

PRODUCCION DE HAPLOIDES DE ARROZ
POR MEDIO DEL CULTIVO DE ANTERAS

P O R

Alberto Mario Larco Vera

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PREVIO A LA

OBTENCION DEL TITULO DE

INGENIERO AGRONOMO

MICROISIS:	4597
FECHA:	9/7/92
ENTREGADO:	VINARREAL

ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA

El Zamorano, Honduras

Abril, 1992

PRODUCCION DE HAPLOIDES DE ARROZ
POR MEDIO DEL CULTIVO DE ANTERAS

Alberto Mario Larco Vera

El autor concede a la Escuela Agrícola Panamericana
el permiso para distribuir o reproducir copias
de este trabajo para los fines que considere necesarios.
Para otras personas y otros fines se reservan
los derechos de autor.



Alberto M. Larco

BIBLIOTECA WILSON POPPER
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APRIL 1992
EL ZAMORANO

ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
EL ZAMORANO
ABRIL DE 1992

A Alberto y Martha,
mis padres.

A Andrea, Flavio,
Martha, César y
María José,
mis hermanos.

AGRADECIMIENTOS

De manera especial al Doctor Juan José Alán por la supervisión de este trabajo y aún más por su cordialidad, gentileza y don de gentes que fueron, y seguirán siendo, de mucha valía.

Al Doctor Leonardo Corral por su gran ayuda y sugerencias para realizar este trabajo y por sus finas atenciones que merecen mi más alto sentido de admiración y de respeto.

Quiero expresar también un agradecimiento a mis buenos amigos Oscar Bayly, Leonel Molina y José Luis Linares.

Por último, pero no menos importante, al personal de la sección de Fitomejoramiento y del Laboratorio de Cultivo de Tejidos y en especial a mis colegas David Rodríguez y Pablo Montalván por su ayuda siempre grata y desinteresada.

TABLA DE CONTENIDO

Titulo.....	i
Derechos de autor.....	ii
Aprobación.....	iii
Dedicatoria.....	iv
Agradecimientos.....	v
Tabla de contenido.....	vi
Indice de cuadros.....	vii
Indice de figuras.....	x
I. INTRODUCCION.....	1
II. REVISION DE LITERATURA.....	7
A. Estado de desarrollo del polen.....	9
B. Factores ambientales.....	12
C. Pretratamientos a la planta donante.....	14
D. Condiciones de incubación.....	16
E. Medios de cultivo.....	18
F. Genotipo de la planta donante.....	24
G. Regeneración de plantas.....	27
H. Practicabilidad del cultivo de anteras.....	28
I. Una metodología para extraer anteras.....	30
III. MATERIALES Y METODOS	
A. Variedades, ubicación y siembra.....	32
B. Métodos de cultivo	
1. Desinfección del material vegetal.....	33
2. Cristalería.....	34
3. Disección y cultivo.....	34
4. Area de crecimiento.....	35
C. Cultivo de anteras.....	35
IV. RESULTADOS Y DISCUSION.....	40
V. CONCLUSIONES.....	56
VI. RECOMENDACIONES.....	57
VII. RESUMEN.....	59
VIII. LITERATURA CITADA.....	60
IX. DATOS BIOGRAFICOS DEL AUTOR.....	64

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Variedades de arroz que se utilizaron para obtener plantas haploides. El Zamorano, Honduras, 1991	31
Cuadro 2. Días a floración de las variedades usadas en los experimentos.	33
Cuadro 3. Composición química del medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS).	35
Cuadro 4. Combinaciones de auxinas y citoquininas en el medio de MS usadas en el estudio.	36
Cuadro 5. Composición química de los medios nutritivos J19 y E24 (B5 o de Gamborg modificados)	38
Cuadro 6. Comparación entre variaciones de temperatura promedio para la zona del valle de El Zamorano y las variaciones en la época en que se realizó el estudio. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	40
Cuadro 7. Porcentaje de sobrevivencia de las anteras de seis variedades de arroz en medio MS. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	42
Cuadro 8. Porcentajes de sobrevivencia de las anteras de seis variedades pretratadas a 7°C por 4 días a y cultivadas en el medio de MS. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	43
Cuadro 9. Porcentaje de sobrevivencia de las anteras de seis variedades de arroz pretratadas a 7°C por 12 días en el medio de MS. El Zamorano, Honduras, 1991-1992	43
Cuadro 10. Efecto de diferentes concentraciones de ANA y KIN en el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de seis variedades pretratadas a 7°C por 0, 4, 8 y 12 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	45

Cuadro 11.	Efecto de las diferentes concentraciones de una auxina (ANA) y de una citoquinina (KIN) en el porcentaje de anteras vivas de 6 variedades sin choque de frío a las 24 semanas. El Zamorano, Honduras, 1991-1992 .	46
Cuadro 12.	Efecto de las diferentes concentraciones de una auxina (ANA) y de una citoquinina (KIN) en el porcentaje de anteras vivas de 6 variedades a las 24 semanas con choque de frío de 7°C por 4 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	47
Cuadro 13.	Efecto del ANA y de la KIN en el medio de MS sobre la sobrevivencia de anteras de la variedad TBNT a las 24 semanas con choque de frío de 7°C por 8 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992	47
Cuadro 14.	Efecto del ANA y de la KIN en el medio de MS sobre la sobrevivencia de anteras de 6 variedades a las 24 semanas con choque de frío de 7°C por 12 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	47
Cuadro 15.	Efecto del tratamiento sin frío en el porcentaje de sobrevivencia de anteras de arroz de tres variedades cultivadas en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	49
Cuadro 16.	Efecto de preincubar con frío a 5°C por ocho días en el porcentaje de sobrevivencia de anteras de arroz de tres variedades en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	49
Cuadro 17.	Influencia de la incubación a 5°C por ocho días y en completa oscuridad sobre el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de la variedad RICO I en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	50
Cuadro 18.	Influencia de la incubación a 5°C por ocho días y en completa oscuridad sobre el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de la variedad NWBT en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992	51

Cuadro 19.	Influencia de la incubación a 5°C por ocho días y en completa oscuridad sobre el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de la variedad TBNT en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	51
Cuadro 20.	Diferencia entre genotipos de tres variedades en el porcentaje de sobrevivencia de sus anteras en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	52
Cuadro 21.	Diferencia entre genotipos de tres variedades en el porcentaje de sobrevivencia de sus anteras en dos medios diferentes preincubadas a 5°C por ocho días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.	53
Cuadro 22.	Comparación entre el tratamiento con frío (5°C por ocho días en completa oscuridad) y sin frío, en el porcentaje de anteras vivas de la variedad de arroz CICA 8 provenientes de distintas partes de la ramificación del raquis central en el medio nutritivo J19. El Zamorano, Honduras, 1991-1992	54

INDICE DE FIGURAS

- Fig. 1. Comparación entre la precipitación promedio mensual para la zona del valle de El Zamorano y el periodo en que se realizó el estudio..... 40
- Fig. 2. Comparación entre las temperaturas promedio mensuales para la zona del valle de El Zamorano y las temperaturas promedio en el periodo del estudio... 41

I. INTRODUCCION

La rápida tasa de incremento de la población en el mundo está imponiendo una presión constante al sector agrícola orientado a producir suficiente alimento, tanto en calidad como en cantidad. Se ha tratado de solucionar este problema desde dos puntos de vista, incrementando la productividad en las tierras arables disponibles y utilizando tierras inútiles, es decir tierras que se encuentran expuestas a condiciones subóptimas para el crecimiento de los cultivos como la salinidad, la sequía y otros factores de estrés. El incremento significativo en rendimientos por área ha llegado a un nivel muy difícil de superar debido a que la brecha entre los rendimientos actuales y el potencial de las variedades se ha acortado, por esto, se podría ganar más terreno si se dedicaran los esfuerzos a utilizar tierras no arables.

La necesidad, entonces, de mejorar ciertos genotipos y de crear otros que se adapten a las diferentes condiciones de cultivo y en el menor tiempo posible, ha hecho de la Biotecnología una herramienta importante en el mejoramiento de las especies (Khush y Virmani, 1985; citados por Zapata y Torrizo, 1988).

Las técnicas de cultivo de tejidos se empezaron a usar hace aproximadamente 50 años en las investigaciones sobre

fisiología y genética vegetal. Estas técnicas consisten, básicamente, en cultivar, en medios nutritivos adecuados y en forma aséptica, ápices de raíz y tallo, primordios de hoja, primordios o partes inmaduras de flores, frutos inmaduros, órganos aislados, embriones, segmentos de órganos de tallo y de hojas y algunas veces, ovarios, óvulos, anteras y polen o células aisladas.

El desarrollo de las técnicas de cultivo de tejidos de plantas ofrece la posibilidad de introducir variabilidad que podría ser utilizada para el mejoramiento de los cultivos. Una de estas técnicas es la producción de haploides por medio del cultivo de anteras, que con su constitución genética única, tienen potencial para acelerar la producción de nuevas variedades homocigotas o líneas isogénicas y líneas puras en un solo paso. Este procedimiento, realizado en el campo, tomaría de cinco a seis ciclos de autofecundación. En el caso de las plantas dioicas y en aquellas que son autoincompatibles, es prácticamente imposible la obtención de líneas puras por las técnicas tradicionales (Snape, 1989; Ochoa, 1970). Además, en el mejor de los casos, las líneas puras obtenidas en el campo no son homocigotas más allá de un 90 a un 95%, mientras que las producidas en laboratorio, ya sea cultivando anteras o microsporas, son 100% homocigotas (por duplicación cromosómica con colchicina u otro mutagénico).

La principal ventaja de la producción de haploides para

luego diploidizarlos, es la posibilidad de crear líneas homocigotas a partir de padres heterocigotos, en una sola generación, y, si los padres son homocigotos, se pueden incrementar los rendimientos o mejorar sus características. Entonces, en primer término, podemos ahorrar tiempo al seleccionar material listo para la comercialización y, en segundo, se puede incrementar la eficiencia de selección gracias a un incremento en la variación genética aditiva, por razón de una ausencia de dominancia y segregación dentro de la misma familia y a un decremento del efecto del ambiente sobre el genotipo a lo largo de las generaciones subsiguientes (Snape, 1989).

La importancia de los haploides en los campos de la genética y el mejoramiento de las plantas se ha tomado en cuenta desde hace mucho tiempo; sin embargo, su utilización se ha mantenido restringida debido a la baja frecuencia con que ocurren en la naturaleza (0,001% a 0,01%) a través de partenogénesis. Raramente, también, se reproducen los caracteres de la línea parental masculina sugiriéndose con esto un origen a través de "androgénesis del óvulo" (desarrollo del embrión dentro del óvulo por la actividad individual del núcleo masculino) (Bhojwani y Razdan, 1983).

Los gametos, a pesar de ser células haploides, pueden dividirse y organizarse para formar órganos y plantas completas cuando se les cultiva en medios sintéticos apropiados. Las plantas regeneradas son generalmente

haploides, pero se pueden diploidizar para obtener plantas homocigotas.

Las esporas haploides ya sean masculinas (microspora) o femeninas (megaspora) se pueden inducir a un crecimiento preferencial si se ajustan apropiadamente las condiciones de cultivo. Las plantas regeneradas de estas células llevan sólo un juego cromosómico, es decir, se produce un individuo haploide. Este complemento debe ser duplicado para producir una planta fértil presumiéndose, por lo tanto, que sea homocigota y mejorada (Chu, 1982; Hermsen y Ramanna, 1981; Nitzsche y Wenzel, 1977; Snape, 1982; citados por Dunwell, 1986).

Hasta 1966 la producción artificial de haploides era lograda por medio de hibridación distante, polinización retardada, aplicación de polen irradiado, tratamiento con hormonas o por choques de temperatura, pero ninguno de estos métodos es muy eficaz y seguro. Con las técnicas de cultivo de tejidos se han solventado muchos problemas y la producción de haploides de arroz, y luego plantas diploides homocigotas, ha avanzado drásticamente en los últimos años. Sin embargo, la aplicación potencial de éstas, ha sido obstaculizada por la dificultad de inducir morfogénesis, ya sea directamente del cultivo de microsporas o, indirectamente, de callo derivado de microsporas.

En general, los cereales se caracterizan por una baja eficiencia en cuanto a la producción de callo y a la

regeneración de plantas verdes a partir de microsporas. El arroz es un buen ejemplo de este fenómeno y en la literatura se citan numerosos ejemplos, aunque, según otros investigadores se han obtenido resultados promisorios. Hay varios factores que afectan el cultivo de anteras y entre ellos podemos mencionar el estado de desarrollo de los granos de polen, los tratamientos físicos, el medio de cultivo y el estado fisiológico de las plantas donadoras.

A pesar de estas dificultades, los científicos chinos han tenido éxito en la generación de nuevas variedades obtenidas de polen de plantas F₁, obtenidas, a su vez, de cruces sexuales entre las subespecies japónica e indica (Hu, 1978; citado por Zapata et al., 1983).

Los métodos de cultivo de tejidos usados en el International Rice Research Institute (IRRI) incluyen cultivos de anteras, de polen aislado, de células somáticas y de protoplastos y en un futuro cercano se incluirán técnicas de fusión de protoplastos y de transferencia de ADN. Estos métodos se utilizan ya que son aplicables en el mejoramiento de variedades adaptadas a condiciones adversas, a través de: (1) fijación inmediata de homocigocidad para la producción de líneas estables más rápidamente, (2) generación de variantes somatoclonales o gametoclonales, (3) hibridación somática y (4) técnicas de transferencia de genes.

El objetivo del IRRI es identificar variedades de arroz en las que se puedan cultivar sus anteras (capacidad

individual para regenerar callo y plantas).

El presente trabajo, de carácter pionero en la Escuela Agrícola Panamericana (EAP), tuvo como objetivo determinar una metodología que nos permita obtener plantas haploides de arroz para futuras evaluaciones, luego de diploidizarlas, como variedades o como líneas puras, en la producción de híbridos.

BIBLIOTECA WILSON FLORENDE
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APRIL 1963 11
TEGUCIGALPA HONDURAS

II. REVISION DE LITERATURA

El principal objetivo del cultivo de anteras es la producción de plantas haploides a partir del gametofito masculino o microspora, y su principal ventaja radica en que es el método más rápido de llevar líneas heterocigotas a la homocigocidad incrementando la eficiencia de selección y permitiendo una expresión temprana de genes recesivos.

Las técnicas del cultivo de anteras se han utilizado en investigaciones básicas para probar proporciones de segregación de genes y en investigaciones aplicadas para desarrollar nuevas variedades.

Los primeros cultivos exitosos de microsporas los realizó Tulecke en la década de los años 50 (Sunderland y Dunwell, 1977). Usando granos de polen de ciertas gimnospermas, demostró que al ser cultivadas en medios apropiados, se podía cambiar su desarrollo normal hacia la formación de callos y se dio el nombre de "cultivo de polen" a esta técnica. Sin embargo, no todos los granos respondían de la misma manera. Mientras que la mayoría continuaba su desarrollo normal y daban origen a tubos polínicos y espermas, otros mostraban un comportamiento diferente. Posteriores intentos de Tulecke y sus colaboradores para estimular al polen de angiospermas de

manera similar, no tuvieron éxito, pues los granos de polen al desarrollarse siempre daban origen a tubos polínicos.

En 1964 Guha y Maheshwari descubrieron que el polen de Datura innoxia, podía ser inducido a producir crecimiento activo cuando se lo cultivaba sin ser removido de la antera, y, en 1967 Bourgin y Nitsch (citados por Navarro y Vera, 1988) informaron asimismo, la producción de haploides de Nicotiana tabacum y N. sylvestris.

Desde entonces se ha aplicado la técnica con éxito en más de 200 especies vegetales (Ochoa, 1990).

El cultivo de anteras fue un descubrimiento de suma importancia debido a que se determinó que el polen podía ser inducido a tener un crecimiento y un desarrollo organizado y que además conducía a la producción de plantas haploides (Guha y Maheshwari, 1967; citados por Sunderland y Dunwell, 1977).

Cada planta era producida a partir de un grano de polen. Desde entonces, cultivando polen dentro de sus anteras, y en pocos casos removiéndolas de éstas, otras angiospermas han podido ser regeneradas a partir del cultivo de su polen ya sea directamente vía embriogénesis o indirectamente vía callo.

Las plantas haploides obtenidas por medio del cultivo de anteras se dividen en dos grupos; aquellas que se forman directamente del polen a través de un desarrollo embriogénico verdadero y las que se regeneran a partir de callo. En este caso se reducen las posibilidades para la experimentación debido a los cambios resultantes en el comportamiento

cromosómico durante el estado de callo (Nitsch y Norreel, 1973).

Aunque la eficiencia de la producción de callo a partir de anteras de arroz se está incrementando, la eficiencia total es aún baja (número de callos/número de granos de polen) considerando que una antera tiene cerca de mil granos de polen. Por esta razón es preciso revisar los factores que influyen en una mayor o menor respuesta de las anteras, los granos de polen y los callos producidos.

A. Estado de desarrollo del polen

El estado de desarrollo del polen en el momento de cultivar las anteras es crítico para la inducción de la androgénesis.

Sin duda, la clave para el rápido desarrollo del cultivo de anteras fue descubrir que el polen de las angiospermas podía ser inducido a seguir una vía diferente que la de generar tubos polínicos, si se la cultivaba en un estado de desarrollo específico. Este período crítico empieza al final de la fase meiótica con la formación de las tetrasporas y termina antes de la deposición de almidón en la fase temprana gametofítica. Sunderland en 1974, definió seis estados de desarrollo de las anteras (Sunderland y Dunwell, 1977):

Estado 1. Anteras que contienen tetrasporas o esporas recién salidas de la célula madre. Las esporas están en la fase G1

del ciclo celular y el nivel del ADN nuclear es 1C.

Estado 2. Anteras que contienen esporas vacuoladas y en las que el núcleo está cerca a la pared de la espora, todavía en la fase G1.

Estado 3. Anteras que contienen esporas en el proceso de, o después de la duplicación del ADN (fase S o G2). Se distingue del estado 2 por el diferente tamaño de los núcleos.

Estado 4. Anteras que contienen polen en su primera mitosis.

Estado 5. Anteras que contienen granos de polen jóvenes y en el que las dos células gametofíticas están separadas por una pared curva.

Estado 6. Anteras que contienen granos de polen en los que se ha reabsorbido la vacuola y la célula vegetativa se llena de citoplasma.

En el arroz, la máxima respuesta se obtiene en el estado 3 (Wang, Sun y Chu, 1974; Citados por Sunderland y Dunwell, 1977).

El estado de las anteras se determina removiendo una de ellas del botón floral y tiñéndola con acetocarmin. A partir de esto se puede determinar el estado de las demás anteras; sin embargo, esto no se aplica cuando las especies tienen un número indeterminado de anteras como en el caso de los géneros Paeonia sp. y Anemone sp., donde pueden existir botones florales con 100 ó 200 anteras. Otro caso excepcional es Digitalis purpurea que tiene dos anteras, pero una madura

primero que la otra (Sunderland y Dunwell, 1977).

Con respecto al trabajo de Niizeki y Dono (1968), las plantas haploides fueron producidas a partir de tejido haploide de callo que a su vez proliferó de granos de polen. Para establecer el estado de desarrollo del polen más propicio para desarrollar callo, cultivaron varias anteras conteniendo cada estado de desarrollo polínico, desde arqueosporas hasta granos de polen maduros.

Ninguna de las anteras que contenían granos de polen antes del estado de tetrada o después del estado binucleado produjeron tejido calloso. Este se obtuvo sólo de granos de polen en estado uninucleado. Chen (1977) y Sun (1978) (citados por Zapata *et al.*, 1991) confirmaron que cuando las anteras están en estado binucleado no producen callo o lo hacen con poca frecuencia y, que además, en este caso, la mayoría de plantas regeneradas son albinas. Sin embargo Mercy y Zapata (1986) pudieron inducir anteras que contenían polen en estado binucleado temprano y tardío, a regenerar callo aunque reconocieron que el porcentaje fue menor que cuando se utilizaban anteras con polen en estado uninucleado medio a tardío. Estos resultados concuerdan con los de otros autores, quienes observan que existe una mayor producción de callo y regeneración de plantas verdes, cuando se cultivan anteras en la etapa uninucleada tardía.

Sin embargo, determinar el correcto estado de desarrollo del polen de las anteras es difícil, pues incluso dentro de

una misma florecilla se pueden encontrar granos de polen en diferente estado de desarrollo, incluso tan alejados como en estados temprano uninucleado a tardío binucleado (Mercy y Zapata, 1986). El estado de desarrollo nuclear puede ser aproximado hasta cierto grado, por algunas características externas de la espiguilla, como la distancia entre la aurícula de la hoja bandera y la aurícula de la hoja siguiente (Ono, 1975; citado por Sunderland y Dunwell, 1977; Mercy y Zapata, 1986). Mercy y Zapata (1986), determinaron que no se puede correlacionar la distancia entre aurículas con el estado de desarrollo del polen ni con la eficiencia de producción de callo aunque encontraron que distancias entre 7 y 8 cm entre aurículas produjeron más callo en las variedades Taipei 309 y Kulu, respectivamente.

Ochoa (1990) determinó que anteras más viejas sufren un decremento en la producción de callo y que al regenerarse se presentan más anomalías. Por otra parte, el estado de desarrollo del polen puede afectar la ploidía de las plantas regeneradas, aún cuando éstas sean verdes.

B. Factores ambientales

Aún cuando el estado de desarrollo del polen sea el adecuado, la respuesta de las anteras se puede ver afectada por otras variables, y una de las más importantes es el estado fisiológico de la planta donadora: las condiciones bajo las

cuales crece tienen un profundo efecto en el número de anteras que responden con la formación de callo o plántulas al ser cultivadas. Según Dunwell (1976), quien trabajó con Nicotiana tabacum (tabaco) y Bernard (1977) trabajando con triticale (citados por Collins y Genovesi, 1982), el fotoperíodo, la alta intensidad lumínica y la temperatura, son factores que influyen en el número de plántulas producidas por antera. En muchas ocasiones se considera que el material vegetal que proviene del campo es más vigoroso y da mejores resultados que el de plantas cultivadas en cámaras de crecimiento, empero la variación de luz, temperatura y humedad durante el cultivo, dificultan la reproducibilidad de los resultados in vitro (Ochoa, 1990).

Otras condiciones que parecen afectar esta respuesta, son el estado nutricional (Haberle-Bors, 1979; citados por Collins y Genovesi, 1982) y la edad de la planta (Sunderland y Dunwell, 1977). Estas variables pueden explicar, en parte, las diferencias estacionales observadas en las respuestas del polen y de anteras (Bernard, 1977; Durr y Fleck, 1980; citados por Collins y Genovesi, 1982).

Se ha propuesto una teoría para explicar cómo ciertos factores ambientales influyen en la formación de una población dimórfica de granos de polen pequeños y normales durante la floración temprana; estos granos de polen pequeños darían origen a la fracción embriogénica. Sin embargo existen controversias en este punto, pues otros autores, como Dunwell

(1986), piensan que los granos de polen tan pequeños, no tienen la capacidad de producir plantas haploides vía embriogénesis.

C. Pretratamientos a la planta donante

Otra ayuda para incrementar el potencial embriogénico de las anteras y del polen es someter a la planta donante o los botones florales a tratamientos físicos o químicos antes de ser removidos.

Sunderland (1978) (citado por Collins y Genovesi, 1982), halló un incremento de la respuesta del polen cuando sometió a las plantas maduras a bajas concentraciones de nitrógeno.

Hay también cierta evidencia de que manteniendo los tallos con flores en soluciones nutritivas, se puede incrementar la respuesta de las anteras (Sunderland y Dunwell, 1977).

La utilización de tratamientos con choques de frío a las anteras de arroz, ha contribuido a incrementar la eficiencia en el número de anteras que producen callo y luego se diferencian en plantas verdes. Temperaturas de 8°C por ocho días ha incrementado la producción de callo de las anteras (Zapata et al., 1991). Tratando las anteras por 14 días obtuvieron de igual manera una alta eficiencia, pero en este caso se incrementó también el número de plantas albinas que regeneraron. También se ha estudiado el efecto de someter a las panículas a enfriamiento antes del cultivo de las anteras,

informándose de resultados de máxima inducción con temperaturas de 13°C durante 10 a 14 días.

Sunderland y Dunwell (1977) sugieren someter a los botones florales a temperaturas de 4°C a 5°C y, en algunos casos, en condiciones de oscuridad. En general la duración de estos periodos de frío se estiman de tres a cuatro días dependiendo de las especies. El aumento en la producción de callos mediante el tratamiento con frío, también ha sido demostrado por otros investigadores (Chaleff et al., 1975; Genovesi et al., 1979; y Chaleff et al., 1981; citados por Zapata et al., 1991). Probablemente, el frío retrasa la senescencia de los tejidos somáticos de las anteras, lo que da como resultado un mayor porcentaje de granos viables de polen y desencadena la producción de proembriones.

En otros estudios se cita que una alternancia de temperaturas puede ser beneficiosa. Zapata y Torrizo (1986), probaron que sometiendo a las paniculas a tratamientos de 35°C por 15 minutos seguidos por tratamientos de frío por siete días a 10°C se incrementaba la eficiencia de producción de callo. El choque de frío promueve la sincronización y la viabilidad de los granos de polen y puede activar algunas enzimas necesarias para la producción de callo, al igual que el tratamiento con calor, el cual, además, induce a los granos de polen a un desarrollo vegetativo (callo en este caso) en lugar de su función generativa normal.

Sin embargo, Nishi y Mitsuoka (1969) trabajando con

anteras de arroz y Alán (1974), trabajando con anteras de Nicotiana sp. encontraron que los tratamientos con choques de frío no tenían ningún efecto sobre la inducción de las anteras a regeneración de plantas.

Zapata et al. (1986) determinaron que tratamientos con radiación podían ocasionar alteraciones genéticas favorables en cuanto a la capacidad de las anteras a regenerar plantas verdes, cuando estas provenían de semillas tratadas con rayos Gamma. Estudios preliminares demostraron la tendencia de los callos de estas anteras a regenerar plantas albinas. Al cultivar las anteras de las plantas originadas a partir de las semillas irradiadas con 20 krad de rayos Gamma, la producción de callo y de plantas albinas disminuyó, pero fue el único tratamiento que indujo a los callos a regenerar también en plantas verdes. En otro experimento de los mismos autores, al cultivar las anteras en medios acondicionados con glucosa, se incrementó la producción de callo con relación a los medios que no tenían este azúcar. Sin embargo también se incrementó la regeneración de plantas albinas y no produjeron plantas verdes, lo que sugiere que hasta cierto punto, la glucosa inhibe el efecto de la radiación.

D. Condiciones de incubación

Las variables más consideradas son la temperatura y la luz. A pesar de la poca y antagónica información respecto a los puntos óptimos, se considera que temperaturas de 25°C a

30°C son buenos, y periodos de iluminación desde el inicio del cultivo de las anteras (16 hr luz/ 8 hr oscuridad) o después de un corto periodo de inducción con oscuridad. Man Si Wang y Zapata (1987) obtuvieron buenos resultados al incubar las anteras cultivadas en la oscuridad entre 26°C y 27°C. Aunque otros estudios reportan condiciones de luz tenue a las mismas temperaturas (Mercy y Zapata, 1987), Shahjahan, Karim y Miah (1985), hallaron también una diferencia significativa entre cultivar anteras de la variedad Pajam bajo luz (2.2% de producción de callo), contra incubarlas en oscuridad (7.0% de producción de callo). Estos autores aseguran que el incubar las anteras bajo luz o en la oscuridad, arroja resultados diferentes, lo cual indica en apoyo a otros autores, que mediante la manipulación de las condiciones de cultivo se puede incrementar la capacidad para formar callo; al incubar las anteras en la oscuridad, se incrementó la regeneración de plantas verdes, aunque en términos generales también se incrementó la regeneración de plantas albinas.

Otras variables de incubación que parecen afectar la respuesta, son la posición de las anteras en el medio (Sunderland y Dunwell, 1977; Mercy y Zapata, 1987), su densidad en los frascos de cultivo (Fouletier, 1974; citado por Sunderland y Dunwell, 1977) y el volumen atmosférico de los frascos (Sunderland y Dunwell, 1977). De acuerdo con ellos el ambiente gaseoso determina la conducta del polen, pues al cultivar las anteras, éste se remueve y pasa de un ambiente

básicamente anaeróbico a uno aeróbico, lo cual puede inducir a un cambio del desarrollo gametofítico a un desarrollo esporofítico (Sunderland y Dunwell, 1977). Estos autores citan a Wang et al. (1974) quienes a su vez informaron que al incluir ácido 2-cloroetilfosfónico (fuente de etileno) en concentraciones entre 8 y 40 mg/L en el medio de cultivo se incrementaba la respuesta de las anteras de arroz en aproximadamente tres veces.

Sin embargo, las tasas de respiración y posiblemente de la evolución del etileno, difieren entre especies y es necesario realizar estudios más específicos sobre este tópico.

Con respecto a las condiciones específicas de luz y temperatura para incubar los callos e inducirlos a regeneración, tampoco hay mayor información. Man Si Wang y Zapata (1987 a) obtuvieron buenos resultados al incubar callos bajo luz continua (3000 lux) y a temperaturas entre 26°C y 27°C, sin embargo, Shahjahan, Karim y Miah (1985), lograron un incremento de regeneración de plantas verdes cuando los callos se incubaron en la oscuridad.

E. Medios de cultivo

La composición del medio de cultivo es otro factor importante en la producción de callos y plantas de arroz a partir del cultivo de anteras.

En general las especies vegetales utilizadas en los cultivos de tejidos, se pueden separar en aquellas que

requieren un medio basal simple (MBS) que contiene minerales, vitaminas y azúcares y aquellas que necesitan un medio que contenga un estímulo adicional, en forma de hormonas o de reguladores del crecimiento. Entre estas tenemos a su vez, las especies hormona-independientes y hormona-dependientes. En el primer grupo, las hormonas necesarias deben provenir de la pared de la antera o del propio polen, pues de acuerdo con Ochoa (1990), se presume que la pared sintetiza algunos compuestos que se liberan en el medio y promueven la embriogénesis; por lo general a este grupo pertenecen especies dicotiledóneas. Se ha informado que concentraciones bajas de auxinas, citoquininas y ácido abscísico pueden incrementar la inducción del polen a formar callo y que altas concentraciones pueden inhibirlo por completo.

Al grupo hormona-dependientes, pertenecen generalmente las monocotiledóneas y ciertas dicotiledóneas como las de los géneros Brassica sp. y Asparagus sp.. En este caso, las auxinas tienen un papel más relevante mientras que el de las citoquininas y otras hormonas aún no está muy claro. Además de estos compuestos, muchas veces el medio tiene que ser suplementado con otros factores de crecimiento como extracto de levadura, agua de coco, extracto de papa, proteínas y ácidos nucleicos hidrolizados y amidas como glutamina y asparagina, los cuales además de incrementar la tasa de crecimiento del callo proveniente del polen, incrementan su potencial regenerativo. También se considera el hierro (Fe)

como importante en los medios de cultivo.

El desarrollo del medio N6 (Chu et al., 1975; citados por Genovesi y Magill, 1982), en el cual la relación nitrato:amonio-nitrógeno es óptima para inducir producción de callo, es de gran utilidad pues se ha encontrado una mayor respuesta de las anteras. Se ha comprobado que el incrementar la cantidad de nitrato y disminuir la concentración de amonio acarrea consecuencias positivas (Chu et al., 1975) (citados por Sunderland y Dunwell, 1977).

Anteras de tabaco y cebada producen más callo si el medio ha sido acondicionado. Este medio acondicionado consiste básicamente en un medio E10, en el cual se diluye otro medio (B5 o de Gamborg) llamado medio de acondicionamiento y en el que se han cultivado previamente anteras maduras (granos de polen con gránulos de almidón). Zapata et al., (1985) determinaron que se incrementaba la producción de callo para la variedad Taipei 309 cuando se usaba la proporción de 1:8 (medio B5:medio E10) en 1,6 veces más que el testigo (medio E10 puro). Sin embargo, la proporción 1:2 resultó más eficaz en cuanto a porcentaje de plantas regeneradas. Nitsch y Norreel (1973), al añadir extracto de anteras embriogénicas también obtuvieron buenos resultados.

Un problema en el cultivo de anteras de arroz, es la baja frecuencia con que se encuentra formación de callo y aunque ésta se puede incrementar al cultivar en medio líquido, muchas veces son pocas las anteras que responden. Zapata y Torrizo

(1985) concluyeron de su estudio con ciertos componentes y otros aditivos orgánicos, que la adición de nitrógeno y de puré de bananas (por separado) reducía el porcentaje de anteras que producían callo. Sin embargo la adición de manitol en un 1% incrementaba la producción de callo. Esto se puede deber a que el manitol incrementa el potencial osmótico del medio, que es un factor crítico para la inducción de callos. De igual forma, al añadirsele agua de coco en un 10% al medio, se obtuvo un incremento en la producción de callo, lo que se puede deber, en parte, a su contenido de mio-inositol, reguladores de crecimiento y aminoácidos.

Zhang Chengmei y Zhang Zhenghua (1990) descubrieron que añadiendo extracto de paste (Luffa cilíndrica Roem) en concentraciones de entre 15% y 20% se incrementaba la eficiencia en la producción de callo ya que éste se formaba entre los 30 y 45 días luego de cultivadas las anteras, en contraste con el medio al que no se le añadía extracto, donde se formaba callo de 45 días en adelante. Otra anotación importante fue que el callo formado con extracto de paste, alcanzaba un 90% de regeneración en plantas verdes en arroz tipo japonica y se mejoraba notablemente en los de tipo indica. Además los pesos seco y fresco de callo y plantas, también se incrementaban.

Matsubayashi y Kuranuki (1975) (citados por Sunderland y Dunwell, 1977) y Mercy y Zapata (1986 b), han determinado que concentraciones de sacarosa de entre 5% y 15% en el medio de

cultivo, inducen a las anteras a producir mayor cantidad de callo y se pueden regenerar mayor cantidad de plantas verdes, aunque también se incrementa la frecuencia de plantas albinas. El azúcar, de acuerdo con Sunderland y Dunwell (1977), parece regular también el potencial osmótico del medio y permite mayores absorciones de auxinas.

Al omitir el agar en los medios de cultivo, se ha obtenido un incremento en la producción de plantas (Zapata et al., 1991). Con las anteras de Nicotiana también se han encontrado diferencias en la respuesta al medio líquido o semisólido (Wernichke y Kohlenback, 1976; citados por Zapata et al., 1991). Estos investigadores opinan que se puede lograr una producción de callo más eficiente en los medios líquidos pues, aunque la producción de callos en medios semisólidos es alta, el número de granos de polen activados para seguir la vía de la androgénesis es mínimo, lo que se puede deber tal vez a la competencia entre los granos de polen (6 anteras/ml). Mediante el uso de un medio líquido es posible reducir al mínimo la competencia entre éstos (1 antera/6-7 ml), y se permite que el callo formado dentro de la antera se sumerja en el medio de cultivo. El medio líquido tiene a su vez otras ventajas como la de permitir una dispersión más rápida de cualquier compuesto nocivo que produzcan los granos de polen muertos, disminuyendo su efecto, y la de facilitar la entrada de los nutrimentos.

Por otra parte, se sabe que el agar comercial puede

contener contaminantes que impiden el desarrollo del polen.

La adición de carbono activado, puede ser un factor clave para incrementar la producción de callo o plántulas, pues este adsorbería los compuestos inhibitorios (Tanaka, 1971; Nakamura e Itagaki, 1973; Anagnostakis, 1974; citados por Sunderland y Dunwell, 1977).

Shahjahan et al., (1985), nos demuestran finalmente la importancia de la composición del medio de cultivo, pues determinaron que genotipos iguales respondían de diferente manera en cada uno de los medios que ellos usaron.

Entre los medios para la regeneración de callo, el más citado por la literatura es el de Murashige y Skoog (MS).

En un estudio sobre regeneración de callos, Zapata et al., (1991) determinaron que se producían más plantas verdes en un medio E24, que es un medio de Gamborg (1968) modificado. Tomando en consideración las observaciones de Inoue et al., (1979) y de Yao et al., (1981) (citados por Zapata et al., 1991), la mayor eficiencia de regeneración de plantas de los callos inducidos con este medio, se puede deber a la presencia de 2,4-D, el cual acelera la producción de brotes de arroz al aumentar la síntesis de citoquininas. Esta condición puede producir una relación óptima auxina-citoquinina, la cual es necesaria para la inducción de los brotes. Podría suceder que, en granos de polen seleccionados por su capacidad para producir callos altamente embriogénicos, el 2,4-D desencadenara esa producción. Esto apoya la observación de Woo

y Su (1975) (citados Zapata et al., 1991) de que en el arroz, los callos inducidos a partir de anteras que se han cultivado en un medio con 2,4-D, y posteriormente se han sembrado en un medio sin reguladores de crecimiento, tienen la capacidad para regenerar plantas.

También parece ser que la parafluorofenilalanina adicionada al medio, puede estabilizar o seleccionar las células haploides de los callos (Ochoa, 1990).

F. Genotipo de la planta donante

La androgénesis es un factor muy relacionado con la constitución genética de las especies. Así, miembros de las familias Solanaceae y Gramineae tienen relativa facilidad para la regeneración in vitro (Ochoa, 1990), pero pueden existir diferencias incluso entre variedades de una misma especie. Este concepto lo defienden Zapata y Torrizo (1986), quienes consideran al arroz tipo indica como una variedad recalcitrante debido a su baja capacidad para producir callo y regenerar luego en plantas verdes.

Para algunas especies como Zea mays (maíz) (Miao et al., 1978), Hordeum vulgare (cebada) (Wenzel et al., 1977), Solanum tuberosum (papa) (Jacobsen y Sopory, 1978) (Citados por Collins y Genovesi, 1982), el genotipo de la planta donante es un factor importante en la respuesta de las anteras al ser cultivadas in vitro, y por lo tanto puede ser usado para mejorar la capacidad productora de callo y la capacidad de

estos callos a regenerar en plantas verdes.

En papa, genotipos de baja respuesta se han cruzado entre sí, con lo cual se ha incrementado significativamente la respuesta de las anteras cultivadas. Collins y Genovesi (1982) citan también a Bernard (1977) para explicar que en triticale, la heterocigocidad parece importante en la respuesta de las anteras, pues se ha observado un mejor desempeño de éstas en poblaciones F2 que las de líneas F7. Haploides duplicados de trigo pueden responder mejor que las líneas parentales y los híbridos F1 de estos haploides lo hacen todavía mejor (Picard y DeBuyser, 1977; citados por Collins y Genovesi, 1982). Cultivares de Oryza sativa (arroz) con esterilidad masculina (Ling et al., 1978) y Lycopersicon esculentum (tomate) (Zamir et al., 1980) (citados por los mismos autores), han dado buenos resultados cuando se cultivan sus anteras. Como una explicación posible a la diferente respuesta de ciertas especies o variedades en el cultivo de anteras, se ha propuesto que ciertos genotipos poseen un aminoácido endógeno particular que permite la inducción embriogénica (Dunwell, 1986).

De acuerdo con Sangwan (1978) (citado por Collins y Genovesi, 1982), en cultivos de Datura metel, durante la fase de inducción de formación del embrión, el 71% del total de los aminoácidos libres, consistía de treonina, serina, ácido glutámico, prolina y ácido γ -aminobutírico y, además, durante el curso de la embriogénesis se observaron cambios en los

niveles de aminoácidos.

Bajo condiciones similares de cultivo, cada uno de los genotipos de arroz examinados en un ensayo, manifestaron sus propias características en la relación de plántulas verdes:albinos (Wang et al., 1978; citados por Collins y Genovesi, 1982). Picard y DeBuyser en 1977 (citados por Collins y Genovesi, 1982) trabajando con trigo, determinaron que al cultivar anteras producidas por haploides duplicados producían de dos a tres veces más plántulas verdes que las líneas parentales. Esto sugiere la existencia de una base genética para el fenómeno del albinismo, que es observado comúnmente en las monocotiledóneas.

Algunos investigadores hacen hincapié en las diferencias que existen entre los genotipos de arroz con respecto a su capacidad para producir callos o plantas.

Zapata et al. (1991) corroboraron este punto de vista pues en un estudio con dos variedades, bajo las mismas condiciones y medios de cultivo, descubrieron que la respuesta de los genotipos era diferente, ya que el número de plantas regeneradas a partir de la variedad Giza 170 era casi el doble que las regeneradas con la variedad Taipei 309.

Por otra parte y de acuerdo con Karim et al. (1985), el arroz tipo indica tiene una eficiencia de producción de callo relativamente baja y en la mayoría de los casos el porcentaje de plantas verdes regeneradas es cero. Otro estudio hecho por

Karim et al (1987) con nueve variedades tipo indica y cinco cruces F2, confirma la diferencia en la capacidad de regeneración de los callos producidos.

G. Regeneración de plantas

La producción de callo y su capacidad regeneradora disminuyen con la edad del cultivo de anteras (Guiderdoni et al., 1990) y con la edad del callo (Sunderland y Dunwell, 1977). Esto es debido tal vez a una disminución de los nutrimentos disponibles en el medio no renovado, a una concentración de compuestos tóxicos producto de las paredes senescentes de las anteras o a ambos factores y que esto varía dependiendo de la variedad.

Man Si Wang y Zapata (1987 a) a pesar de compartir el concepto de la disminución de la capacidad regeneradora de los callos al incrementarse su edad y de haber determinado que callos provenientes de inflorescencias jóvenes regeneraban un poco mejor que aquellos provenientes de semillas maduras descascaradas aún cuando los primeros eran más viejos, no encontraron una diferencia significativa entre la capacidad de los dos tipos de explante. Por lo tanto los autores consideran, que de no existir realmente diferencias, y desde un punto de vista práctico, las semillas maduras son una fuente de explantes más conveniente que las inflorescencias, ya que pueden almacenarse y estar disponibles en cualquier época del año.

Man Si Wang y Zapata (1987 b) encontraron que se podía incrementar la respuesta de los callos provenientes de anteras de inflorescencias jóvenes y de semillas maduras de Oryza perennis Moench, al añadir una concentración de 4 mg/L de BAP al medio de cultivo.

En general, los callos que provienen de cruces indica por japonica tienen un potencial morfogénico más alto (capacidad de regenerar plantas verdes) en la semana sexta después del cultivo de las anteras, mientras que los callos provenientes del cruce japonica por japonica, tienen su mayor potencial a la cuarta semana y de ahí en adelante este decrece. Sin embargo, estos datos requieren de un estudio más específico para cada variedad o línea.

M. Practicabilidad del cultivo de anteras

La salinidad del suelo es una de las principales causas que reducen la productividad del cultivo de arroz en muchas áreas de Asia y América. El cultivo de anteras puede complementar las técnicas de mejoramiento para producir mutantes que sean tolerantes a esta condición. El primer informe sobre regeneración de plantas verdes a partir de callos expuestos a concentraciones de sal por largos periodos (Zapata y Abrigo, 1986) alimenta resultados promisorios, pues a pesar de que se pudo inducir a estos callos a regenerar plantas verdes, morían en poco tiempo cuando se las cultivaba en medios con diferentes concentraciones de NaCl y las que

sobrevivían no eran mutantes verdaderos. Con esto se determinó que las células del callo estaban sólo ajustadas fisiológicamente al NaCl y que no hay relación directa entre la tolerancia a nivel celular y la tolerancia a nivel de planta.

En la actualidad se han regenerado más de 8.000 plantas a partir del cultivo de anteras en el IRRI incluyendo haploides, diploides y poliploides. También se han producido más de 4.300 líneas derivadas de variedades y cruces de arroz de clima templado, tropical, de inundación, tolerantes al frío y a problemas del suelo. Por ahora se están llevando a cabo experimentos de campo con estas líneas y el IRRI suplirá de estas semillas para estudios de caracterización y de mejoramiento de la tolerancia a factores ambientales (Zapata, et al., 1985).

Por otra parte, el IRRI, en cooperación con la Administración de Desarrollo Rural de Korea, está desarrollando variedades de arroz tolerantes al frío y al acame, por medio de estos procedimientos.

La técnica también está siendo utilizada para desarrollar variedades resistentes a sequía y para incrementar la tolerancia a suelos salinos y con altas concentraciones de aluminio que son problemas en muchas regiones de Asia y América Latina. En términos generales, se busca también crear mutantes somaclonales por medio de la regeneración de plantas

para mejorar las variedades tradicionales pero resistentes o para incrementar la tolerancia de las modernas pero susceptibles.

Otro éxito considerable se ha tenido al identificar la parte del embrión que origina el callo embrionario y en incrementar la eficiencia de inducción somática del embrión (IRRI, 1985).

I. Una metodología para extraer anteras

Debido a la baja eficiencia de las anteras para regenerar plantas, muchas veces es necesario cultivar miles para obtener una población lo suficientemente grande en la que se puedan hacer selecciones deseables, por lo tanto aislar las anteras se convierte en una actividad pesada, aburrida y difícil y muchos investigadores la tachan de impráctica. Raina y Hadi (1987) idearon un método con el que pueden aislar un 80% de las anteras en menos del 50% del tiempo empleado con los métodos tradicionales. Ellos usaron una botella de alimentación para animales enjaulados de 125 ml hecha de polipropileno o polimetilpentano y le adaptaron un tubo de acero de 3,5 cm de largo a la tapa de rosca. Desde la base hasta unos 3/4 de la altura total de la botella, hicieron ranuras de 1,5 mm de ancho y de 3 cm de largo en cuatro columnas y separados 4 mm entre sí. Cuando las florecillas se agitaron en la botella las ranuras dejaban paso a las anteras mientras que las glumas vacías quedaban dentro. Al sacar la

botella, las anteras recolectadas quedaban flotando en el vaso de precipitación de 500 ml lleno de medio líquido.

III. MATERIALES Y METODOS

A. VARIEDADES, UBICACION Y SIEMBRA

Se utilizaron anteras de seis variedades norteamericanas de arroz recientemente introducidas a Honduras (Cuadro 1), más la variedad CICA 8 que se ha cultivado por muchos años en América Central, y que se usó en el experimento 3.

Cuadro 1. Variedades de arroz que se utilizaron para tratar de obtener plantas haploides. El Zamorano, Honduras, 1991.

VARIEDAD	PROCEDENCIA
RICO	Univ. Arkansas
LMNT	Univ. Arkansas
NWBT	Univ. Arkansas
KATY	Univ. Arkansas
TBNT	Univ. Arkansas
MARS	Univ. Arkansas
CICA 8	CIAT

Las variedades se sembraron en terrenos de la Escuela Agrícola Panamericana (EAP) el 8 y el 22 de junio, el 6 de julio, el 7 de agosto, el 29 de noviembre, el 10, 23 y 31 de diciembre y el 4 de enero en la terraza 2 del Departamento de Agronomía. Las diferentes fechas de siembra tenían el único propósito de asegurar una fuente constante de anteras. El tamaño de la parcela fue de 9x6 m y se la dividió en tres partes de 3x6 m. Posteriormente, se sembraron cuatro parcelas

más de la misma dimensión. Todas las semillas para la siembra fueron pretratadas con una solución de Marshall (Busan + Malatión) para prevención de hongos e insectos. Las parcelas se mantuvieron en condiciones de secano, regándolas diariamente con mangueras, hasta que las plantas alcanzaron unos 20 cm de altura. Luego fueron inundadas.

Las plantas se fertilizaron con 18-46-0 a razón de 60 g por parcela al momento de la siembra y 30 g por parcela 15 días después de la misma. Se fumigaron con una solución de Agrymicin 500 más Benlate para prevención de hongos y de bacterias.

Los cultivos de anteras se hicieron en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la EAP.

B. METODOS DE CULTIVO

I. Desinfección del material vegetal

Aproximadamente dos días antes de que se abrieran las panículas (floración) (Cuadro 2), se recolectaron las panículas y fueron llevadas al laboratorio. Antes de ser cultivadas, las panículas se sumergieron por 20 minutos en agitación constante en una solución de hipoclorito de sodio al 1% en volumen (v/v) más unas gotas de Tween-80 como agente humectante. Luego se llevaron a la cámara de transferencias o de flujo laminar y se lavaron por lo menos tres veces con agua bidestilada estéril.

Cuadro 2. Días a floración de las variedades usadas en los experimentos.

Variedad	Días a floración esperados*	Días a floración observados
NWBT	90	80
MARS	90	80
RICO I	79	68
KATY	90	80
TBNT	79	75
LMNT	91	80

* Fuente: Corral, L. Comunicación personal. Escuela Agrícola Panamericana, 1991.

2. Cristalería

Se emplearon frascos de vidrio de 125 ml con tapas herméticas para el primer experimento y tubos de ensayo de 18x150 mm para el segundo. También se usaron platos de Petri para realizar las disecciones. En la preparación de los medios se utilizaron vasos de precipitación, pipetas graduadas, probetas y balones aforados.

Todos los instrumentos, cristalería y los medios, se esterilizaron en un autoclave a 1,06 kg de presión por cm² durante 20 minutos.

3. Disección y cultivo

En la cámara de transferencia, previamente desinfectada con alcohol etílico de 95% de pureza, se abrieron las flores con la ayuda de pinzas y agujas hipodérmicas (a manera de bisturíes), bajo un estereoscopio, y se disecaron las anteras evitando en lo posible causar daño al tejido y tratando de

dejar la menor cantidad de filamento (tejido diploide), para evitar que se regeneraran callos o plantas diploides. Otras anteras fueron obtenidas cortando la parte distal y basal de la florecilla. Luego se pasaron a los frascos o tubos de ensayo. Para sellar los frascos y tubos se utilizó Parafilm®. Los instrumentos se enjuagaron con alcohol de 95% y se flamearon con la ayuda de una lámpara de alcohol.

4. Area de crecimiento

Luego de ser cultivadas, las anteras se incubaron en la cámara de crecimiento. A excepción de aquellas que se preincubaron en frío y oscuridad (experimento 2), las demás se incubaron a una intensidad luminica de entre 2000 y 3000 lux dada por tubos de luz fluorescente, a 25°C, más o menos 1°C y con un fotoperíodo de 16 horas luz por 8 horas oscuridad.

C. CULTIVO DE ANTERAS

Se realizaron tres experimentos. En el primero se probó el medio de Murashige y Skoog (MS) (1962) semisólido (Cuadro 3), en el que se estudió el efecto de la interacción de una citoquinina, la 6-furfurilaminopurina (KIN), con una auxina, el ácido naftalenoacético (ANA). En el Cuadro 4 se presentan las dosis y combinaciones usadas.

Cuadro 3. Composición química del medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS).

Macronutrientes	mg/L	mM
NH_4NO_3	1.650	20,6
KNO_3	1.900	18,8
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	3,0
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	1,5
KH_2PO_4	170	1,2
Micronutrientes	mg/L	μM
KI	0,83	5
H_3BO_3	6,2	100
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22,3	100
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	30
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	1,0
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,1
EDTA (Versenato)	43,0	100
Vitaminas y hormonas	mg/L	
Inositol	100	
Acido nicotínico	0,5	
Piridoxina.HCl	0,5	
Tiamina.HCl	0,1	
Sacarosa	30.000	
pH* del medio	5,7	

Cuadro 4. Combinaciones de auxinas y citoquininas en el medio de MS usadas en el estudio.

kinetina mg/L	ANA mg/L		
	0	1	2
0	0:0	0:1	0:2
1	1:0	1:1	1:2
2	2:0	2:1	2:2

El medio se ajustó a un pH de 5.6 y se colocaron 15 ml en cada frasco. Una vez esterilizados, se cultivaron de 5 a 6 anteras en cada uno, siendo cada frasco una repetición. Además se estudió el efecto de un pretratamiento con frío de 7°C a las anteras por 0, 4, 8 y 12 días.

Las anteras se transfirieron después de 10 semanas de cultivo, en vista de que no se regeneraban y suponiendo que los nutrimentos del medio MS ya habían sido metabolizados, a otro medio nutritivo para inducir a un crecimiento activo. Este medio fue el B5 o de Gamborg (1968), modificado (J19) semisólido (Cuadro 5).

En el segundo experimento se probaron dos medios, el J19 y el E24 (B5 o de Gamborg modificados) líquidos (Cuadro 5). A las anteras cultivadas se les dieron dos tratamientos: a) incubación en la cámara de crecimiento directamente, y b) sometimiento a un período de frío a 5°C por ocho días en completa oscuridad antes de incubarlas en la misma cámara. En este experimento se utilizaron anteras de las variedades RICO I, NWBT y TBNT. En este caso, se colocaron 7 ml de medio

líquido en tubos de ensayo y se proveyó de un puente de papel. En cada tubo se cultivó una antera siendo cada uno, una repetición.

En el tercer experimento se usó el medio J19 y se cultivaron anteras provenientes de florecillas con diferente ubicación en el raquis de la panícula, para determinar por medio de características morfológicas, cuáles tenían el polen en el estado apropiado. Además se les dio un pretratamiento de frío a 7°C por 4 días. Una parte del experimento consistió en llevar la mitad del número de las anteras cultivadas, a la cámara fría del Banco de Germoplasma y preincubarlas a 5°C durante ocho días y, la otra mitad, incubarla directamente en la cámara de crecimiento.

Cuadro 5. Composición química de los medios nutritivos J19 y E24 (B5 o de Gamborg modificados).

	J19	E24
Macronutrientes	mg/L	mg/L
KNO ₃	2.500	2.500
CaCl ₂ .2H ₂ O	150	150
MgSO ₄ .7H ₂ O	250	250
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	134
NaH ₂ PO ₄ .H ₂ O	150	150
Micronutrientes	mg/L	mg/L
KI	0,75	0,75
H ₃ BO ₃	3,0	3,0
MnSO ₄ .H ₂ O	10	10
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2,0	2,0
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	0,025
EDTA (Versenato)	43,0	43,0
Vitaminas y hormonas	mg/L	mg/L
Acido nicotínico	1,0	1,0
Piridoxina.HCl	1,0	1,0
Tiamina.HCl	10,0	10,0
ANA	1,0	--
AIA	--	0,5
Kinetina	1,0	--
2,4-D	--	1,0
BAP	--	0,5
Inositol	160	160
Sacarosa	20.000	20.000
Glucosa	--	5.000
pH* del medio	5,6	5,6

Fuente: Zapata *et al.* (1991).

IV. RESULTADOS Y DISCUSION

Los datos se empezaron a tomar a las dos, tres y cuatro semanas después de que se cultivaron las anteras. Los datos presentados corresponden a los resultados obtenidos a las 22 y 24 semanas de los cultivos, en el caso del Experimento 1.

Para el Experimento 2, los datos se tomaron a las dos y tres semanas luego de ser cultivadas y los datos presentados corresponden a las lecturas de la quinta semana.

De igual manera, en el experimento alterno sobre cultivo de anteras provenientes de diferentes partes de la inflorescencia, los datos corresponden a las observaciones hechas a las seis semanas en cultivo.

Las condiciones climáticas imperantes en el lugar de siembra de las variedades y en general en toda la zona del valle de El Zamorano, en el periodo en que se hizo el estudio, no fueron las más aptas de acuerdo con la literatura citada.

De seguro, la condición fisiológica de las plantas donadoras estuvo afectada, especialmente, por la precipitación pobre (Figura 1), la temperatura (Figura 2) y sus cambios bruscos (Cuadro 6), y los cambios rápidos entre bajas y altas humedades relativas.

• Todos estos factores de estrés, determinaron un

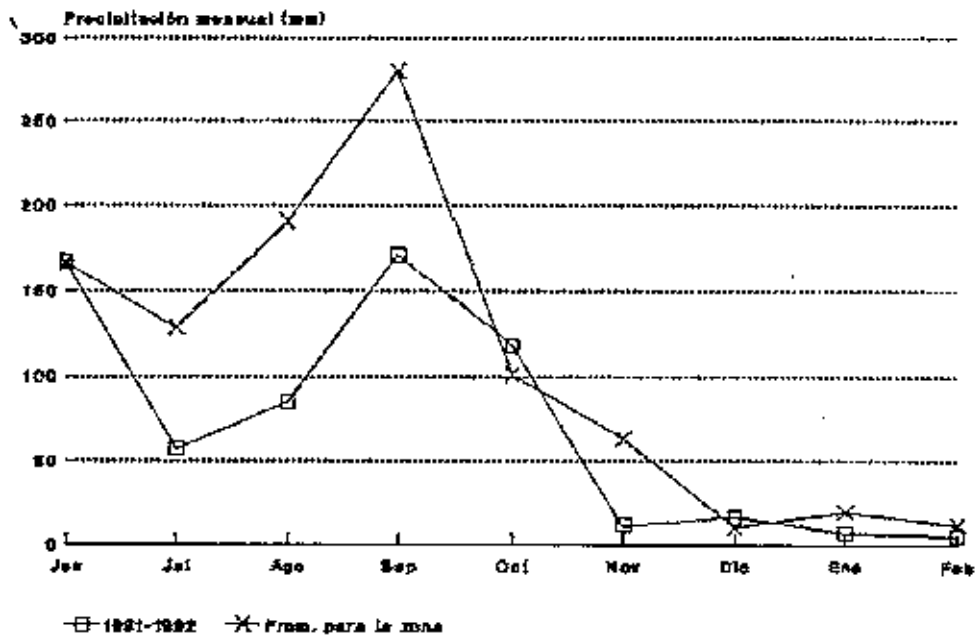


Fig. 1. Comparación entre la precipitación promedio mensual para la zona del Valle de El Zamorano y el periodo en que se realizó el estudio. Escuela Agrícola Panamericana, 1991.

Cuadro 6. Comparación entre variaciones de temperatura promedio para la zona del valle de El Zamorano y las variaciones en la época en que se realizó el estudio. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

	Temp. mínimas (°C)		Temp. máximas (°C)	
	Periodo del estudio	Promedio de zona	Periodo del estudio	Promedio de zona
Junio	17,0	19,4	31,8	30,4
Julio	13,5	18,9	31,7	29,6
Agosto	14,7	18,2	31,7	29,9
Noviembre	10,5	16,3	29,5	27,5
Diciembre	13,0	14,9	29,0	27,6
Enero	10,5	16,9	33,0	28,2

Fuente: Datos meteorológicos tomados en la Estación de la Escuela Agrícola Panamericana.

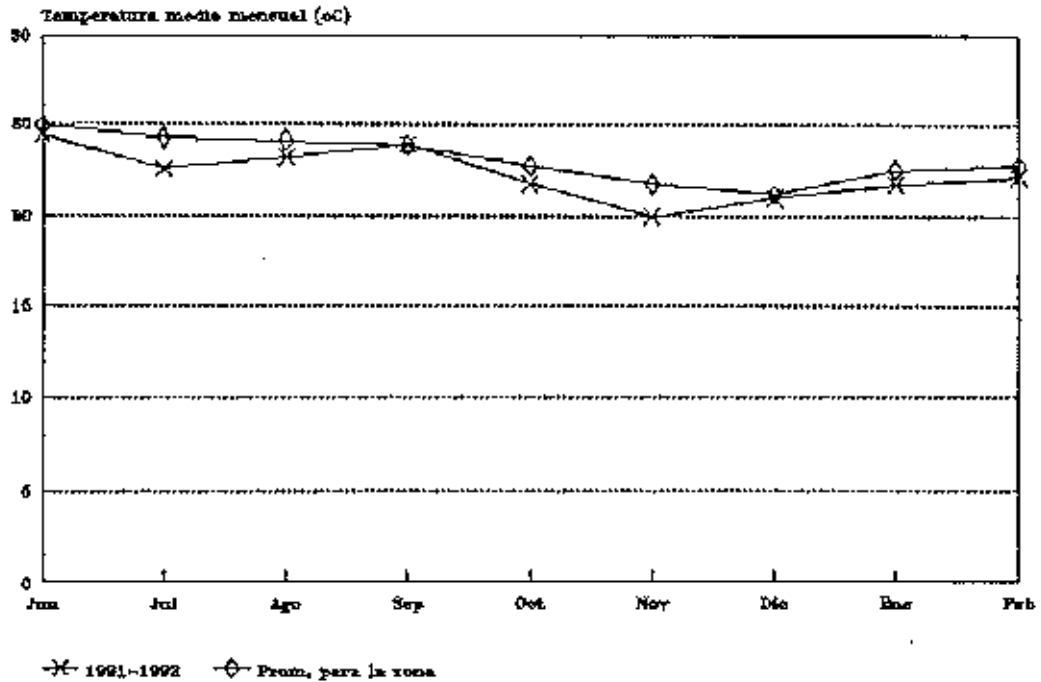


Fig. 2. Comparación entre las temperaturas promedio mensuales para la zona del valle de El Zamorano y las temperaturas promedio en el periodo del estudio. Escuela Agrícola Panamericana, 1991.

desarrollo pobre de las plantas, lo cual se puede apreciar en la floración más temprana de lo esperado (Cuadro 2), floración no sincronizada entre plantas de la misma variedad y observaciones hechas cuando la planta llegó a madurez de cosecha, de que muchas florecillas no habían llenado el grano. Este desarrollo anormal de las plantas pudo haber determinado un estado de desarrollo de las anteras y del polen no apto para que produzcan callo o regeneren plantas haploides completas.

Sin embargo, con base en el comportamiento observado de

las anteras cultivadas, fue posible comprobar algunos de los factores físicos y bioquímicos que influyen en la conducta órgano y embriogénica de los granos de polen y que desembocan en resultados exitosos a partir del cultivo de anteras.

Experimento 1

Con este experimento se pudo analizar el efecto de la diferencia entre genotipos, tiempo de exposición de las anteras a temperaturas bajas y la interacción de diferentes concentraciones de hormonas.

Tomando en cuenta el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de cada una de las variedades, no se encontró una diferencia marcada entre los genotipos, cuando no se les dio el pretratamiento con frío (Cuadro 7).

Cuadro 7. Porcentaje de sobrevivencia de las anteras de seis variedades de arroz en medio MS. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Var.	No. anteras sembradas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	sobrev. (%)
MARS	90	5	10	10	5	0	10	10	10	5	72,2
LMNT	80	0	10	10	5	5	5	15	5	10	81,2
NWBT	95	10	10	10	0	0	10	5	10	5	63,2
RICO I	85	5	10	10	10	5	5	10	5	10	82,4
KATY	95	10	10	10	10	5	5	5	10	15	84,2
TBNT	135	10	10	10	10	15	10	15	10	15	77,8
Total sembradas	580	40	60	60	40	30	45	60	50	60	75,9

Sin embargo, al analizar los Cuadros 8 y 9, se puede apreciar que cierta diferencia, aunque puede deberse a la alta contaminación encontrada, luego de haber incubado las anteras.

Cuadro 8. Porcentajes de sobrevivencia de las anteras de seis variedades pretratadas por 4 días a 7°C y cultivadas en el medio de MS. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Var.	No. anteras sembradas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	sobrev. (%)
MARS	45	0	0	0	5	5	5	5	0	5	55,6
LMNT	45	5	5	0	0	0	5	5	0	0	44,4
NWBT	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RICO I	45	5	5	0	0	0	0	0	0	5	33,3
KATY	45	5	0	5	5	5	5	5	0	0	66,7
TBNT	45	0	0	5	5	5	5	5	5	0	66,7
Total sembradas	270	15	10	10	15	15	20	20	5	10	44,4

Cuadro 9. Porcentaje de sobrevivencia de las anteras de seis variedades de arroz pretratadas por 12 días a 7°C en el medio de MS. El Zamorano, Honduras, 1991-1992

Var.	No. anteras sembradas	1	2	3	4	5	6	7	8	9	sobrev. (%)
MARS	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
LMNT	50	5	10	0	5	0	5	0	0	5	60
NWBT	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
RICO I	45	0	0	0	0	5	0	0	0	0	11,1
KATY	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
TBNT	45	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Total sembradas	275	5	10	0	5	5	5	0	0	5	12,7

* Se presentó alta contaminación por bacterias.

De acuerdo con los resultados que se presentan en el Cuadro 10, podemos observar que los pretratamientos con frío a las anteras, mejoran notoriamente la viabilidad de las mismas. Sin embargo, el tiempo de exposición antes de ser cultivadas es importante, pues como se puede apreciar, los mejores resultados se obtuvieron cuando se pretrataron por ocho días (aunque sólo se analizó la variedad TBNT). En el caso de los pretratamientos por 4 y 12 días, estos fueron menos eficientes incluso que el testigo.

Cuando se pretrataron por 12 días, se obtuvieron los índices más bajos de sobrevivencia. Esto podría explicarse ya que exposiciones prolongadas al frío destruirían las células somáticas de la pared de las anteras, lo que se ha demostrado tiene relativa influencia para cambiar el desarrollo normal del polen a un desarrollo órgano o embriogénico. Exposiciones prolongadas al frío también podrían destruir el polen al inactivar sus procesos metabólicos vitales o afectarían la reacción de los tejidos en presencia de hormonas.

Los resultados del tratamiento testigo mostraron también una alta tasa de sobrevivencia, aunque se puede notar una diferencia con el pretratamiento por ocho días. Sin embargo, no se encuentra una respuesta satisfactoria de esta conducta.

Las combinaciones de hormonas también parecen haber tenido un efecto diferencial sobre la sobrevivencia de las anteras vivas. Los mejores porcentajes se lograron cuando la

Cuadro 10. Efecto de diferentes concentraciones de ANA y KIN en el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de seis variedades pretratadas con la exposición a 7°C por 0, 4, 8 y 12 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Concentración	Tiempo de exposición (días)			
	0	4	8*	12
1. Testigo	61,6	50,0	0	16,7
2. 1mg/L ANA	92,3	33,3	50	28,6
3. 2mg/L ANA	80,0	33,3	100	0
4. 1mg/L KIN	57,1	50,0	50	16,7
5. 1mg/L ANA + 1mg/L KIN	42,9	50,0	100	16,7
6. 2mg/L ANA + 1mg/L KIN	56,2	66,7	100	16,7
7. 2mg/L KIN	80,0	66,7	100	0
8. 1mg/L ANA + 2mg/L KIN	71,4	16,7	100	0
9. 2mg/L ANA + 2mg/L KIN	75,0	33,3	0	16,7

* Sólo se analizó la variedad TBNT.

concentración fue de 1mg/L de ANA sin KIN, en los casos en que las anteras eran pretratadas por 12 días y cuando no se les dio pretratamiento con frío (Cuadros 11 y 14); la KIN por sí sola, no tuvo un efecto marcado en los porcentajes de sobrevivencia con excepción de cuando se dio el pretratamiento de frío por ocho días (Cuadro 13). Estos resultados parecen estar en acuerdo con los informes de la literatura, donde se establece que la KIN parece no tener, o al menos no hay evidencia de que tenga un efecto marcado en el metabolismo celular de las gramíneas (Sunderland y Dunwell, 1977).

La interacción de ambas hormonas hizo disminuir, en general, el porcentaje de sobrevivencia con respecto a las demás concentraciones, especialmente cuando se encontraban en cantidades de 2mg/L de ANA y 2mg/L de KIN (Cuadros 12 y 13),

y cuando había una concentración de KIN mayor que de ANA (Cuadros 11 y 14). A pesar de que la literatura no cita patrones precisos sobre la actividad de cada una ni de su interacción, sí parecen confirmarse las observaciones de algunos investigadores en el sentido de que altas concentraciones pueden ser deletéreas y de que la KIN puede afectar la acción de las auxinas. Sólo cuando se dieron pretratamientos de frío a las anteras por cuatro y ocho días, se encontró que las combinaciones de 1mg/L de ANA + 1mg/L de KIN y 2mg/L de ANA + 1mg/L de KIN, incrementaban notablemente el porcentaje de sobrevivencia (Cuadros 12 y 13).

En general, no se logró determinar una tendencia clara en el efecto de la interacción de las dos hormonas.

Cuadro 11. Efecto de las diferentes concentraciones de una auxina (ANA) y de una citoquinina (KIN) en el porcentaje de anteras vivas de seis variedades sin choque de frío a las 24 semanas. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

KIN (mg/L)	ANA (mg/L)		
	0	1	2
0	61,4	92,3	80,0
1	57,1	42,8	56,2
2	53,3	71,4	75,0

Cuadro 12. Efecto de las diferentes concentraciones de una auxina (ANA) y de una citoquinina (KIN) en el porcentaje de anteras vivas de seis variedades a las 24 semanas con choque de frío de 7°C por 4 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

KIN (mg/L)	ANA (mg/L)		
	0	1	2
0	33,3	22,2	22,2
1	33,3	33,3	44,4
2	44,4	11,1	22,2

Cuadro 13. Efecto del ANA y de la KIN en el medio de MS sobre el porcentaje de sobrevivencia de anteras de la variedad TBNT a las 24 semanas con choque de frío de 7°C por 8 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

KIN (mg/L)	ANA (mg/L)		
	0	1	2
0	0	50	100
1	50	100	100
2	100	50	0

Cuadro 14. Efecto del ANA y de la KIN en el medio de MS sobre la sobrevivencia de anteras de seis variedades a las 24 semanas con choque de frío de 7°C por 12 días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

KIN (mg/L)	ANA (mg/L)		
	0	1	2
0	16,7	28,6	0
1	16,7	16,7	16,7
2	0	0	16,7

Experimento 2

En este experimento se analizó el efecto de dos medios diferentes, el J19 y el E24 (B5 o de Gamborg modificados) en el porcentaje de sobrevivencia de anteras de tres variedades (RICO I, NWBT Y TBNT), así como también las diferencias entre preincubar las anteras a 5°C en completa oscuridad por ocho días y de incubarlas directamente en la cámara de crecimiento.

En el Cuadro 15 se puede apreciar el bajo porcentaje de anteras vivas al incubarlas directamente, en comparación con el porcentaje obtenido al incubarlas en frío (Cuadro 16). Con estos resultados corroboramos la importancia de los choques de frío en inducir la androgénesis y que son mencionados por Nitsch y Norreel (1973), Sunderland y Roberts (1977) (citados por Genovesi y Magill, 1982), Ochoa (1990), Roca et al., (1991) entre otros, y también de una preincubación en oscuridad (Niizeki y Ono, 1968).

Cuadro 15. Efecto del tratamiento sin frío en el porcentaje de sobrevivencia de anteras de arroz de tres variedades cultivadas en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Medio	Variiedad	Vivas	Negras
J19	RICO I	17	60
	NWBT	42	0
	TBNT	46	4
E24	RICO I	12	66
	NWBT	27	1
	TBNT	0	0

Cuadro 16. Efecto de preincubar con frío a 5°C por ocho días en el porcentaje de sobrevivencia de anteras de arroz de tres variedades en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Medio	Variiedad	Vivas	Negras
J19	RICO I	98	0
	NWBT	48	2
	TBNT	49	15
E24	RICO I	55	4
	NWBT	43	3
	TBNT	59	4

Por otra parte, el porcentaje de anteras negras también disminuyó considerablemente; a pesar de que las anteras se tornen negras, no significa que estén muertas, pues informes de Niizeki y Ono (1968) y Alán (1974) (trabajo no publicado), demuestran que es posible la androgénesis a partir de estas anteras, debido a que sólo el tejido somático de las tecas

está senescente, mientras que el polen sigue en un estado funcional. Sin embargo, si es de mayor importancia el hecho de que no muera el tejido somático, pues en concordancia con otros estudios, aparentemente la pared sintetiza algunos compuestos que se liberan en el medio de cultivo y promueven la formación de embriones (Ochoa, 1990).

En los Cuadros 17, 18 y 19, podemos apreciar el efecto de estos tratamientos para cada una de las variedades utilizadas, y que además demuestran, una vez más, que no se encontró una diferencia genotípica en cuanto a los porcentajes de anteras vivas.

Cuadro 17. Influencia de la incubación a 5°C por ocho días y en completa oscuridad sobre el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de la variedad RICO I en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Medio	Sin frío		Con frío	
	Vivas	Negras	Vivas	Negras
J19	21,2	75,0	98,0	0,0
E24	14,8	81,5	91,7	0,6

BIBLIOTECA WILSON FOFERDE
 ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
 APARTADO 93
 YEGUCHALPA HONDURAS

Cuadro 18. Influencia de la incubación a 5°C por ocho días y en completa oscuridad sobre el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de la variedad NWBT en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Medio	Sin frío		Con frío	
	Vivas	Negras	Vivas	Negras
J19	54.5	0,00	96,0	0.4
E24	40.3	0,01	93,5	0,7

Cuadro 19. Influencia de la incubación a 5°C por ocho días y en completa oscuridad sobre el porcentaje de sobrevivencia de las anteras de arroz de la variedad TBNT en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Medio	Sin frío		Con frío	
	Vivas	Negras	Vivas	Negras
J19	92,0	0,8	75,4	23,0
E24	0,0	0,0	93,6	0,6

Cuando analizamos las diferencias entre los dos medios (Cuadro 20), se determinó que en el medio E24 había un mayor porcentaje de anteras vivas, lo cual puede deberse a la presencia de 2,4-D, el cual acelera la producción de brotes en el arroz al aumentar la síntesis de citoquininas (Inoue *et al.*, 1979; Yao *et al.*, 1981; citados por Zapata *et al.*, 1991).

Esta condición puede producir una relación óptima auxina-citoquinina, la cual es necesaria para la inducción de los brotes. Podría suceder que, en granos de polen seleccionados

por su capacidad de producir callos embriogénicos, el 2,4-D desencadenara esta producción. Esto apoya la observación de que los callos inducidos a partir de anteras que se han cultivado en un medio con 2,4-D y que luego se cultivan en un medio sin reguladores del crecimiento, tienen la capacidad para regenerar plantas (Woo y Su, 1975; citados por Zapata et al., 1991).

El efecto positivo del frío, lo podemos observar una vez más en el Cuadro 21 donde no se aprecia una diferencia marcada entre los porcentajes de anteras vivas en los dos medios.

Cuadro 20. Diferencia entre genotipos de tres variedades en el porcentaje de sobrevivencia de sus anteras en dos medios diferentes. El Zamorano, Honduras, 1991-
1 9 9 2 .

Variedad	Medio		
	J19	E24	
RICO I	21,2	91,7	
NWBT	54,5	93,5	
TBNT		92,0	0,0

INSTITUTO NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
COMISIÓN NACIONAL DE INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS
CALLE LA AMÉRICA, 1000, SAN PEDRO DE MACORÍS, P.R.

Cuadro 21. Diferencia entre genotipos de tres variedades en el porcentaje de sobrevivencia de sus anteras en dos medios diferentes preincubadas a 5°C por ocho días. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Variedad	Medio	
	J19	E24
RICO I	98,0	91,7
NWBT	96,0	93,5
TBNT	75,4	93,6

Experimento 3

En este experimento se cultivaron anteras provenientes de tres partes de las ramificaciones del raquis central, para determinar cuál de estas contenía polen en el estado óptimo de desarrollo.

La literatura cita pocos casos de éxito al determinar este estado óptimo por medio de características morfológicas, como la distancia entre aurículas (Mercy y Zapata, 1986) o la longitud de la corolla (Dunwell, 1986). En este estudio no se pudo determinar una mayor diferencia entre los porcentajes de sobrevivencia de las anteras provenientes de las diferentes partes de la ramificación. Teóricamente, las anteras de la parte superior son las más aptas, sin embargo, no presentaron superioridad en comparación con las anteras provenientes de la parte media y basal (Cuadro 22). Una posible explicación de estos resultados, sería el hecho de que la variedad CICA 8, utilizada como fuente de explantes, es netamente tipo indica considerada como recalcitrante por su ineficiencia para ser

inducida a androgénesis (Zapata y Torrizo, 1986).

Cuadro 22. Comparación entre el tratamiento con frío (5°C por ocho días en completa oscuridad) y sin frío en el porcentaje de anteras vivas de la variedad de arroz CICA 8 provenientes de distintas partes de la ramificación del raquis central en el medio nutritivo J19. El Zamorano, Honduras, 1991-1992.

Posición de la flor	No. anteras cultivadas	Con frío		Sin frío	
		Vivas	Negras	Vivas	Negras
Inferior	48	75,0	12,5	75,0	0,0
Medio	48	87,5	12,5	87,5	12,5
Superior	48	87,5	0,0	62,5	0,0

V. CONCLUSIONES

1. El estado fisiológico de las plantas donantes no fue el óptimo para inducir a sus anteras a la androgénesis.
2. No se encontraron diferencias entre los genotipos en cuanto al porcentaje de anteras vivas que presentó cada uno.
3. Pretratamientos de las anteras con frío por ocho días de exposición mejoraron notablemente la sobrevivencia de las anteras.
4. La presencia de auxinas y 2,4-D en los medios de cultivo es importante para asegurar la viabilidad de las anteras.
5. No hubo evidencia de que la presencia de kinetina o su interacción con auxinas incrementara la viabilidad de las anteras.
6. La composición del medio de cultivo puede influir en el incremento de la viabilidad de las anteras.
7. Tratar a las anteras cultivadas con frío a 5°C y oscuridad incrementa el porcentaje de sobrevivencia de las anteras.
8. No se pudo determinar el óptimo estado de desarrollo del polen a partir de características morfológicas de la panícula.

VI. RECOMENDACIONES

A pesar de los esfuerzos y el tiempo invertidos en los cultivos, no fue posible obtener resultados concretos, sin embargo, estamos seguros que se va por buen camino y que este precedente servirá como una buena guía para enfocar trabajos posteriores en puntos y metas más específicas, los cuales llevarán a obtener resultados prometedores y útiles tanto para la EAP como para la región. Es recomendable que en trabajos posteriores en la EAP, se tomen en cuenta las siguientes indicaciones:

1. Trabajar con genotipos japonica.
2. Trabajar con menos variedades para poder analizar mayor número de factores.
3. Sembrar las plantas que servirán de fuente de explantes bajo condiciones controladas y de preferencia entre julio y septiembre.
4. Pretratar las paniculas con 7°C por ocho días y luego incubarlas por ocho días más a 5°C en oscuridad.
5. Estudiar el efecto de otras auxinas.
6. Utilizar medios líquidos en tubos de ensayo cultivando una antera por tubo.
7. Determinar el estado de desarrollo óptimo del polen por medio de tinción para más número de florecillas, para

contar con la seguridad de cultivar anteras que contengan polen en el estado de desarrollo óptimo.

VII. RESUMEN

El arroz es una de las gramíneas más importante del mundo. Es sabido que más de la mitad de la población mundial vive en zonas donde el arroz es el principal alimento. Esta circunstancia obliga a muchos países e instituciones a la búsqueda constante de variedades mejoradas que se adapten a las más variadas condiciones edáficas y climatológicas y que paralelamente satisfagan la gran demanda de alimentos.

Una de las técnicas usadas para la producción de estas líneas y variedades es la del cultivo de anteras in vitro para la producción de haploides, los cuales pueden ser duplicados cromosómicamente con la aplicación de agentes mutagénicos.

En objetivo de este trabajo fue determinar una metodología que permita la creación de estos haploides en la Escuela Agrícola Panamericana.

Para tal efecto se estudió la aplicación de pretratamientos a las panículas con frío a 7°C por 0, 4, 8 y 12 días, tratamientos con incubación a 5° C en completa oscuridad, diferentes medios de cultivo y diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento. Además se realizó un experimento alterno para determinar el estado de desarrollo óptimo del polen con base en la ubicación de las florecillas en la panícula.

Aunque no fue posible lograr callogénesis ni embriogénesis, se pudo determinar que pretratamientos de ocho días a 7°C a las panículas incrementaban el porcentaje de sobrevivencia de las anteras; de igual manera al incubar las anteras a 30C por ocho días en oscuridad, este porcentaje se elevaba.

De las diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento, sólo combinaciones de 2mg/L ANA + 1mg/L KIN presentaron algún incremento, mientras que concentraciones más altas, solas o en combinación, presentaron índices bajos de sobrevivencia. También se pudo comprobar que ANA en concentración de 2mg/L dio el mejor resultado y que la KIN por sí sola no tuvo ningún efecto superior.

Tampoco se pudo encontrar el estado de desarrollo óptimo de las anteras a partir de características morfológicas.

Sin embargo, se ha ganado experiencia y conocimientos para la realización de futuros trabajos en cultivo de anteras.

VIII. LITERATURA CITADA

- ALAN, J.J. 1974. An investigation in anther culture technique. Tesis M. Sc. Department of Botany, University of Birmingham, England. p.31.
- BHOJWANI, S.S.; RAZDAN, M.K. 1983. Plant tissue culture: theory and practice. Amsterdam (Hol), Elsevier. p.113-141.
- COLLINS, G.B.; GENOVESI, A.D. 1982. Anther culture and its application to crop improvement. In Application of plant cell and tissue culture to agriculture and industry. Ed. by D.T. Tomes, B.E. Ellis, P.M. Harney, K.J. Kasha y R.L. Peterson. Guelph, Ontario (Can). Plant Cell Culture Centre, University of Guelph. p.1-24.
- DUNWELL, J.M. 1986. Polen, ovule and embryo culture as tools in plant breeding. In Plant tissue culture and its agricultural applications. Ed. by L.A. Withers and P.G. Alderson. London (Engl), Butterworths. p.375-404.
- GAMBORG, O.L.; MILLER, R.A.; DJIMA, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- GENOVESI, A.D.; MAGILL, C.W. 1982. Embryogenesis in callus derived from rice microspores. *Plant Cell Reports* 1:257-260.
- GUIDERDONI, E.; LUISTRO, J.; VERGARA, G. 1990. Decline of morphogenic potential in microspore-derived calli from indica/japonica and japonica/japonica F₁ hybrids. *International Rice Research Newsletter* 15(2):6-7.
- HURTADO M., D.V.; MERINO M., M.E. 1988. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. 232 p.
- IRRI. 1985. IRRI Breeding and pathology programs apply biotechnology to rice improvement. *The IRRI Reporter* 3/85.
- KARIM, N.H.; NAHAR, M.A.; SHAHJAHAN, A-K.M.; KANTER, D.G.; ZADUE, M.Z.; MIAH, S.A. 1987. Regeneration of anther-derived callus. *International Rice Research Newsletter* 12(2):26.

- ; SHAHJAHAN, A.K.M.; MIAH, M.A.A.; MIAH, S.A. 1985. Response of rice anthers to callus induction and plant regeneration. International Rice Research Newsletter 10(3):21-22.
- MAN SI WANG; ZAPATA, F.J. 1987a. Somatic embryogenesis in rice Oryza sativa, cultivar IR 40. International Rice Research Newsletter 12(4):23-24.
- ; ----- . 1987b. Somatic embryogenesis in rice Oryza sativa Moench. International Rice Research Newsletter 12(4):24.
- MERCY, S.T., ZAPATA, F.J. 1986a. Effect of pollen development stage on callus induction and its relation to auricle distance in two rice varieties. International Rice Research Newsletter 11(4):23-24.
- ; ----- . 1986. b.Effect of sucrose on callus induction and plant regeneration in Taipei 309. International Rice Research Newsletter. 11(4):25.
- ; ----- . 1987. Influence of position of rice anthers at plating on callusing and plant regeneration. International Rice Research Newsletter 12(4):23.
- MURASHIGE, T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. Physiologia Plantarum (E.E.U.U.) 15:473-497.
- NAVARRO URRUTIA, S.; VERA ESTRELLA, R. 1988. In Cultivo de tejidos vegetales. Ed. por Daniel V. Hurtado M. y María Eugenia Merino M. México, Trillas. p.13-34.
- NIIZEKI, H.; OONO, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. Proceedings Japan Academy 44:554-557.
- NISHI, T.; MITSUOKA, S. 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant. The Japanese Journal of Genetics. 44(6):341-346.
- NITSCH, C.; NORREEL, B. 1973. Factors favoring the formation of androgenic embryos in anther culture. In Genes, enzymes and populations. Ed. by A. M. Srb. New York, Plenum Press. p.129-144.
- OCHOA A., N. 1990. Cultivo de anteras. In Fundamentos teórico prácticos del cultivo de tejidos vegetales. Ed. por C.H. Rossell y V.M. Villalobos. FAO, Roma. p.43-47.

- RAINA, S.K.; HADI, S. 1987. A simple device for mass extraction of rice anthers. *International Rice Research Newsletter*. 12(3):23.
- ROCA, W.M.; NUÑEZ, V.M.; MORNAN, K. 1991. Cultivo de anteras y mejoramiento de plantas. *In* Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. Cali (Colombia), CIAT. p.271-294.
- SHAHJAHAN, A.K.M.; KARIM, N.H.; MIAH, S.A. 1985. Culture conditions and callus-forming ability of rice anthers. *International Rice Research Newsletter* 10(3):22.
- SNAPE, J.W. 1989. Doubled haploid breeding: Theoretical basis and practical application. *In* Review of advances in plant biotechnology, 1985-88. Ed. by A. Mujeeb-Kazi and L.A. Sitch. 2nd. International Symposium on Genetic Manipulation in Crops. Mexico D.F. (Mexico) y Manila (The Philippines), CIMMYT y IRRI. p.19-30.
- SUNDERLAND, N.; DUNWELL, J.M. 1977. Anther and pollen culture. *In* Plant tissue and cell culture. Ed. by H.E. Street. Blackwell Scientific Publications, Oxford, (Engl.). p. 223-265.
- ZAPATA, F.J.; ABRIGO, E.M. 1986. Plant regeneration and screening from long-term NaCl-stressed rice callus. *International Rice Research Newsletter* 11(4):24-25.
- ; ALDEMITA, R.R.; TORRIZO, L.B.; NOVERO, A.U.; MAGALING, L.B.; ROLA, R.R. 1985. Seeds of anther culture-derived lines are available at IRRI. 10(5):14-15.
- ; ALDEMITA, R.R.; TORRIZO, L.B.; NOVERO, A.U.; RAINA, S.K.; ROLA, R.R. 1986. Anther culture of Basmati 370 at IRRI. A. Gamma ray-induced green plant regeneration. B. Effect of glucose in anther culture of irradiated Basmati 370. *International Rice Research Newsletter* 11(4):22-23.
- ; KHUSH, G.S.; CRILL, J.P.; NEU, M.H.; ROMERO, R.O.; TORRIZO, L.B.; ALEJAR, M. 1983. Rice anther culture at IRRI. *In* Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Proceedings of a workshop cosponsored by the Institute of Genetics, Academia Sinica and the International Rice Research Institute, Beijing, Science Press. p.27-46.

- ; TORRIZO, L.B.; 1985. Effect of some media components and organic additives on callus induction in rice anther culture. International Rice Research Newsletter 10(5):16.
- ; TORRIZO, L.B. 1986. Heat Treatment to increase callus induction efficiency in anther culture of IR42. 1986. International Rice Research Newsletter 11(4):25-26.
- ; TORRIZO, L.B. 1988. Breeding for rice varieties tolerant to adverse conditions through tissue culture at IRR1. In Strengthening collaboration in biotechnology: International agricultural research and the private sector. Bureau for science and technology office of agriculture. p.93-108.
- ; TORRIZO, L.B.; ALDEMITA, R.R. 1985. Effect of a conditioned medium on callus production and plant regeneration in rice anther culture. International Rice Research Newsletter 10(5):14.
- ; TORRIZO, L.B.; ROMERO, R.D.; MERCY, S.T. 1991. Cultivo de anteras de arroz. In Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Ed. por William M. Roca y Luis A. Mroginski. Cali (Colombia), CIAT. p.533-542.
- ZHANG CHENGMEI; ZHANG ZHENGHUA. 1990. Effect of Luffa cylindrica Roem exudate on plantlet induction from rice anthers. International Rice Research Newsletter 15(4):6

VIII. DATOS BIOGRAFICOS DEL AUTOR

Alberto M. Larco es oriundo de Manta, Ecuador. Nació el 14 de septiembre de 1968 y realizó sus estudios primarios en el Colegio Cardenal Spellman de Quito, la Escuela Juan Montalvo de Bahía de Caráquez y el Instituto Leonidas Vega de San Vicente, Manabí.

Sus estudios secundarios los terminó en 1986 en el Colegio Salesiano San José de Manta, recibiendo el título de Bachiller en Humanidades Modernas con especialización en Ciencias Químicas y Biológicas.

En 1990 se recibió de Agronomo en la Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, en la República de Honduras.

SECRETARIA DE ASESORIA TECNICA
ESCUELA AGRICOLA PANAMERICANA
APARTADO 53
TEGUCIGALPA, HONDURAS