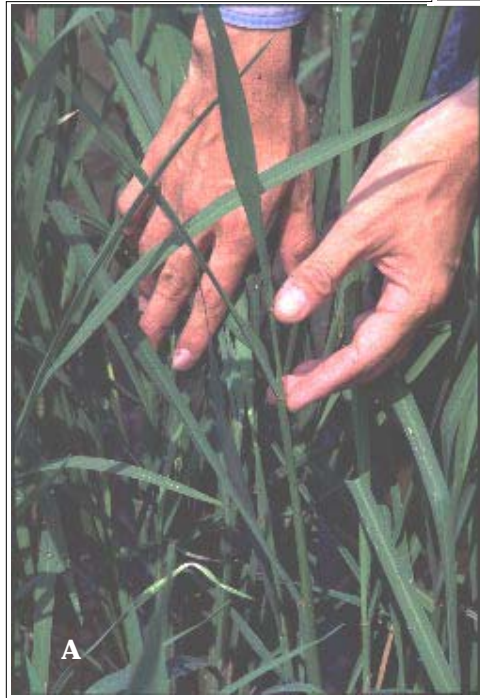


Figura 19. Segregación, mediante sondas moleculares, en poblaciones doble haploides: A) por resistencia al virus de la hoja blanca, usando el marcador del tipo RFLP, y B) por resistencia a piricularia, usando el marcador del tipo RAPID.

Figura 21. Momento adecuado para la selección de las panículas (A-B).



Figura 20. Cultivo de arroz en el momento de seleccionar las panículas.



Distancia de 4 a 8 cm entre las aurículas de las dos últimas hojas.



Panícula con glumas de color amarillo-verdoso, asociado con el estado óptimo (izquierda), en contraste con el color verde oscuro, el cual se asocia con un estado no óptimo (derecha).



Figura 22. Corte del tercio medio de la panícula.

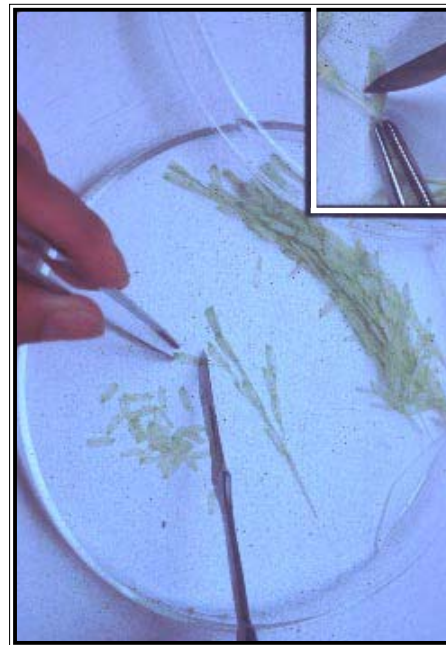


Figura 23. Corte de las flores por su base.

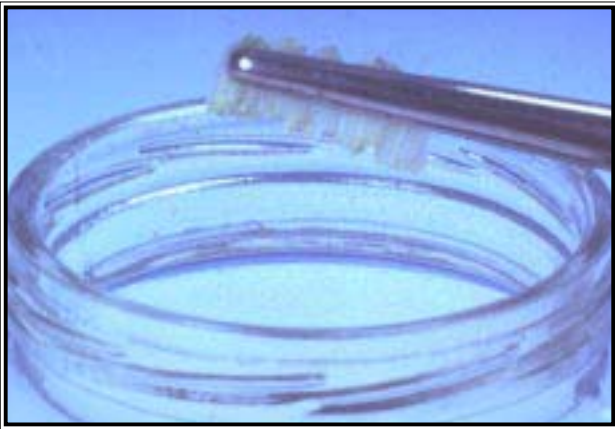


Figura 24. Siembra de las anteras en el medio de cultivo para la inducción de callos.

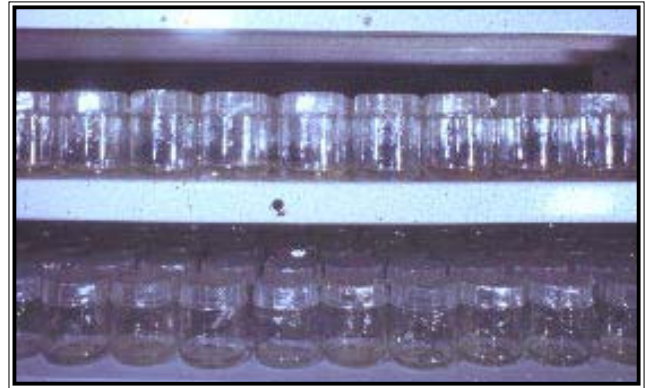


Figura 25. Cultivo de anteras en el medio de inducción, e incubación en la oscuridad, a 24 a 26 °C.



Figura 26. Desarrollo de callos (parte superior de la figura) a los 40 a 50 días de cultivo, y aspectos de la transferencia de los mismos al medio de regeneración (parte inferior).

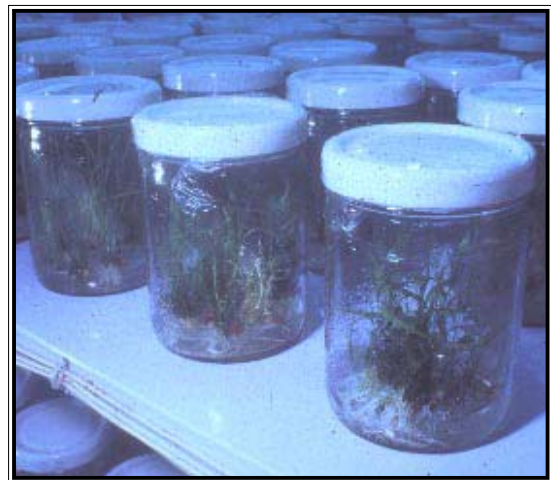


Figura 27. Regeneración de plantas a 80 a 100 $\mu\text{m}^2\cdot\text{s}^{-1}$ y 24 a 26 °C.

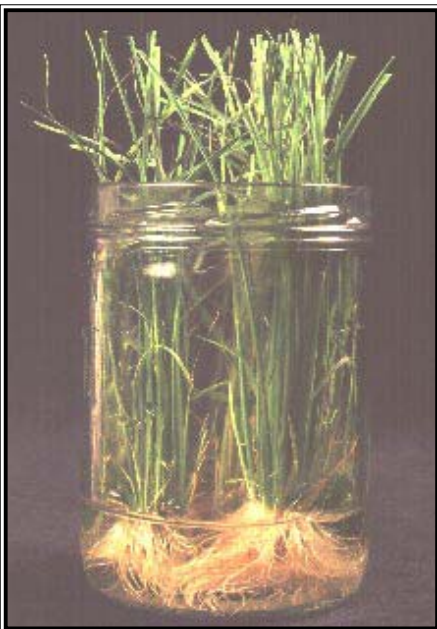


Figura 28. Aclimatación de plantas regeneradas al nuevo ambiente, durante 7 días en un frasco con agua.



Figura 29. Transferencia de plantas regeneradas a suelo fangueado, en bandejas, en el invernadero.



Figura 30. Plantas R_1 en el campo, después del trasplante.

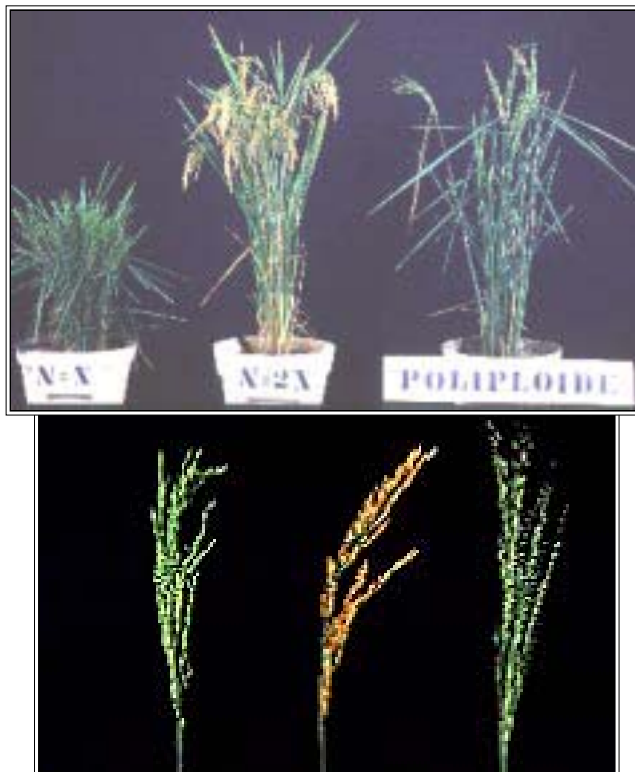


Figura 31. Plantas R_1 con diferentes ploidías (arriba) y sus correspondientes panículas (abajo).
Izquierda: haploide ($n = x$); centro: doble haploide ($n = 2x$); derecha: poliploide ($n > 2X$).

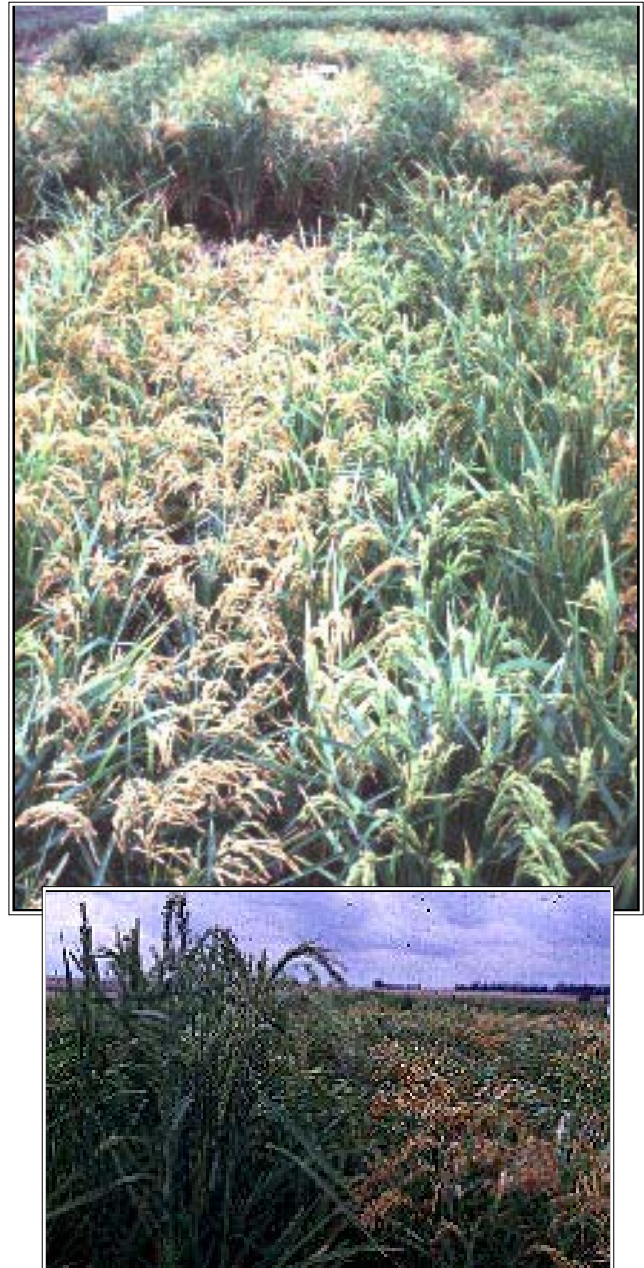


Figura 32. Líneas homocigotas R_2 derivadas del mismo cruzamiento. Diferencias en cuanto a precocidad (arriba), y diferencias en altura, tipo de planta, tipo de panícula y precocidad (abajo).

Publicación CIAT No. 293
Unidad de Comunicaciones y
Proyectos Productividad del Arroz y
Agrobiodiversidad

Edición:	Ana Lucía de Román Francisco Motta Gladys Rodríguez (asistente editorial)
Producción:	Unidad de Comunicaciones Oscar Idárraga (composición de textos)
Diseño de carátula:	Fundación Polar, Venezuela
Impresión:	Feriva S.A., Cali, Colombia
