

Ensayos

Resumen

En el Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas se desarrolló un estudio para determinar la posible relación de un grupo de marcadores morfológicos con el estudio del polen y la respuesta "in vitro" de las anteras con el objetivo de seleccionar de una forma rápida y sencilla las anteras adecuadas para la siembra "in vitro" en cada una de las variedades evaluadas e incrementar de esta forma la eficiencia en el cultivo de antera de arroz en dichas variedades. Para dicho estudio se colectaron panículas de las variedades INCA LP- 7, INCA LP- 8 y INCA LP- 9 en estado de embuchamiento. Se evaluó la distancia entre el nudo de la panícula y el punto de excisión en que la misma se separaba de la planta al ser colectada y se dividieron las panículas en tres porciones (inferior, media y superior) evaluándose los diferentes estadios del polen en las espiguillas de dichas porciones, así como la posición de la antera dentro de la espiguilla y la formación de callos y regeneración de plantas verdes y albinas. Se determinó que la mayor formación de plantas verdes se presenta en la variedad INCA LP- 9 con panículas con una mayor distancia entre el nudo y el punto de excisión del la misma y en las espiguillas situadas en el tercio inferior y se mostró que existen diferencias entre las variedades estudiadas por lo que se debe realizar dicho estudio para cada una de las variedades que se vayan a emplear para el cultivo de anteras.

Abstract

The National Institute of Agricultural Sciences developed a study to determine the possible relationship of group markers morphology with the study of pollen and the answer in vitro of anthers. The objective of this study was to be able to select the appropriate anthers in a quick and simple way for the in vitro seeding of each of the evaluated varieties of rice, and increase the efficiency of anther cultivation in these varieties. For this study, panicles of the varieties INCA LP-7, INCA LP-8, and INCA LP-9 were collected in to stuff state. The distance was evaluated among the knot of the panicle and the excision point in which it was separated from the plant. The panicles were divided into three parts (inferior, mediate and superior) evaluating the different stays of pollen in the spikelet in these portions, as well as the position of the anther within the spikelet and the formation of tripes and the regeneration of green and albino plants. It was determined that the greatest formation of green plants took place in the INCA LP-9 variety with panicles having a greater distance between the node and the point of separation in spikelets situated in the inferior third. It was demonstrated that there were differences among the studied varieties. Therefore, the study should be carried out for each variety to be used for the cultivation of anthers.

Abstrait

A l'Institut National de Sciences Agricoles a été développée une étude pour déterminer la possible relation d'un groupe de marqueurs morphologiques avec l'étude du pollen et la réponse «in vitro» des anthères, avec l'objectif de sélectionner d'une manière rapide et simple les anthères appropriées pour les semilles «in vitro» de chacune des variétés évaluées et augmenter de cette manière l'effcience de la culture d'anthères de riz chez les dites variétés. Pour cette étude, on a collecté des panicules des variétés INCA LP- 7, INCA LP- 8 et INCA LP- 9 en état de remplissage. On a évalué la distance entre le nœud de la panicule et le point d'excision où celle-ci se séparait de la plante au moment d'être collectée, et on a divisé les panicules en trois parties (inférieure, moyenne et supérieure) en évaluant les différentes répartitions de pollen sur les épillets de ces portions, ainsi que la position de l'anthère à l'intérieur de l'épillet et la formation de callosités et la régénération de plantes vertes et albinos. On a déterminé que la meilleure formation de plantes vertes se trouve dans la variété INCA LP- 9 avec d'une part des panicules possédant une plus grande distance entre le nœud et le point d'excision et d'autre part sur les épillets situés dans le tiers inférieur, et on a aussi montré qu'il existe des différences entre les variétés étudiées, en conséquence de quoi on se doit de réaliser cette étude pour chacune des variétés susceptibles d'être utilisées dans la culture d'anthères.

- * Yaritza Rodríguez Llanes,
- * María C. González Cepero
- * Gladys Verde Jiménez.

Palabras claves: Palabras claves: arroz, antera, polen, estadios, espiguillas, panículas, embuchamiento, marcadores moleculares.

Introducción

El arroz representa la principal fuente de calorías del 40% de la población mundial y se encuentra entre los cultivos alimentarios más importantes del mundo (Rosero y Smith, 1988; Rama, 1989).

* Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova"

Actualmente más de 2000 millones de personas dependen del arroz como alimento básico de su dieta. Se estima que el año 2025 la población humana será de 8300 millones, de las cuales el 50% consumirá arroz. Estas cifras indican que la producción global de arroz debe incrementarse en un 70% para satisfacer la demanda (CIAT, 1993).

En Cuba, el arroz constituye uno de los principales cultivos debido al gran hábito de consumo del mismo, reportándose un consumo per cápita anual superior a los 50 Kg. Actualmente se trabaja en función de lograr el pleno autoabastecimiento hacia fines de la presente década (Socorro, 1991).

La producción arrocería actual necesita permanentemente la contribución de nuevas variedades que presenten excelentes cualidades agronómicas y posean buen comportamiento en la industria, resistentes a las principales plagas y enfermedades que inciden en el cultivo, con alta estabilidad y plasticidad, pues se conoce que variedades con buenas características hoy pueden ser consideradas muy pronto no aptas para la producción debido a la aparición de nuevos patotipos de agentes patógenos (Prieto y Deus, 1989; Komen, 1991; Toenniessen y Khush, 1991).

El crecimiento de la productividad del arroz ha dependido, casi exclusivamente, de los métodos tradicionales de mejoramiento; sin embargo los avances logrados en Biotecnología representan nuevas herramientas de investigación con las cuales el fitomejorador podrá desarrollar mejores variedades que aseguren una alta y estable producción requerida por productores y consumidores (CIDA, 1986; Chung, 1992; Zapata et al., 1995).

El cultivo de células y tejidos haploides garantiza llegar a la homocigosis en una sola generación y por ende reducir considerablemente el ciclo de mejora. Esto se puede lograr mediante el cultivo de antera, de polen y de ovarios etc. El Cultivo de Anteras consiste en el cultivo de anteras conteniendo granos de polen en estado inmaduro (Khush, 1991; Tsuchiya, 1992; Zapata et al., 1991; Zapata et al., 1995). En relación con estos tres métodos Atanassov et al., (1995) señalaron que el cultivo de anteras ha sido el más simple, más eficiente y más exitoso de los tres tipos de métodos empleados.

En el cultivo del arroz se han logrado obtener un gran número de variedades con alto potencial productivo

(Li y Wu, 1988), buenas características culinarias y resistencia a las bajas temperaturas (Tsuchiga, 1992), buena calidad del grano, resistencia al virus Stripe (Zapata et al., 1995) así como a la salinidad (Zapata et al., 1989). Sin embargo, a pesar de estos resultados son muchos los factores que afectan la eficiencia del cultivo de antera. Entre estos factores se encuentran la baja frecuencia de inducción de callos y regeneración de plantas verdes debido a diferentes factores tales como: el genotipo, estado fisiológico de la planta donante, condiciones pre-cultivo y del cultivo "in vitro", entre otros (Zapata et al., 1995).

Zhu Deyao y Pan Xigan (1990) señalaron que la frecuencia de regeneración de plantas verdes en Indicas es inferior al 1% por lo que se hace necesario trabajar intensamente para incrementar la eficiencia del cultivo de anteras en dichas variedades.

El examen citológico de la microspora es el método más confiable de la identificación del estado del polen, pero este procedimiento es tedioso y consume mucho tiempo; sin embargo su uso en las plantas donantes como marcadores morfológicos permiten determinar el óptimo estado de las anteras (Chung, 1992). Entre estos marcadores se encuentran: la distancia entre la aurícula de la hoja bandera y la próxima hoja inferior, el color y el tamaño de las espigas y anteras, la textura de las espigas, etc.

Zapata et al., (1982) señalaron que los granos de polen en estadio medio uninucleado y binucleado temprano mostraron la mayor eficiencia pero a su vez indicaron que la habilidad androgenética está influenciada por la constitución genética; por lo que el presente trabajo tiene como objetivo:

- Identificación de indicadores que permitan seleccionar anteras con alta capacidad androgenética.

Materiales y métodos

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Genética y Mejoramiento del Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas empleándose para el mismo los somaclones de arroz INCA LP-7, INCA LP-8, INCA LP-9, los cuales fueron sembrados en la Estación Experimental "Los Palacios" sobre un suelo hidromórfico Ferralítico Laterizado, (Hernández et al., 1975). La siembra se hizo en surcos de 5 metros a chorri- llo y sin repeticiones. Los riegos se efectuaron por aniegos (CUBA, 1987).

Las panículas de cada variedad fueron colectadas en estado de embuchamiento, tomando las mismas por la base de la hoja bandera y tirando con fuerza de forma tal que provocara la separación de la misma de la planta. Se determinó la distancia entre el nudo de la panícula y el punto de escisión de la misma. Las panículas colectadas se envolvieron en papel humedecido y se colocaron durante 10 días a una temperatura de 12 gC. Se realizó la desinfección de las panículas con etanol al 70 % y posteriormente con hipoclorito de Na al 1 % y 2 ó 3 gotas de twin 80 durante 20 min; después de enjuagarlas las panículas con agua estéril se dividieron en tres porciones (A,B,C), numerándose de la parte inferior a la superior. Posteriormente se tomaron 4 espiguillas de cada porción y se fijaron en una solución de 3:1 (etanol 95 % - ácido acético).

Se realizaron tres preparaciones con cada una de las espiguillas colectadas, empleándose el Cotton Blue en lacto fenol para la tención de los granos. Se analizaron 6 campos.

El análisis del desarrollo del polen se basó en la clasificación de Dominique et al., (1995). En cada campo se observó y se anotó el estadio uninucleado (medio y tardío), el binucleado (temprano y tardío) tomando en cuenta los granos de polen que se coloreaban, o sea, los viables. Dicha evaluación se realizó con un microscopio Carlzeiss con una lente 200x.

Al resto de las espiguillas de cada porción se le evaluó la posición de la antera dentro de la misma y se realizó la siembra en un medio que contenía las sales del medio de cultivo N₆₋₁ propuesto por Lei Meifang (1992) (Tabla 1), suplementado con 50 gl⁻¹ de maltosa, 2 gl⁻¹ de phytigel y 100 mg⁻¹ de inositol.

TABLA 1. PREPARACIÓN DEL MEDIO N6-1

Solución	Componentes	Solución stock	ml
A	KNO ₃	141.5	20
B	MgSO ₄ x 7H ₂ O	18.5	10
	MnSO ₄ x 4H ₂ O	0.44	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	0.5	
	(NH ₄) ₂ SO ₄	46.3	
C	KH ₂ PO ₄	40	10
	KI	0.08	
	H ₃ BO ₃	0.16	
D	CaCl ₂ x 2H ₂ O	16.6	10
E	FeSO ₄ x 7H ₂ O	2.78	10
	Na ₂ EDTA	3.73	
Vitaminas	AC. Nicotínico	100	0.5
	Glycine	100	2
	Tiamina HCl	100	1
	Pyridoxine HCl	100	0.5
Hormona	2,4 D	10	20
Sacarosa			60000.0 mg/l
Agar			8000.0 mg/l

Según Lei Meifang (1992)

Tanto los medios de formación de callos como los de regeneración de plantas fueron ajustados a un PH de 5.8 y posteriormente se esterizaron en autoclave a 120 gC y 1.5 atmósfera de presión durante 20 min.

Para la formación de callos a partir de anteras se emplearon como reguladores del crecimiento 0,5 mg⁻¹ de 2,4 D (ácido 2,4-dicloroferroxiacético), 4 mg⁻¹ de ANA

(ácido naftalefacético) y 1 mg⁻¹ de kin (kinetina), mientras que para la regeneración de los callos se utilizó 4 mg⁻¹ de BAP (6-bencilaminópurina), 10 ml de las vitaminas de Murrell, 1 mg⁻¹ de AIA (ácido indolacético) y las sales minerales de Murashige y Skoog (1962).

Se evaluó semanalmente el comportamiento de las anteras sembradas, los cuales fueron transferidos a un

medio de regeneración que contenía las sales de Murashige y Skoog (1962) (tabla 2); así como 50 gl⁻¹ de maltosa y 2 gl⁻¹ de phytigel. Para la regeneración se evaluó el número de callos formados y el número de callos con brotes así como el número de plantas verdes y albinas y se determinó el porcentaje de los mismos según las siguientes fórmulas:

$$\%F.callos = \frac{\# \text{ callos}}{\# \text{ anteras}} \times 100$$

anteras

$$\% \text{ Reg. Plantas} = \frac{\# \text{ callos con brotes}}{\# \text{ de callos}} \times 100$$

de callos

$$\# \text{ plant. Verdes} = \frac{\# \text{ plantas verdes}}{\# \text{ regenerantes}} \times 100$$

$$\# \text{ plant. Albinas} = \frac{\# \text{ plantas albinas}}{\# \text{ regenerantes}} \times 100$$

Los datos en por ciento (%) fueron transformados según Arcsen $\sqrt{\%}$ (Sigarroa, 1985).

Se realizó un análisis trifactorial para determinar el efecto de la variedad, posición de la antera y distancia entre el nudo de la panícula y el punto de excisión sobre el estadio de desarrollo del polen.

Tabla 2. Preparación del medio MS

Solución	Componentes	Solución stock	ml
A	NHO ₄ NO ₃	82.5	20
	KNO ₃	95	
B	MgSO ₄ x 7H ₂ O	37	10
	MnSO ₄ x 4H ₂ O	2.23	
	ZnSO ₄ x 7H ₂ O	1.058	
	CuSO ₄ x 5H ₂ O	0.0025	
C	CaCl ₂ x 2H ₂ O	0.44	10
	KI	0.083	
	CoCl ₂ x 2H ₂ O	0.0025	
D	KH ₂ PO ₄	17	10
	H ₃ BO ₃	0.62	
	Na ₂ Mo ₄ x 2H ₂ O	0.025	
E	FeSO ₄ x 7H ₂ O	2.785	10
	Na ₂ EDTA x 2H ₂ O	3.725	
Vitaminas	AC. Nicotínico	100	0.5
	Glycine	100	0.5
	Tiamina HCl	100	0.1
	Pyridoxine HCl	100	2
Hormona	NAA	10	10
	Kin	10	10
Inositol			100 mg/l
Sacarosa			30000.0 mg/l
Agar			8000.0 mg/l

Según Murashige Skoog (1962)

Resultados y discusión

Al valorar los diferentes estadios en que se encontraban los granos de polen en cada una de las porciones de las panículas (Tabla 3), se pudo observar que en todas las variedades las panículas que presentaban una mayor distancia del nudo al punto de escisión y en las espiguillas que se encontraban en la porción inferior

de la panícula, las anteras se situaban por debajo de la posición media de la espiguilla y que existe una mayor cantidad de granos de polen en estadio uninucleado tardío. Sin embargo, debe destacarse que generalmente todas las porciones de las panículas hubo una mayor frecuencia de polen en dicho estadio.

Se puso de manifiesto así mismo, que existían muy pocos granos de polen en estadio binucleado temprano

y que la variedad INCA LP - 9 difiere del resto por ser la única que presentaba antera en la parte superior de la espiguilla, sin embargo, dicha posición no repercutió sobre los porcentajes de granos de polen en los diferentes estadios.

En general, se encontraban muy pocas anteras en la parte media y superior de las espiguillas en todas las variedades evaluadas.

Algunos autores señalan que el estado de desarrollo de la microspora es un factor crítico para la formación de callos y regeneración de plantas. En general se plantea que el estado uninucleado y binucleado son los responsables de la respuesta androgenética in vitro del arroz (Roca et al., 1991 a; Lei Meifang, 1992).

Chang (1991), señaló que la mejor respuesta se obtuvo al inocular anteras que contenían granos de polen en estado uninucleado situados en las espiguillas de la parte inferior y media de la panícula.

Zapata et al., (1991), señalaron además que cuando las anteras se hallaban situadas en la posición central de la espiga, los granos de polen se encontraban en estadios medios uninucleados. Esto no se corrobora en el presente estudio ya que en las variedades INCA LP-7, INCA LP - 8 y INCA LP - 9 las anteras que se encontraban en dicha posición presentaban un alto porcentaje de polen en estadio uninucleado tardío, lo cual puede ser debido a la diferencia entre los genotipos.

TABLA 3. PORCENTAJES DE GRANOS DE POLEN EN LOS DIFERENTES ESTADIOS DE DESARROLLO EN LAS DIFERENTES VARIANTES EVALUADAS.

Variedad	Panícula	Posición	Posición	Uninucleado Medio	Uninucleado Tardío	Binucleado Temprano
LP-7	I	A	1	6.5	90	3.5
			2	-	-	-
			3	-	-	-
		B	1	28.58	71.42	-
			2	-	88.88	11.12
			3	33.34	66.66	-
		C	1	41.37	58.63	-
			2	22.23	77.77	-
			3	-	-	-
II	A	1	-	77.42	22.58	
		2	-	95.65	4.35	
		3	-	-	-	
		B	1	-	93.33	6.67
			2	-	-	-
			3	-	-	-
		C	1	-	100	-
			2	-	-	-
			3	8.34	91.66	-
LP-8	I	A	1	10.42	66.48	23.00
			2	-	-	-
			3	-	-	-
		B	1	19.35	77.41	3.24
			2	-	95.24	4.76
			3	-	-	-
		C	1	34.34	65.66	-
			2	-	-	-
			3	-	-	-
II	A	1	-	100	-	
		2	-	-	-	
		3	-	-	-	
		B	1	5.45	56.52	38.03
			2	32.26	67.74	-
			3	-	-	-
		C	1	62.0	32.0	6.0
			2	33.34	63.33	3.33
			3	-	-	-
LP-9	I	A	1	8.34	91.66	-
			2	-	-	-
			3	-	-	-
		B	1	30.66	65.50	4.34
			2	27.77	72.23	-
			3	-	-	-
		C	1	25.0	70.0	5.0
			2	-	-	-
			3	25.71	71.44	-
II	A	1	20.0	80.0	-	
		2	-	-	-	
		3	-	-	-	
		B	1	-	100	-
			2	-	-	-
			3	-	-	-
		C	1	12.5	87.5	-
			2	-	-	-
			3	-	-	-

Al profundizar en cuanto al efecto de la formación de la espiguilla dentro de la panícula y la distancia del punto de excisión del nudo de la misma sobre el grado de desarrollo del polen, se observó que existe una interacción entre la variedad y los dos caracteres anteriormente mencionados que determinan la mayor o menor cantidad de polen en los estadios medios o tardíos uninucleados y binucleados temprano. Por lo que al parecer no se puede determinar indirectamente el estadio de desarrollo en que se encontraba el polen a partir sólo de la evaluación de la posición de las espiguillas dentro de la panícula o de la distancia al nudo al punto de escisión (Tabla 4, 5 y 6).

Esto se evidencia por el hecho de que la mayor cantidad de polen en estadio uninucleado medio se encontró en la variedad INCA LP - 8 con una distancia del nudo hasta el punto de escisión de 1,9 cm y en las

espiguillas de la porción superior de la panícula; sin embargo el resto de las variantes no difieren entre sí (Tabla 4).

TABLA 4. EL EFECTO DE LA VARIEDAD, DISTANCIA DEL NUDO DE LA PANÍCULA HASTA EL PUNTO DE EXCISIÓN Y PORCIÓN DE LA PANÍCULA SOBRE EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLLEN (UNINUCLEADO MEDIO).

Variedad	Panícula	Porción	
INCA LP-7	3.2	1	10.22b
		2	12.01be
		3	35.24b
	0.7	1	8.53b
		2	9.43bg
		3	8.52b
INCA LP-8	4.3	1	22.83bc
		2	22.63b
		3	27.52b
	1.9	1	13.18b
		2	11.84b
		3	49.51a
INCA LP-9	4.4	1	14.36bd
		2	21.14b
		3	19.72b
	1.3	1	11.62b
		2	9.36b
		3	10.85bf

(Letras comunes no difieren significativamente)

$\bar{X} = 17.69$
 $-$
 $Esx = 1.74^*$

Al valorar las diferencias en cuanto al contenido del polen en estadio uninucleado tardío se observó que la variedad INCA LP - 8 con una distancia de 4,3 cm del nudo hasta el punto de escisión y las anteras en posición inferior y medio de la espiguilla se encontró el mayor número de

polen en este estadio (tabla 5).

TABLA 5. EFECTO DE LA VARIEDAD, PORCIÓN DE LA PANÍCULA Y DISTANCIA ENTRE EL NUDO HASTA EL PUNTO DE EXCISIÓN DE LA MISMA SOBRE EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLLEN (UNINUCLEADO TARDÍO).

Variedad	Panícula	Porción	
INCA LP-7	3.2	1	10.54dg
		2	11.61df
		3	41.06c
	0.7	1	18.60d
		2	22.73d
		3	10.80d
INCA LP-8	4.3	1	51.24ab
		2	55.73a
		3	45.23bc
	1.9	1	21.60d
		2	15.51d
		3	24.07d
INCA LP-9	4.4	1	28.15d
		2	29.00d
		3	29.30d
	1.3	1	15.06d
		2	12.08de
		3	17.23de

(Letras comunes no difieren significativamente)

$\bar{X} = 25.23$
 $-$
 $Esx = 3.29^*$

Similar comportamiento se observó en el contenido de polen en estadio binucleado temprano (Tabla 6), donde la variedad INCA LP - 8 en la posición inferior de la panícula y a la mayor distancia mostró diferencia significativa con el resto de las variantes, siendo en ésta donde se mostró un mayor contenido de polen en este estadio.

TABLA 6. EFECTO DE LA VARIEDAD, PORCIÓN DE LA PANÍCULA Y DISTANCIA ENTRE EL NUDO HASTA EL PUNTO DE EXCISIÓN DE LA MISMA SOBRE EL DESARROLLO DEL GRANO DE POLLEN (BINUCLEADO TEMPRANO).

Variedad	Panícula	Porción	
INCA LP-7	3.2	1	11.03bd
		2	12.00b
		3	9.99b
	0.7	1	16.31b
		2	12.10b
		3	8.69b
INCA LP-8	4.3	1	25.68a
		2	14.56b
		3	12.70b
	1.9	1	10.50b
		2	11.82b
		3	17.34b
INCA LP-9	4.4	1	12.48bc
		2	13.58b
		3	12.28b
	1.3	1	9.95b
		2	9.29b
		3	9.38bc

(Letras comunes no difieren significativamente)

$\bar{X} = 12.75$
 $-$
 $Esx = 1.48^*$

Estos resultados ponen de manifiesto que la variedad INCA LP - 8 difiere del resto de las variedades estudiadas a pesar de ser todas somaclones de la variedad de arroz Amistad - 82, corroborándose la importancia que ejerce el genotipo sobre la respuesta androgenética de las anteras.

Yin et al., (1976) citado por Zapata et al., (1991) al emplear cultivares japónicos observaron que la respuesta de las anteras fue adecuada cuando la microspora estaba en estadio uninucleado tardío, las espiguillas eran de color verde amarillento y la antera había recorrido de 1/3 a 1/2 de la espiguilla.

En cuanto a la formación de callos (fig.1), en las anteras provenientes de diferentes porciones de la panícula, panículas con distancia del nudo hasta el punto de escisión de la misma en las diferentes variedades estudiadas se observó que en general las panículas con una distancia menor y a su vez, las de menor desarrollo fueron las que mostraron mejor respuesta con excepción de la variedad INCA LP - 8 en la posición inferior. La mayor formación de callos ocurrió en la variedad INCA LP - 9 en la panícula de menor distancia y anteras en la posición inferior de la misma.

Sin embargo en casi todas las variantes empleadas la mayor parte de los grupos de polen se encontraban en estado uninucleado tardío por lo que además del estadio de desarrollo del polen pueden incidir otros factores.

Zapata et al., (1982) señalaron que los granos de polen en estadio medio uninucleado y binucleado temprano mostraron la mayor eficiencia, pero a su vez indicaron que la habilidad androgenética está influenciada por la constitución genética.

Otros autores plantean que en arroz, la formación de callos es posible si las anteras se cultivan cuando sus granos de polen están en estado uninucleado (temprano y tardío), pero ello no ocurre cuando se cultivan granos binucleados (Karim y Zapata, 1993).

Según Chang (1991) y Zapata et al., (1991) el mejor estadio de desarrollo de las espigas para la formación de callos era cuando la microspora se encuentra en estadio uninucleado medio, donde se ha observado en 4 líneas indicas una formación de callos de 11,3 %. Este estadio se corresponde con panículas de talla normal, de color verde - amarillento, con espigas tomadas de la parte inferior y media de la panícula y con anteras en posición inferior y media dentro de la espiguilla.

Según Sun (1978) citado por Chang (1991), se obtuvo una alta frecuencia de callos a partir de anteras en los estadios temprano, medio y tardío uninucleado de la microspora. Chaleff y Stolarz (1981) y Zapata et al., (1982) mostraron que un 20 a un 50 % de la inducción

de callos se obtuvieron de estadios uninucleados temprano y medios y anteras que contenían microsporas en fase de tétradas y uninucleado tardío mostraron baja respuesta para la inducción de callos.

Karim y Zapata (1994) también identificaron al estadio uninucleado de desarrollo del polen como estado propicio para la inducción de callos. Igualmente Navarro et al., (1994); Zapata et al., (1986) señalaron que la fase de desarrollo adecuada para la formación de callos es el estado uninucleado, donde entra a jugar un papel importante la selección del genotipo con vista a la obtención de células del polen en este estadio y así acelerar el proceso de inducción de callos.

En cuanto a la regeneración de plantas se pudo apreciar que en las variedades INCA LP- 9 e INCA LP - 8 se obtuvieron los mayores porcentajes de callos con brotes pero difieren en la distancia de la panícula al punto de escisión de la misma. En la variedad INCA LP - 7 se obtuvo el mayor porcentaje de callos con brotes en los que formaron a partir de las espiguillas que se encontraban en la porción inferior de la espiga de menor distancia y por ende la más tierna. En la INCA LP -9 se mantuvo el mismo comportamiento y en la INCA LP - 8 se obtuvo capacidad de regeneración en la posición inferior de la panícula de la espiga de mayor longitud del nudo al punto de escisión (fig. 2).

La regeneración de plantas verdes es uno de los aspectos esenciales para el cultivo de anteras ya que son estas plantas la que tienen interés para el mejorador, pues a partir de ellas se puede efectuar la selección de genotipos promisorios, a partir de indicadores simples que permitan su posterior comportamiento.

En la regeneración de plantas en el cultivo de anteras se pueden encontrar tanto plantas verdes como albinas, sin embargo los regenerantes de interés son las plantas verdes ya que las albinas mueren una vez retiradas del medio de cultivo pues no pueden realizar la fotosíntesis y por ende producir los fotosintatos necesario para su crecimiento. En este caso se mantuvo la misma tendencia que en la formación de callos destacándose la variedad INCA LP - 9 por el alto porcentaje de plantas verdes / callos, así como los mayores porcentajes se encontraban a la distancia menor entre el nudo hasta el punto de escisión. En caso del número de regenerantes albinos / callos, los mejores resultados se obtuvieron a la distancia menor con excepción de la variedad INCA LP - 8 donde el

mayor porcentaje se localizó en la porción inferior de la panícula y en la mayor distancia entre el nudo y el punto de escisión (fig. 3 y 4).

Según Chang (1991) y Chung (1992), existen varios factores que influyen en la regeneración de plantas verdes: el genotipo, medio de cultivo, estado fisiológico de las plantas donantes, el estado uninucleado de desarrollo del polen, identificación y transferencia a tiempo de los callos para regeneración, etc.

Se ha comprobado además que la calidad de los callos pudieran ser identificado por la observación morfológica de los mismos. Callos que son blancos - lechosos, compactos, húmedos, suave y de crecimiento lento, son excelentes para la regeneración de plantas; por el contrario, si los callos son amarillos o amarillos negruzcos, friables, secos y de rápido crecimiento, muestran una pobre regeneración de callos (Chang, 1991).

Karim y Zapata (1990) también coinciden en que la composición del medio y el balance entre las concentraciones de auxinas y citoquininas pueden afectar el normal desarrollo de las plantas, además de factores ambientales y genéticos que pueden incidir en el desarrollo de la técnica del cultivo de anteras.

Otros autores señalaron que existían diferencias significativas entre los genotipos y la fuente de azúcar para regeneración de plantas verdes. El uso de maltosa en el estado temprano de la antera, en trigo, pudiera aumentar la efectividad de la producción de gran número de plantas haploides (Zaida Lentini, 1991; Khush et al., 1994; Navarro et al., 1994).

Según Karim y Zapata (1993, 1994) la regeneración de plantas está limitado por la composición y condiciones fisiológicas del medio de cultivo, los cuales retienen la capacidad embriogenética de producir callos de arroz. Al igual que otros autores Zapata et al., (1986), plantearon que la diferencia de genotipos existente hace un poco difícil la obtención de líneas homocigóticas que mantengan los mismos caracteres, por ende una selección adecuada de los mismos garantizan que sus células de polen estén en la etapa adecuada y se logre así una buena regeneración de plantas verdes.

Según autores tales como Cadmo y Villalobos (1990); Chung (1992); Karim y Zapata (1994), son muchos los factores relacionados con la producción de plantas albinas. Uno de ellos es el genotipo de las plantas donantes que conlleva

varía a incrementar la culturabilidad

de la antera y facilitar así un buen crecimiento y desarrollo de las futuras plantas. También el pretratamiento frío y la temperatura de incubación aumentan dicha culturabilidad. Anteras pretratadas a 12 gC con más de 20 días aumenta la frecuencia de albinos. La composición del medio es otro factor a tener en cuenta, debe haber un balance entre las concentraciones de los reguladores de crecimiento para garantizar una mayor respuesta.

Karim y Zapata (1989) y Zapata et al., (1991), plantearon que la edad de los callos afecta la regeneración de plantas albinas, a medida que aumentó la edad del material, la regeneración disminuía y la frecuencia de albinos podía tomar el 100 % de la regeneración.

Además Zapata et al., (1991) mostró que cuando se cultivaban granos de polen en estadio binucleado, la mayoría de las plantas regeneradas son albinas. Según Chung (1992), la concentración de los agentes gelificantes también tiene influencia en la producción de albinos.

Se ha comprobado así mismo, que el tiempo prolongado del medio de cultivo puede ocasionar alto índice de albinismo (Cadmo y Villalobos, 1990; Chang, 1991 y Karim y Zapata, 1994).

Conclusiones

Teniendo en cuenta los resultados de los ensayos realizados se puede concluir que:

- Se hace necesario determinar los indicadores para la selección de las anteras adecuadas para garantizar una buena respuesta androgenética en cada una de la variedades en estudio por lo que no se pueden establecer reglas generales.
- La mejor respuesta en cuanto a formación de callos y regeneración de plantas se obtuvo la variedad INCA LP-9 seguida por la variedad INCA LP- 7 al emplear las anteras de las espiguillas de la parte inferior de la panícula con menor distancia del nudo al punto de escisión.
- La variedad INCA LP- 8 difiere en su comportamiento en el cultivo "in vitro" de anteras con respecto a las otras dos variedades evaluadas.
- Existe una interacción variedad, porción de la panícula y distancia del nudo al punto de escisión de la panícula que determina en el contenido de granos y polen en estadios medios uninucleados, tardío

uninucleado y binucleado temprano, siendo el estadio medio uninucleado el que predomina en todas las variantes empleadas y el binucleado tardío el de menor incidencia.

- La distancia del nudo de la panícula al punto de excisión de la misma al ser colectada, así como la posición de la espiguilla dentro de las panículas pueden ser empleados como indicadores para la selección de las anteras para el cultivo "in vitro".

Recomendaciones

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos podemos recomendar:

- Continuar los estudios para el establecimiento de indicadores sencillos para la selección de explante adecuado para el cultivo de anteras con otras variedades.
- Profundizar en la determinación de la relación de dichos indicadores con el estadio de desarrollo del polen a fin de determinar la importancia real de dicho factor en la androgénesis "in vitro".

Bibliografía

ATANOSSOV, A.; ZAGORSKA, N.; BOYDJIEV, P.; PUJILIANOV, D.

1995. In vitro production of haploid plants world journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 245 -247.

CADMO, H.R.; VILLALOBOS, V.M.

1990. Medios de cultivos / Cristina López Peralta y Cultivo de Anteras / Neftalí Ochoa Alejo. - En : Fundamentos Teóricos Prácticos del Cultivo de Tejidos Vegetales. FAO. 15 - 21: 43 - 45.

CIAT

1993. Arroz en las Américas. Biotecnología del arroz. Boletín informativo del programa del arroz del CIAT. 14 (2): 9p.

CIDA

1986. Boletín de reseñas. Arroz. Ministerio de la Agricultura. Ciudad Habana. Cuba: 29 - 34.

CUBA

1987. Ministerio de la Agricultura. Programa de mejoramiento genético y perspectiva de nuevas variedades / Ministerio de la Agricultura. La Habana: 10 - 15.

CHANG, C.C. ; TSAY, H.S. ; HUANG, C.R.

1991. Factors affecting androgenesis in rice. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry Rice. Edited by Y.P.S. Bajaj: 193 - 215.

CHUNG, GUN - SIK.

1992. Anther culture of rice improvement in Korea. 22 (1): 31 - 40.

DOMINIQUE, G. ; BRENTON, CH.; ANNIE CHABOUD; VERGNE, P.; DUMAS CH.

1995. Expression of hearsoch factor and hear shock protein 70 genes during maize pollen development. Plant Molecular Biology. 29: 841 - 856.

HERNÁNDEZ, A.; DÍAZ, N.; GONZÁLEZ, L.

1975. Segunda clasificación genética de los suelos de Cuba. La Habana: Academia de Ciencias de Cuba. Suelo. 23: 1 - 25.

KARIM, N.H; ZAPATA, F.J.

1993. Physico - chemical changes and plant regeneration in anther calli of rice by abscisic acid treatment. Plant Tissue Culture. 3 (1): 242 - 246.

KARIM, N.H; ZAPATA, F.J.

1994. Stréss for regeneration: Effect of N_2 Cl on rice (*Oryza sativa* Lin) anther culture. Indian Journal. Plant Physiol. 37 (4): 242 - 245.

KHUSH, G.S.

1990. Strategies for rice varietal improvement for the 21st century. Philippine. Journal of crop science. 15 (1): 27 - 31.

KHUSH, G.S.; BRAR, R.R.; ZAPATA F.J. AND NELSON, R.

1994. Toward Enhanced and Sustainable Agricultural Productivity in the 2000's: Breeding Research and - Biotechnology. Rice Biotechnology at IRRI. Published by Taichung District Agricultural Improvement Station in Association with the society for the Advancement of Breeding Researchs in Asia and Oceanía: 389 - 390.

KOMEN, J.

1991. Mejores cultivares más alimentos. Boletín OIEA. 26(2): 52 - 53.

LENTINI, ZAIDA.

1991. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotype with maltosa and silver nitrate / Zaida Lentini, Patricia Reyes, César Martínez y W.M. Roca. - In: A rice genetic program and biotechnology research. Unit,

- LEYVA, BERTALINA; ANA VICTORIA PÉREZ.
1989 Arroz. Obtención de líneas isogenéticas de arroz por el cultivo de anteras. CIDA. Ciencia y Técnica en la Agricultura. 12 (2): 75 - 81.
- LI, M.F.; WU, C. Y.
1988 Rice anther culture breeding at the Chinese Academy of Agricultural Sciences. In: The first National Symposium on Plant Tissue Culture in Philippine Agriculture and Forestry. Laguna, Philippines: Philippine association for Plant Tissue Culture: 15 - 31.
- MEIFANG, LIN.
1992 Anther Culture breeding of rice at the CAAS / Lin Meifang. - In: Anther culture for rice breeders. China: Institute of Plant Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Science (CAAS): 75 - 86.
- MONTEALEGRE, F.A.; CLAVIJO, J.
1992 Arroz. Caracterización morfológica de algunos tipos de arroz. ICA. 41 (378): 25 - 34.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F.
1962 A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiology Plant (Copenhagen). 5: 473 - 497.
- NAVARRO, W.; BAENZIGER, P.S.; ESKRIDGE, K.M.
1994 Addition of colchicine to wheat anther culture media to increase doubled haploid plant production. Plant Breeding. 112: 192 - 198.
- PRIETO, F.; DEUS, J.
1989 Arroz. Estudios comparativos de las variedades de arroz (*Oryza sativa* Lin) de ciclo corto en la localidad de Jucarito. CIDA. Ciencia y Técnica en la Agricultura. 12 (2): 21 - 31.
- RAMA, S. K.
1989 Tissue culture in rice improvement status and potencial / S.K. Rama. - In: Advances in Agronomy. New York. Academy Press: 339 - 396.
- ROCA, W.M.; MUÑOZ, W.N.; MORRAN, K.
1991 a Medios de cultivos / W.M. Roca, W.N. Muñoz, K. Morran. - En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia: 303 - 320.
- ROSETO, M. J.; SMITH, D.
1988 Situación del arroz en Jamaica / M.J. Rosero, D. Smith.-En: Arroz en el Caribe.(IIA). 2(1):1-3.
- Sigarroa, A.
1985 Biometría y diseño experimental. Ministerio de Educación Superior. Tomo 2:755-756.
- SOCORRO, M.
1991 Particularidades del cultivo del arroz en Cuba / M. Socorro.-En: Arroz en el Caribe.(IIA).5(1):1-4.
- TOENNIENSEN, G.H.; KHUSH, G.S.
1991 Prospects for the future. Rice biotechnology (edited by G.S. Khush y G.H. Toenniessen). Biotechnology in Agriculture. 6; 6 ref: 309 - 313.
- TSUCHIYA, T.
1992 Development of new rice varieties, Hirohikan and Hirohonami, used haploid method of breeding by anther culture.- In: Plant tissue culture and gene manipulation for breeding and formation of phytochemicals. Eds. Oono, K.;
- ZAPATA, F.J.; TORRIZO, L.B.; ROMERO, R.O. Y ALEJAR, M.S.
1982 Androgenesis in *Oryza Sativa* Lin. Proc. 5th Intl. Congr. Plant Tissue and Cell Culture.
- ZAPATA, F.J.; ALDEMITA, R.R.; NOVERO, A.U.
1986 IRRI - Korea Collaborative project for the development of cold - tolerant lines through anther culture. IRRI Research paper series. 118: 322 - 330.
- ZAPATA, F.J.; AKBAR, M.; SESHU, D.V.
1989 Salt tolerance of anther culture derived rice lines. International Rice Research Institute Newsletter. 14 (1): 6 - 7.
- ZAPATA, F.J.; TORRIZO, L. B.; ROMERO, R.O.; MERCY, S. T.
1991 Anther culture of rice. International Rice Research Institute, Manila, Philippines: 223 - 240.
- ZAPATA, F.J.; TORRIZO, L. B.; ANDO, A.
1995 Current development in plant biotechnology for genetic improvement: the case of rice (*Oryza sativa* Lin) / F.J. Zapata, L.B. Torrizo, A. Ando. - In: World Journal of Microbiology and Biotechnology. 11: 245 - 247.
- ZHU DEYAO Y PAN XIGAN.
1990 Rice (*Oryza sativa* Lin): Guan 18 - an Improved Variety Through Anther Culture. Biotechnology in Agriculture and Forestry. 12. Haploids in Crop Improvement (edited by Y.P.S. Bajaj). Springer - verlag, Berlín Heidelberg.

Anexos

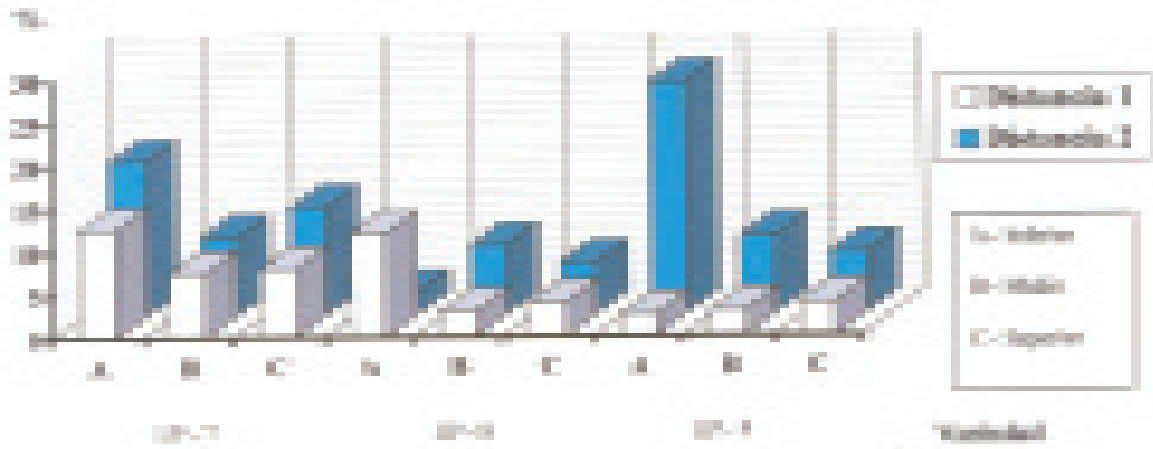


Fig. 1. Distribución de visitas.

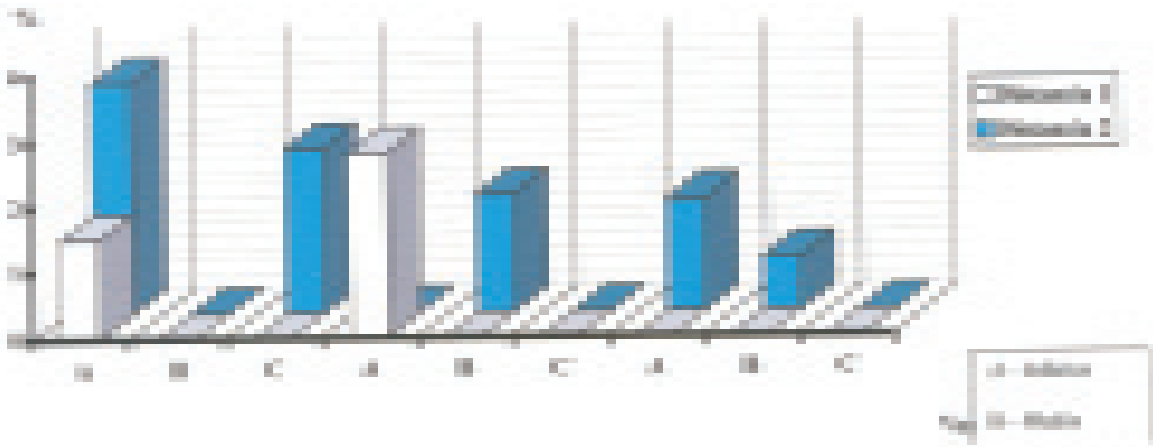


Fig. 2. Distribución de visitas.

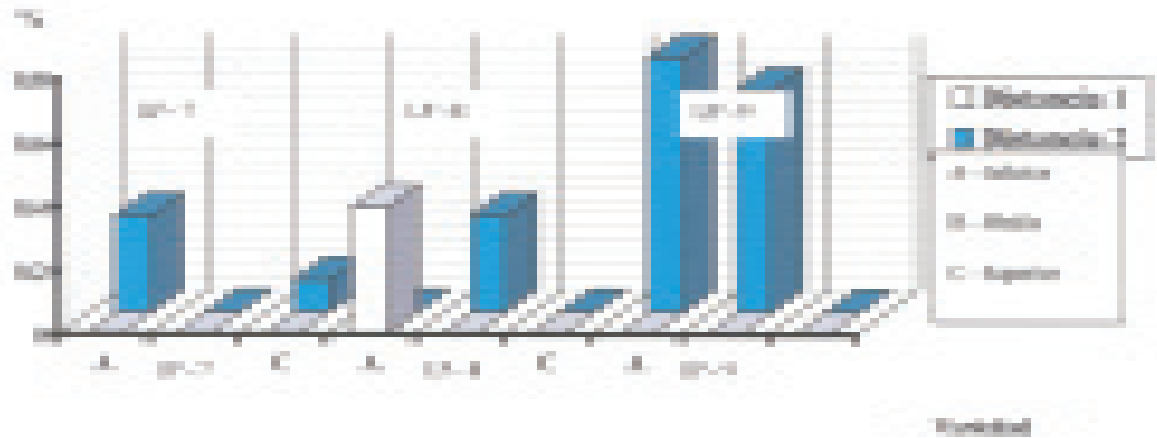


Fig. 3. Número de gametos reproductivos viables/células.

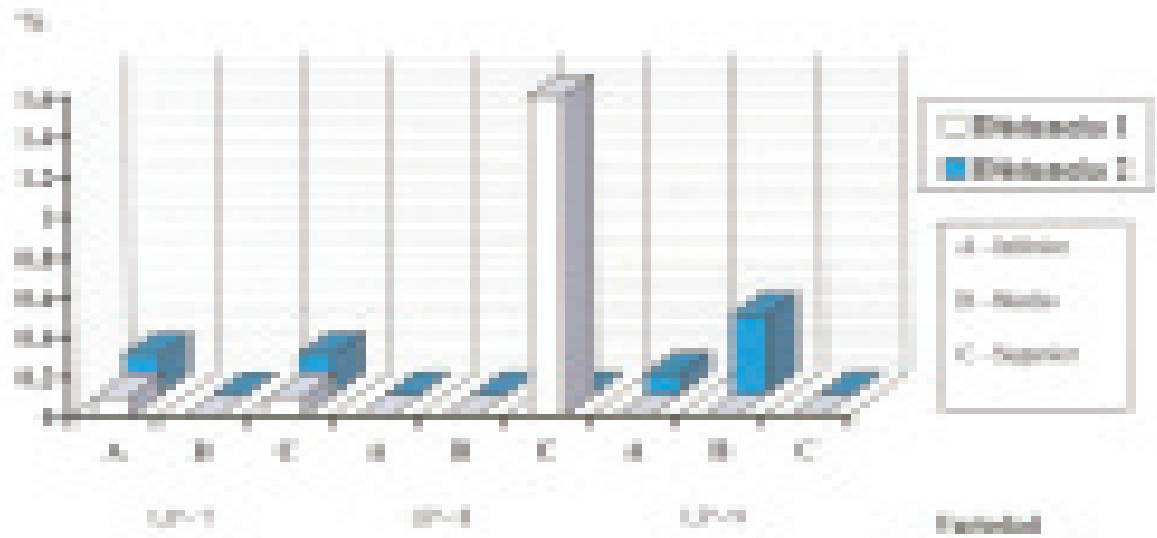


Fig. 4. Número de espermatozoides viables.