



**UNIVERSIDAD TECNICA DE BABAHOYO**

**FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**ESCUELA DE INGENIERIA AGRONOMICA**

---

**“Cultivo *in vitro* de anteras en arroz (*Oryza sativa L*) para inducir plantas doble haploides homocigóticas”**

**TESIS DE GRADO**

Presentada ante el H. Consejo Directivo como requisito previo a la obtención del título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**AUTOR:**

Lenin Pedro Arana Vera

**DIRECTOR:**

Ph. D. Walter Oswaldo Reyes Borja

**Babahoyo – Los Ríos – Ecuador**

**2012**



# UNIVERSIDAD TECNICA DE BABAHOYO

## FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

### ESCUELA DE INGENIERIA AGRONOMICA

---

---

La presente tesis de grado titulada “Cultivo *in vitro* de anteras en arroz (*Oryza sativa* L) para inducir plantas doble haploides homocigóticas ”; realizada por el Egdo. Lenin Pedro Arana Vera, bajo la dirección del Ph. D. Walter Oswaldo Reyes Borja; ha sido aprobada y aceptada por el Tribunal de Sustentación como requisito parcial para obtener el título de **Ingeniero Agrónomo**.

### TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

---

Ing. Agr. Miguel Arévalo Noboa  
**Presidente**

---

Ing. Agr. Mario Quispe Sandoval  
**Vocal**

---

Ing. Agr. Tito Bohorquez Barros  
**Vocal**

## CERTIFICACIÓN

El suscrito certifica:

Que el trabajo titulado “Cultivo in vitro de anteras en arroz (*Oryza sativa* L) para inducir plantas doble haploides homocigóticas”, realizado por el egresado Lenin Pedro Arana Vera; ha sido guiado y revisado periódicamente y cumple normas estatutarias establecidas por la Universidad Técnica de Babahoyo.

Debido a que este estudio es parte de las investigaciones realizadas por el Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP y financiado por el proyecto “Obtención de cultivares superiores para la cadena arrocera ecuatoriana (FLAR)”, se deja en libertad del autor y del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias – INIAP, para su publicación.

Babahoyo, 21 de junio del 2012

---

Ph. D. Walter Oswaldo Reyes Borja  
**Director de Tesis**

## DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Lenin Pedro Arana Vera

### **Declaro que:**

La Tesis de Grado denominada “Cultivo *in vitro* de anteras en arroz (*Oryza sativa* L) para inducir plantas doble haploides homocigóticas”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Babahoyo, 21 de junio del 2012

---

Lenin Pedro Arana Vera  
120550607-2

## AUTORIZACIÓN

Yo, Lenin Pedro Arana Vera autorizo a la Universidad Técnica de Babahoyo, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución; la tesis de grado titulada “Cultivo *in vitro* de anteras en arroz (*Oryza sativa* L) para inducir plantas doble haploides homocigóticas”, cuyo contenido, ideas y criterios son de exclusiva responsabilidad y autoría.

Babahoyo, 21 de junio del 2012

---

Lenin Pedro Arana Vera  
120550607-2

## **DEDICATORIA**

Con inmenso Amor a mi querido PADRE “Pedro Arana” como homenaje a su abnegación y sacrificio, a mis HERMANAS “Viviana y Priscila” como ejemplo de trabajo y afán de superación, a mi NOVIA “Johanna Zapata” como tributo de amor y esperanza por un futuro mejor.

## **AGRADECIMIENTO**

Agradezco a Mi Padre Jehová, por permitirme cumplir una de mis metas en compañía de mis seres queridos.

A la Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias; por acogerme en sus aulas; a mis Profesores quienes compartieron sus conocimientos, contribuyendo en mi formación académica, y de manera especial a la Ing. Delia Avilés, a quien considero una gran profesional y amiga.

Al Laboratorio de Biotecnología y al Programa Nacional del Arroz del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP), Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja”; y al Laboratorio de Doble Haploides del Programa de Arroz del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Al Director General del INIAP, Dr. Julio César Delgado Arce; al Sub Director General, Ing. Saúl Mestanza Solano y al Director de la Estación, Ing. Carlos Cortez Bedón; por acogerme en la Institución en calidad de Becario y brindarme la oportunidad de involucrarme en el campo de la investigación.

Al Ph. D. Walter Oswaldo Reyes Borja, Responsable del Laboratorio de Biotecnología; por la dirección de la presente Tesis, por su participación, consejos y motivación.

A mis compañeros de Laboratorio, Ing. María Eugenia Romero R., Biol. Carmen Valladares, Biol. Johnson Cabrera, Ing. Marcos Ullauri, egresados Mónica Armas, Alex Valarezo y José Acosta, por su valiosa amistad y cooperación.

Las investigaciones, resultados, conclusiones  
y recomendaciones del presente trabajo, son  
de exclusiva responsabilidad del autor

Lenin Pedro Arana Vera  
lenin.arana@hotmail.com



## CONTENIDO

I.	INTRODUCCIÓN	1
	Objetivos	3
		4
II.	REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1.	Mejoramiento genético en arroz	4
2.1.1.	Filosofía del mejoramiento genético	4
2.1.2.	Métodos de mejoramiento genético	4
2.1.3.	Hibridación en arroz	4
2.1.4.	Producción de plantas doble haploides	5
2.2.	Cultivo <i>in vitro</i> de anteras en arroz	5
2.2.1.	Desarrollo del cultivo de anteras	6
2.2.2.	El cultivo de anteras aplicado al fitomejoramiento	6
2.2.3.	Ventajas	7
2.2.4.	Desventajas	8
2.2.5.	Eficiencia de la técnica	8
2.2.6.	Determinación de niveles de ploidía de plantas regeneradas	11
2.2.7.	Implicaciones económicas del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades	12
III.	MATERIALES Y MÉTODOS	13
3.1.	Ubicación del ensayo	13
3.2.	Material vegetal	13
3.3.	Materiales, equipos de laboratorio y reactivos	14
3.4.	Análisis estadístico	15
3.5.	Manejo del ensayo	16
3.5.1.	Plan de cruzamientos	16
3.5.2.	Selección y colección de macollas para el cruzamiento	19
3.5.3.	Emasculación	20
3.5.4.	Polinización	20
3.5.5.	Manejo de plantas polinizadas	21
3.5.6.	Cosecha de semillas F1	22
3.5.7.	Siembra y manejo del germoplasma donante de anteras	22
3.5.8.	Colección de las panículas para cultivo de anteras	24
3.5.9.	Selección y desinfección de flores para el cultivo de anteras	25
3.5.10.	Inducción de callos: Aislamiento y siembra de las anteras en medios de cultivo para la inducción de microcallos e incubación en cuarto oscuro	25
3.5.11.	Regeneración de plantas: Transferencia de microcallos al medio de regeneración de plantas	27
3.5.12.	Aclimatación de plantas R1	27

3.6.	Variables registradas	27
3.6.1.	Semillas por cruce	28
3.6.2.	Relación panícula/microspora	28
3.6.3.	Viabilidad del polen	28
3.6.4.	Ciclo de callogénesis	29
3.6.5.	Callos por germoplasma	29
3.6.6.	Callos por condiciones ambientales	29
3.6.7.	Callos por tratamiento en frío	30
3.6.8.	Callos por medio de cultivo	30
3.6.9.	Plantas regeneradas	30
3.6.10.	Plantas aclimatadas	30
3.6.11.	Ploidía	30
IV.	RESULTADOS	31
4.1.	Semillas por cruce	31
4.2.	Relación panícula/microspora	32
4.3.	Viabilidad del polen	33
4.4.	Ciclo de callogénesis	33
4.5.	Callos por germoplasma	34
4.6.	Callos por condiciones ambientales	35
4.7.	Callos por tratamiento en frío	36
4.8.	Callos por medio de cultivo	37
4.9.	Plantas regeneradas	38
4.10.	Plantas aclimatadas	40
4.11.	Ploidía	41
V.	DISCUSIÓN	42
VI.	CONCLUSIONES	44
VII.	RECOMENDACIONES	45
	RESUMEN	46
	SUMMARY	48
	LITERATURA CITADA	50
	ANEXOS	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.	Bloques de cruzamiento en el campo experimental de la EELS: primera fecha de siembra-15-04-10 (A); segunda fecha de siembra-30-04-10 (B); tercera fecha de siembra-15-05-10 (C)	18
Figura 2.	Selección y colección de macollas a ser polinizadas: condición óptima de las panículas para emasculación (A); extracción de las macollas, de raíz (B); eliminación de hojas para evitar deshidratación (C); etiquetado y mantenimiento de las macollas colectadas en agua (D)	19
Figura 3.	Emasculación: eliminación de flores del tercio superior e inferior de la panícula y corte transversal a la mitad de cada flor seleccionada para emasculación (A); succión de las anteras, utilizando una bomba de vacío (B); colocación de sobre de papel cristal (C)	20
Figura 4.	Polinización: presencia de muchos insectos que colectan polen como un indicador de la antesis (A); polinización cruzada, inducida mediante agitación de la panícula al momento de la antesis (B)	21
Figura 5.	Manejo de plantas polinizadas: plantas polinizadas al momento de retirar el sobre protector, 6 días después de la polinización (A); plantas con semillas F1, 12 días después de la polinización(B)	21
Figura 6.	Cosecha de semilla F1: semillas F1 descascaradas (A); tratamiento químico de semillas en los sobres, con vitavax (B)	22
Figura 7.	Siembra y manejo del germoplasma donante de anteras: germinación de semillas F1 en caja de Petri (A); plántulas F1 a los 7 días después de la siembra en cajas de Petri, óptimas para el trasplante a macetas (B); fase vegetativa del material donante de anteras, en etapas de plántula (derecha) y macollamiento (izquierda) (C); fase de reproducción (derecha) y maduración (izquierda) del material donante de anteras (D); plantas F1 en etapa de “embuchamiento”, 75 días después del trasplante, óptimas para el cultivo de anteras (E); soca de las plantas F1 que también fueron utilizados como material donante de anteras (F)	23
Figura 8.	Panículas con 2 a 5 cm de distancia entre aurículas de las dos últimas hojas; óptimas para cultivo de anteras	24
Figura 9.	Selección y desinfección de flores para cultivo de anteras. Extracción de panícula de la vaina, tomándose de la base de forma invertida (A); selección de las flores óptimas y eliminación con tijeras de las no deseadas (B); desinfección de las flores con etanol 70% y agua destilada estéril (C)	25
Figura 10.	Inducción de callos: corte de las flores por su base (A); colección de las flores por el extremo no cortado (B); siembra de las anteras mediante golpes continuos en el borde interior del vaso (C); incubación de anteras en oscuridad (D)	26

Figura 11.	Análisis de cinco panículas en diferentes estados de desarrollo: diferencia de distancias entre aurículas de las 5 panículas, observándose en el literal (b) la panícula óptima (A); diferencias en el color y consistencia entre flores de las 5 panículas, observándose en el literal (b) la inflorescencia óptima (B); estados de desarrollo del polen de las 5 panículas, observándose en el literal (b) el estado uninucleado (C)	32
Figura 12.	Viabilidad del polen: polen fértil de color café oscuro, luego de la tinción con lugol (A); polen infértiles de color amarillo, luego de la tinción con lugol (B)	33
Figura 13.	Inducción de callos: microcallos en diferentes estado de crecimiento (A); liberación del microcallo de la antera al medio de cultivo (B); callo de 45 días en medio de inducción (C)	33
Figura 14.	Promedio de callos/100 anteras sembradas <i>in vitro</i> , en función del germoplasma	35
Figura 15.	Promedio de callos/100 anteras sembradas <i>in vitro</i> , en función del ambiente de cultivo del material donante de anteras	36
Figura 16.	Promedio de callos/100 anteras sembradas <i>in vitro</i> , en función del tratamiento en frío de las panículas	37
Figura 17.	Promedio de callos/100 anteras sembradas <i>in vitro</i> , en función del medio de cultivo	38
Figura 18.	Muerte de callos: Callo con necrosis parcial a los 30 días en medio de regeneración (A); callo con necrosis total a los 60 días en medio de regeneración (B)	39
Figura 19.	Regeneración de plantas (R1): Transferencia de los microcallos a medio de regeneración (A); callo de 8 días en medio de regeneración (B); diferenciación de órganos en un callo de 20 días, en medio de regeneración (C); Plántula R1 albina de 30 días en medio de regeneración (D); plántula R1 albina de 40 días en medio de regeneración (E); planta R1 verde de 60 días en medio de regeneración con carbón activado (F)	39
Figura 20.	Aclimatación de plantas R1: plantas R1 albina y verde en el primer día de aclimatación, en medio de cultivo (A); plantas R1 albina y verde en el segundo día de aclimatación, en agua de grifo (B); trasplante de R1 a suelo fangueado (C); R1 aclimatada a los 5 días después del trasplante (D)	40
Figura 21.	Floración de R1 a los 50 días después del trasplante(A); polen de planta R1 100% fértil teñido con I-KI (B); planta R1 doble haploide en fase de maduración a los 70 días después del trasplante(C); semilla de planta R1 con 100% de granos llenos	41

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.	Lista de los 40 cruces F1 utilizados para el cultivo de anteras	13
Cuadro 2.	Plan de cruzamientos simples para obtención de semillas F1	16
Cuadro 3.	Principales características agronómicas de los progenitores utilizados en los cruzamientos	17
Cuadro 4.	Semillas F1 obtenidas a partir de 40 cruces simples	31
Cuadro 5.	Promedio de callos/100 anteras sembradas in vitro, en función del germoplasma	34
Cuadro 6.	Promedio de callos/100 anteras sembradas in vitro, en función del ambiente de cultivo del material donante de anteras	35
Cuadro 7.	Promedio de callos/100 anteras sembradas in vitro, en función del tratamiento en frío de las panículas	37
Cuadro 8.	Promedio de callos/100 anteras sembradas in vitro, en función del medio de cultivo	38

## ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1.	Medios de cultivo utilizados en la inducción de callos y regeneración de plantas	53
Anexo 2.	Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo M1, para la inducción de callos. (Fuente: CIAT)	54
Anexo 3.	Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo L1, para la inducción de callos	56
Anexo 4.	Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo MS, para regeneración de plantas. (Fuente: CIAT)	58

# I. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los componentes fundamentales en la dieta alimenticia de la humanidad, por ello, desde tiempos inmemoriales se han dedicado muchos esfuerzos a su mejoramiento. Con el desarrollo de la genética y su aplicación al fitomejoramiento se han obtenido variedades de mayor rendimiento y mejor calidad, más tolerantes a distintas plagas y enfermedades y adaptadas a diversas condiciones climáticas o de suelos, así como también más adecuadas a ciertos procesos industriales o exigencias del mercado.

En este contexto, el hombre siempre ha estado buscando o desarrollando métodos nuevos o técnicas que permitan aumentar la variabilidad genética, incrementar la eficiencia del proceso de selección de genotipos superiores o reducir el tiempo requerido en la obtención de los mismos. En las últimas dos décadas especialistas en las áreas de genética, bioquímica, fisiología, etc., han desarrollado técnicas *in vitro* que tienen aplicabilidad en el fitomejoramiento y que pueden servir de apoyo a los métodos convencionales.

La utilización de las técnicas biotecnológicas constituye un paso importante dentro de los programas de mejoramiento, debido a que los métodos convencionales para la introducción de nuevos caracteres agronómicos, en este cultivo, es un proceso que requiere de muchos años.

Una de las técnicas es el cultivo *in vitro* de anteras de arroz. Esto consiste en la generación de una nueva planta a partir de las microsporas uninucleadas por la vía organogénesis, es decir la formación de órganos a partir de un callo o masa de células indiferenciadas. Con este método, es posible obtener plantas doble haploides homocigóticas en un ciclo de cultivo *in vitro* mediante la duplicación de los cromosomas de las microsporas uninucleadas de arroz.

Alcanzar rápidamente homocigidad constituye una de las aplicaciones más importantes del cultivo de anteras para el desarrollo de variedades nuevas, lo cual disminuye considerablemente los costos, espacio y tiempo, teniendo como resultado líneas “verdaderamente mejoradas”. Las líneas homocigóticas (R2) manifestarán la variabilidad inherente a la generación (F2), añadiendo una ventaja: cada individuo habrá fijado su genotipo y no sufrirá segregación adicional. Dado que en los haploides duplicados no hay dominancia, es decir, el fenotipo equivale al genotipo; la eficiencia de la selección aumenta cuando el mejoramiento se vale del cultivo de anteras.

Los primeros en regenerar plantas por medio de esta técnica en arroz fueron Niizeki y Oono en 1968. La primera variedad desarrollada con cultivo de anteras se liberó en 1975 y desde entonces, se han producido más de 100 cultivares a nivel mundial, entre ellas se encuentra la variedad INCA, liberada en 1995 por el CIRAD-CA. Esta variedad provino de una línea de cultivo de anteras producida por el CIAT-Colombia.

En Ecuador, los programas de mejoramiento genético en arroz se basan en el método de pedigrí para la obtención de nuevas variedades; este método tiene la desventaja de ser muy tardío y presentar una expresión recesiva de las características agronómicas de las cruces. La técnica del cultivo de anteras permite aislar homocigotos recesivos de interés agronómico y fijar características deseables en tiempos más cortos, ahorrando tiempo y dinero al fitomejorador.

Esta investigación apunta a la generación de líneas homocigotas doble haploides mediante la inducción de androgénesis en cultivo de anteras, que es una alternativa muy prometedora utilizada como aporte a los programas convencionales de mejoramiento genético. Al incorporar el cultivo de anteras al Programa, se podrá incrementar la base genética del germoplasma y adaptarlos a los diferentes agroecosistemas del país, tomando e integrando genes de mayor importancia para que el productor arrocero tenga nuevas opciones del cultivo con las nuevas variedades.

## Objetivos

### General:

- Desarrollar doble haploides de arroz a partir del cultivo de anteras en condiciones *in vitro*.

### Específicos:

- Obtener F1 a través de cruzamiento simple, para disponer de material donante de anteras.
- Obtener líneas homocigóticas de arroz a través del cultivo de anteras a partir de una generación F1.
- Determinar morfológicamente en invernadero los niveles de ploidía de las plantas regeneradas (R1).



## **II. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **2.1. Mejoramiento genético en arroz**

#### **2.1.1. Filosofía del mejoramiento genético**

El desarrollo de variedades más productivas para utilizarlas a nivel de finca es el objetivo primordial de los fitomejoradores y lo que justifica su labor ante la sociedad, todo lo demás es secundario o respalda este objetivo. El éxito de un científico en desarrollar variedades mejoradas de arroz es directamente proporcional a su habilidad para identificar acertadamente las prioridades de investigación y para orientar correctamente sus metas y actividades (Jennings, Coffman y Kauffman, 1981).

#### **2.1.2. Métodos de mejoramiento genético**

Suárez (2006) menciona que existen muchos métodos de mejoramiento genético y cada uno de ellos tiene sus puntos fuertes y débiles; el método a elegir dependerá de la naturaleza del carácter o caracteres de interés, el modo de herencia y la variabilidad presente o disponible. En algunos casos los factores económicos influyen en el método seleccionado y según Jennings, Coffman y Kauffman (1981), los métodos de mejoramiento genético en arroz comprenden: el mejoramiento masal, por retrocruzamiento y genealógico o por pedigrí.

#### **2.1.3. Hibridación en arroz**

Según Jennings, Coffman y Kauffman (1981), las hibridaciones en arroz pueden ser mediante cruzamiento simple, cruzamiento triple (topcross) y cruzamiento doble.

El objetivo de la hibridación en especies de autopolinización como el arroz, es combinar en un genotipo los caracteres deseados que se encuentra en dos o más genotipos. Los mejoradores siempre esperan obtener genotipos que sean superiores a

los padres. La selección de los progenitores es un punto crítico ya que determina el potencial del programa de mejoramiento. Usualmente uno de los padres es seleccionado por su comportamiento ya probado en el área o para las condiciones en que se cultivó. El otro padre (s) generalmente tiene algunos atributos que no posee o no expresa el primer progenitor (Suárez, 2006).

#### **2.1.4. Producción de plantas doble haploides**

Según, Lentini, Martínez y Roca (1997), en las plantas superiores, las haploides son esporófitos que poseen un número de cromosomas igual a del gametofito. Mediante el doblaje espontáneo o artificial de los cromosomas es posible obtener homocigotas completas a partir de esas plantas haploides; estas plantas se denominan doble haploides (DH). Los materiales DH permiten al fitomejorador fijar el sistema genético de gametos individuales, sin pasar por el proceso de endogamia normal, lo cual facilita y acelera el proceso de selección. Los métodos más utilizados para la obtención de haploides y DH pueden basarse en el cultivo de esporas masculinas, es decir, anteras o polen (androgénesis), o en el cultivo de esporas femeninas, o sea, de ovarios u óvulos (ginegénesis). De los métodos señalados, el más rápido y aplicable a un mayor número de especies para la producción de DH es el cultivo de anteras.

## **2.2. Cultivo *in vitro* de anteras en arroz**

El cultivo de anteras es una técnica para la producción de plantas haploides y/o diploides las cuales son un gran potencial para los mejoradores de plantas (Pérez, 2006).

De acuerdo al CIAT (1991) mediante esta técnica, las anteras inmaduras que contienen polen en una etapa específica de desarrollo se colocan en medios de cultivo donde el polen inmaduro se divide para formar “embriones” o “callo”. Transferidos éstos a medios de regeneración, se da la conversión en plantas completas. En la mayoría de los casos se producen plantas haploides estériles, pero

en algunas especies ocurre una duplicación espontánea de los cromosomas en las etapas de desarrollo del callo y de regeneración de la planta.

Desde el punto de vista técnico, esto consiste en colocar las anteras en un medio nutricional con regímenes de temperatura, luz, etc. apropiados para el crecimiento y desarrollo del tejido, mantenidas en un ambiente estéril (Lentini, Martínez y Roca, 1997).

Se inicia con la manipulación de anteras jóvenes con la mayor parte de sus granos de polen inmaduros (microsporas) para inhibir el desarrollo gametofítico (o sea la formación del grano de polen maduro), e inducir el desarrollo esporofítico (formación de plantas); proceso conocido como androgénesis. En el caso del arroz, este proceso se inicia mediante la formación de un tejido no diferenciado que se denomina callo y culmina en la formación de embriones (embriogénesis) y/o plantas (organogénesis), siendo la ruta más frecuente de obtención de plantas a partir de anteras (Universidad Nacional del Nordeste, 2008).

### **2.2.1. Desarrollo del cultivo de anteras**

El cultivo de anteras se desarrolla en dos etapas principales: inducción de microcallos y regeneración de plantas verdes. En una primera fase del cultivo de anteras, se induce la formación de microcallos colocando las anteras en un medio cuya composición estimule selectivamente la división mitótica de las microsporas, a expensas de las células somáticas presentes en el filamento, el tejido conectivo y la pared de la antera. El medio para inducir esa formación debe tener altas concentraciones de auxinas. Una vez que los microcallos han alcanzado un tamaño de 2 mm, se transfieren a otro medio de cultivo que contenga bajas concentraciones de auxinas, pero altas de citocininas; éstas estimulan la diferenciación de las células del microcallo hasta regenerar plantas (Lentini, Martínez y Roca, 1997).

### **2.2.2. El cultivo de anteras aplicado al fitomejoramiento**

El potencial que posee el cultivo de anteras surge de la constitución genética de las células del polen. Las células del polen de los híbridos F1 contienen la dotación

genética de las plantas paternas y las recombinaciones esperadas según las proporciones mendelianas. Estas células son haploides y permiten por ello al mejorador seleccionar eficazmente los recombinantes deseables; además, una vez duplicadas esas células, se establecen rápidamente líneas homocigóticas. Alcanzar rápidamente homocigocidad constituye una de las aplicaciones más importantes del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades nuevas porque, gracias a esta técnica, el tiempo, el espacio y los costos, necesarios para desarrollar las líneas “verdaderamente mejoradas” disminuirían considerablemente (CIAT, 1991).

### **2.2.3. Ventajas**

Según Withers y Alderson, citados por Pérez (2004), el uso de la técnica de cultivo de anteras *in vitro* presenta algunas ventajas comparada con los métodos tradicionales de mejoramiento; sin duda, una de las mayores es la simplicidad del método. La técnica ha sido utilizada en especies cultivadas como trigo, arroz, cebada, maíz y papa.

Según Pérez (2004), como cada cruzamiento genera una planta híbrida F1, cada grano de polen constituye una gameta diferente; así, una población de plantas doble-haploides provenientes del cultivo de anteras, representará la variabilidad genética de la población F2, siendo las plantas doble-haploides homocigotas genéticamente. Otras ventajas son: la economía en el tiempo necesario para la obtención de líneas puras, lo cual reduce el tiempo en obtener las generaciones cuando se está procurando ampliar la diversidad en los reservorios genéticos; hay economía de recursos financieros y materiales, al no requerir grandes áreas de siembra, ni otros costos de producción; y, aumento de la eficiencia de selección tanto en caracteres cualitativos como cuantitativos, facilitando la selección de los genotipos superiores.

Según Ramírez *et al.* (2007), esta técnica se ahorra tiempo y dinero en la generación de líneas isogénicas, porque permite aislar homocigotos recesivos de interés agronómico y fijar más rápido las características de cruza de interés comparado con las técnicas tradicionales de mejoramiento genético; y de acuerdo a

Haliloglu y Baenziger citados por el mismo autor, esta técnica constituye actualmente el método más efectivo para generar plantas dihaploides.

El cultivo de anteras mejora la eficiencia tanto para caracteres cualitativos como para cuantitativos porque hay ausencia de los efectos de dominancia (Lentini *et al.*, 1997).

#### **2.2.4. Desventajas**

De acuerdo a Sanint y Col, citados por Pérez (2004), entre las desventajas se puede mencionar una alta dependencia del genotipo. Los genotipos “indica” han mostrado hasta ahora poca respuesta a la inducción de callos, observándose la necrosis temprana de las anteras y un desarrollo pobre de los callos, mientras que los “japónica” de secano presentan generalmente bajo porcentaje de regeneración de plantas verdes (factible de superar si se utiliza el medio adecuado). Además, el costo inicial de equipamiento de un laboratorio de cultivo de anteras puede ser relativamente alto; sin embargo, a mediano plazo, esta inversión puede ser recuperada si se considera la reducción de alrededor de 30% en costos de desarrollo de un material empleando cultivo de anteras versus usando el método de pedigrí solamente. Según el mismo autor, esta dependencia genotípica de la respuesta *in vitro* ha obstaculizado la adopción amplia del cultivo de anteras de arroz como herramienta rutinaria en el mejoramiento. En otros cereales también se han encontrado diferencias genotípicas en la producción de plantas verdes en la aplicación práctica de la técnica.

#### **2.2.5. Eficiencia de la técnica**

De acuerdo a Niizeki y Oono. (1968); Guha-Mukherjee (1973) y Chaleff, Hill y Dunwell (1981), en general, los cereales se caracterizan por una baja eficiencia en cuanto a la producción de callos y a la regeneración de plantas verdes; el arroz constituye un buen ejemplo de este hecho. Hay varios factores que afectan el cultivo de anteras y entre ellos se pueden mencionar: a) el estado de desarrollo de los granos de polen, b) los tratamientos físicos y c) el medio de cultivo.

La recalcitrancia de las variedades tipo índica según Lentini, Martínez y Roca (1997), puede estar asociada a: (1) una alta producción de sustancias tóxicas como el etileno que es secretado por los tejidos y acumulado en el medio, lo cual provoca el envejecimiento y muerte rápida de las anteras minimizando la producción de callos; (2) una necrosis o envejecimiento prematuro de los callos debida posiblemente a la acumulación de sustancias tóxicas en el medio, lo que disminuye la capacidad regenerativa de éste; o (3) una alta producción de callo friable no embriogénico sin capacidad regenerativa, la cual puede estar relacionada a cambios en el pH del medio.

Según Reddy y Guha-Mukherjee, citados por Chirinos (2006), señalan que la formación *in vitro* de plantas haploides ocurre a partir de polen inmaduro, cuando el polen está maduro no se inicia el desarrollo embriogénico o se desarrollan plantas diploides. Villalobos citado por el mismo autor resalta que, los estudios en microesporogénesis son necesarios porque permiten observar las diferentes secuencias de desarrollo del polen, tipificando el grado de maduración del grano de polen. La fase uninucleada es la que mejor responde a las condiciones *in vitro*.

Nitsch (1974); Sunderland y Roberts (1979) mencionan que para mejorar la producción de callos y la regeneración de plantas, se han utilizado tratamientos físicos tales como el estrés con frío.

Ascanio, citado por Chirinos (2006); trabajando con anteras de café señala que si éstas son sometidas a bajas temperaturas, se incrementa la respuesta callogénica o embriogénica, debido a la formación de dos núcleos iguales durante la primera mitosis.

Según investigaciones sobre la fisiología de las anteras, los efectos benéficos del tratamiento con frío y en la oscuridad se deben a que dicho tratamiento reduce la actividad respiratoria de las anteras. Esto disminuye el consumo de reservas de la pared de la antera y prolonga la actividad biológica del arqueosporio que alberga los granos de polen, manteniendo la viabilidad de los mismos, evitando la dehiscencia prematura de las anteras en el cultivo y retrasando la senescencia del polen (Sunderland, 1978). Actualmente se piensa que el pretratamiento con frío podría,

además, inhibir la expresión de los genes que controlan el desarrollo gametofítico, o la actividad de las enzimas producto de su expresión, permitiendo la inducción del desarrollo esporofítico (Chen, Tsay y Huang, 1991).

Según Chu (1978) y Zapata *et al.* (1982) la composición del medio de cultivo es otro factor importante en la producción de callos y plantas de arroz a partir de granos de polen; al omitir el agar en el medio de cultivo se obtiene un aumento en la producción de plantas.

Mediante el uso de un medio líquido es posible reducir al mínimo la competencia entre los granos de polen en desarrollo, y se permite que el callo formado dentro de la antera se sumerja en el medio de cultivo. El medio líquido tiene además 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 nutrientes (Wernichke y Kohlenback, 1976). Por otra parte, el agar comercial contiene contaminantes que pueden impedir el desarrollo del polen (Chaleff, Hill y Dunwell, 1981).

Wernichke y Kohlenback (1976) mencionan que con las anteras de *Nicotiana* también se han encontrado diferencias en la respuesta al medio líquido o semisólido.

El arroz japónica de riego tiene una respuesta al cultivo de anteras mayor que la japónica de secano y los materiales tipo índica (Lentini *et al.*, 1997).

Según Marassi (2004), en un trabajo realizado con el fin de incrementar la obtención de plantas mediante el cultivo de anteras de la subespecie indica, al utilizar un pretratamiento con 2,4-D se logró un aumento en el número de anteras que producen callos, el porcentaje de callos que producen vástagos y el porcentaje de éstos que son verdes, en seis variedades índicas de arroz.

Chen, citado por el CIAT (1991), señala que en estudios de progenie sobre híbridos F1 regenerados de polen, la mayoría de las plantas son uniformes y estables; esto significa que la mayor parte de las plantas de arroz diploides, obtenidas por

cultivo de anteras, son homocigotos que provienen de microsporas haploides mediante la duplicación espontánea de los cromosomas.

Alrededor de un 50% de las plantas de arroz regeneradas son haploides duplicados (autodiploides) lo que excluye el uso de la duplicación artificial de cromosomas (CIAT, 1991).

No hay informe sobre la ocurrencia de gametos sin reducir en arroz, ni sobre la endoreduplicación mitótica de cromosomas de microespora; por ello se puede suponer que la autodiploidización del arroz ocurre durante la fase de regeneración de callos *in vitro*. La presencia de otros niveles de ploidía entre las plantas regeneradas, es decir, plantas haploides, triploides, tetraploides y aneuploides, apoyan esa presunción (CIAT, 1991).

#### **2.2.6. Determinación de niveles de ploidía de plantas regeneradas**

Según Gailbraith *et al.*, Dolezel *et al.*, y Farnham *et al.*, citados por Velásquez *et al.* (2010), entre las técnicas actualmente utilizadas para determinar el grado de ploidía destacan la citometría de flujo (CMF) y la citogenética. La CMF permite cuantificar los componentes celulares tales como ácidos nucleicos, lípidos, proteínas, polisacáridos, etc.; mientras la citogenética se define como una rama de la genética a nivel celular, dedicada al estudio del número y la morfología de los cromosomas.

Lentini, Martínez y Roca (1997), menciona que en las plantas regeneradas (R1), se puede determinar el nivel de ploidía evaluando ciertas características morfológicamente una vez que llegan a la madurez. Las plantas haploides ( $n = x$ ) son, por lo general, pequeñas, débiles, con problemas de crecimiento y estériles. Las doble haploides ( $n = 2x$ ) son plantas fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla. Las plantas poliploides generalmente muestran un mayor crecimiento, con estructuras florales más desarrolladas, granos con aristas largas y parcialmente estériles.



### **2.2.7. Implicaciones económicas del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades.**

Sanint *et al.*, citado por Lentini, Martínez y Roca (1997) expresa que el Programa de Arroz del CIAT realizó un análisis económico de los costos y beneficios del cultivo de anteras en el desarrollo de variedades, comparándolo con el método de pedigrí que se usa comúnmente en el mejoramiento de arroz. El estudio indicó que, se puede reducir los costos con un ahorro hasta del 44% por parte del cultivo de anteras. El análisis que se hizo sugiere que la puesta en ejecución del cultivo de anteras ofrece una tasa marginal interna de retorno del 28 al 60% en el desarrollo de variedades.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1. Ubicación del ensayo

Esta investigación se realizó en la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” del INIAP, ubicada entre las coordenadas geográficas 2° 15’ 15’’ latitud Sur y 79° 30’ 40’’ de longitud Occidental, en el km. 26 al este de Guayaquil en la vía Durán – Tambo, Parroquia Virgen de Fátima, Cantón Yaguachi, Provincia del Guayas, a 17 msnm, precipitación promedio anual de 1342,0 mm , 81% de humedad relativa media, y temperaturas promedio de 25,1 °C. 1/.

#### 3.2. Material vegetal

Para este estudio se utilizó anteras de 40 cruces F1 obtenidos mediante hibridaciones simples (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Lista de los 40 cruces F1 utilizados para el cultivo de anteras

No.	CRUCE	No	CRUCE
1	FED-60/GO-38790	21	GO-38173/FED-275
2	FED-60/ GO-38426	22	GO-38173/FED-50
3	FED-60/GO-38242	23	GO-38173/INIAP-14
4	FED-275/INIAP-17	24	GO-38173/INIAP-15
5	FED-275/INIAP-12	25	GO-38242/FED-50
6	GO-38007/INIAP-15	26	GO-38242/INIAP-12
7	GO-38007/INIAP-14	27	GO-38242/INIAP-14
8	GO-38007/SPA-2707	28	GO-38790/GO-38242
9	GO-38016/FED-50	29	GO-38793/GO-38063
10	GO-38016/SPA-2707	30	INIAP-12/FED-50
11	GO-38063/INIAP-12	31	INIAP-12/FED-275
12	GO-38063/INIAP-14	32	INIAP-12/SPA-2707
13	GO-38066/FED-275	33	INIAP-12/GO-38007
14	GO-38066/INIAP-12	34	INIAP-14/GO-38007
15	GO-38066/INIAP-14	35	JAPON/FED-50
16	GO-38066/GO-38242	36	JAPON/FED-275
17	GO-38119/GO-38242	37	LINEA -250/INIAP-12
18	GO-38119/FED-60	38	SPA-2707/FED-50
19	GO-38119/GO-38404	39	SPA-2707/FED-275
20	GO-38173/GO-38404	40	SPA-2707/GO-38007

Fuente: 1/. Datos obtenidos en la Estación Agrometeorológica de la EELS del INIAP.

### 3.3. Materiales, equipos de laboratorio y reactivos

Los materiales, equipo de laboratorio y reactivos utilizados en esta investigación se detallan a continuación:

#### Materiales requeridos para el cultivo de anteras en arroz

Macetas	Guantes de látex (S)
Etiquetas	Guantes de Nitrilo (S)
Hojas para Bisturí No. 10	Mascarillas
Mangos para Bisturí	Cobertores de zapatos estériles
Pinza mediana de punta gruesa	Bandejas plásticas
Pinzas pequeña de punta fina	Porta y cubre objetos
Papel filtro	Espátulas
Caja de Petri grande	Micropipeta de 100 – 1000 $\mu$ L
Papel toalla	Pipeta graduada (1 mL)
Papel aluminio	Vasos graduados (100, 250, 500, 1000 mL)
Fundas para esterilizar grandes	Cajas plásticas (250 mL)
Cinta adhesiva masking tape	Probetas (5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 mL)
Tijeras	Erlenmeyers (125, 250, 500, 1000, 2000 mL)
Mecheros de alcohol	Filtros 0,22 micras

#### Equipos de laboratorio requeridos para el cultivo de anteras en arroz

Sorbona	Autoclave simple
Estufa	Potenciómetro
Cámara de flujo laminar	Refrigerador
Balanza analítica	Estereoscopio
Plato agitador y calentador	Microscopio

### Reactivos requeridos para el cultivo de anteras de arroz

$\text{NH}_4\text{NO}_3$	Piridoxina-HCl
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	Glicina
$\text{KNO}_3$	Arginina
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	Biotina
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Myo-inositol
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	AIA (ácido indolacético)
$\text{H}_3\text{BO}_3$	2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético)
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	AFA (ácido fenilacético)
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	ANA (ácido naftalenacético)
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	Cinetina (6-furfurilaminopurina)
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	Acetocarmín
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	Sacarosa
KI	Maltosa
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	Gellan gum
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	Alcohol
Tiamina-HCl	Cloro
Acido nicotínico	Etanol

#### 3.4. Análisis estadístico

Dada la naturaleza del estudio, no fue necesario emplear diseño experimental. La interpretación de la información se la realizó mediante estadística descriptiva.

### 3.5. Manejo del ensayo

#### 3.5.1. Plan de cruzamientos

Consistió en la planificación de 40 cruces utilizando 19 progenitores (Cuadro 2). Para la ejecución se contó con 3 bloques de cruzamiento disponibles en campo (Figura 1); las características agronómicas de los progenitores se detallan en el Cuadro 3.

**Cuadro 2.** Plan de cruzamientos simples para obtención de semillas F1.

		PROGENITORES MASCULINOS						
♀ \ ♂		FED-275	FED-50	GO-38007	INIAP-12	INIAP-14	INIAP-15	SPA-2707
GO-38007						X		X
GO-38016			X					X
GO-38063					X	X		
GO-38066	X				X	X		
GO-38173			X			X	X	
GO-38242			X		X	X		
INIAP-12	X	X	X					X
INIAP-14			X					
INIAP-15			X					X
INIAP-16			X					
INIAP-17	X							
JAPON	X	X						
LÍNEA-130			X				X	
LÍNEA-14	X	X						X
LÍNEA-257			X					X
LÍNEA-37			X				X	
SPA-2707	X	X	X			X	X	

PROGENITORES FEMENINOS

**Cuadro 3.** Principales características agronómicas de los progenitores utilizados en los cruzamientos.

PROGENITORES	FLORACIÓN (días)	CICLO VEGETATIVO (días)	ALTURA DE PLANTA (cm)	RENDIMIENTO (kg/ha)	VOLCAMIENTO <sup>1/</sup>	LONGITUD DEL GRANO DESCASCARADO <sup>2/</sup>	CENTRO BLANCO <sup>3/</sup>	ÍNDICE DE PILADA (%)	PUDRICIÓN DE VAINA <sup>4/</sup>	MANCHADO DE GRANO <sup>5/</sup>	HOJA BLANCA <sup>6/</sup>	PYRICULARIA <sup>7/</sup>
FED-275	99	134	127	6906	TF	L	M	67.71	MR	MR	MR	MR
FED-50	108	140	127	6958	TF	L	P	61.34	MR	MR	MR	MR
GO-38007	90	125	109	5761	TF	EL	P	61	T	T	MR	R
GO-38016	80	115	102	5351	TF	L	P	63	T	T	R	R
GO-38063	83	118	116	5607	TF	EL	P	67	T	T	R	R
GO-38066	84	119	107	5079	TF	EL	P	65	T	T	R	R
GO-38173	95	125	118	8767	TF	L	P	70	T	T	R	R
GO-38242	97	127	108	8460	TF	L	P	70	T	T	T	T
INIAP-12	60	95	100	5000	TF	EL	P	71	MS	MR	MS	R
INIAP-14	78	113	99	5800	TF	L	P	66	MR	MR	MR	MS
INIAP-15	82	117	89	5100	TF	EL	P	67	MR	T	MR	MS
INIAP-16	71	106	93	5000	TF	EL	P	68	MS	T	T	T
INIAP-17	82	117	83	6200	TF	EL	P	62	T	T	MR	T
JAPON*	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---
LÍNEA-130	97	132	113	5041	TF	EL	P	69	T	T	MR	T
LÍNEA-14	93	129	99	5146	TF	EL	P	70	MT	T	MR	T
LÍNEA-257	102	135	120	5950	TF	L	P	67	MT	T	MR	T
LÍNEA-37	95	130	107	4976	TF	EL	P	61	MT	T	MR	T
SPA-2707	91	126	97	6830	TF	EL	P	51.69	R	R	R	T

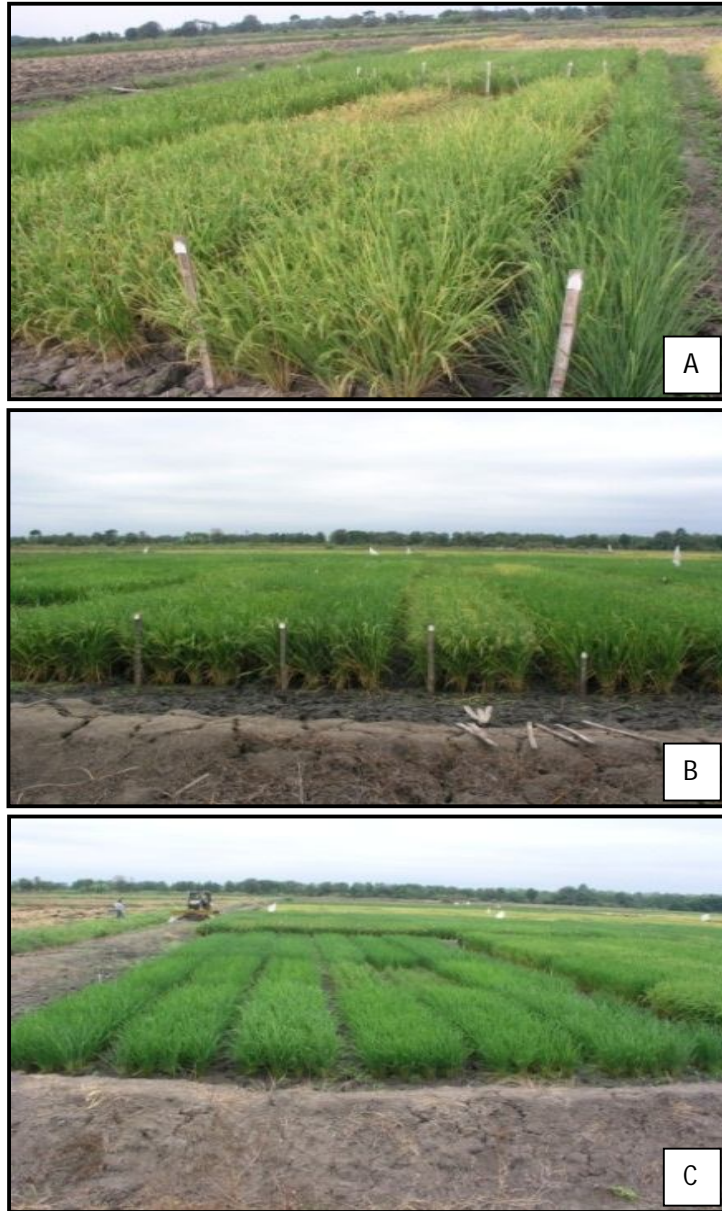
\* El germoplasma “JAPON” es un material introducido del exterior e identificado en INIAP con el nombre del país de origen, se desconoce sus características agronómicas con exactitud, sin embargo se la utilizó por conocerse que pertenece a la subespecie japónica, es decir, posee buena calidad de grano, altura baja y precocidad.

<sup>1/</sup>: TF= tallos fuertes sin volcamiento

<sup>2/</sup>: L= grano largo; EL= grano extra largo

<sup>3/</sup>: P= centro blanco pequeño; M= centro blanco mediano

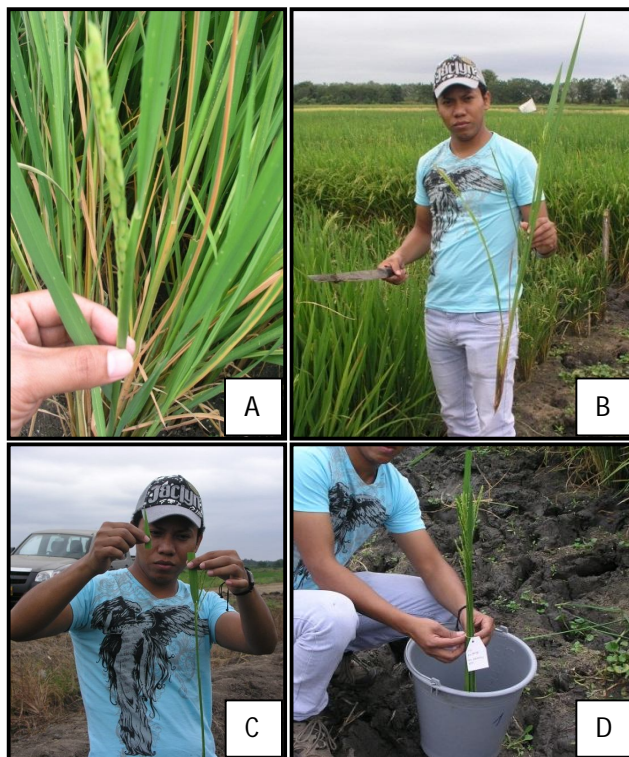
<sup>4/</sup>, <sup>5/</sup>, <sup>6/</sup>, <sup>7/</sup>: R= resistente; MR= medianamente resistente; T= tolerante; MT= medianamente tolerante; MS= medianamente susceptible.



**Figura 1.** Bloques de cruzamiento en el campo experimental de la EELS: primera fecha de siembra-15-04-10 (A); segunda fecha de siembra-30-04-10 (B); tercera fecha de siembra-15-05-10 (C).

### 3.5.2. Selección y colección de macollas para el cruzamiento

Para seleccionar las panículas que hicieron de progenitor femenino se consideró que éstas estuvieran en condiciones fitosanitarias óptimas y hayan emergido un 50 a 60%. En horas de la mañana, se procedió a extirpar las macollas tomándolas con raíz, utilizando un machete pequeño y de punta fina, procurando hacer el menos daño posible al sistema radical, inmediatamente se eliminaron todas las hojas a excepción de la hoja bandera la cual se le dejó 15 cm para evitar la deshidratación. Se colectaron 2 macollas por cada cruce y se etiquetaron con sus datos: N° de tratamiento, el nombre del material (variedad, línea, líneas promisorias-GO) fecha de colección y la fecha de polinización; luego se colocaron en un recipiente con agua y se trasladaron al Laboratorio del Programa Nacional de Arroz para proceder a emascular, lo cual se realizó en horas de la tarde cuando ya no hubo riesgo de autofecundación por cuanto la antesis ya había ocurrido (Figura 2).

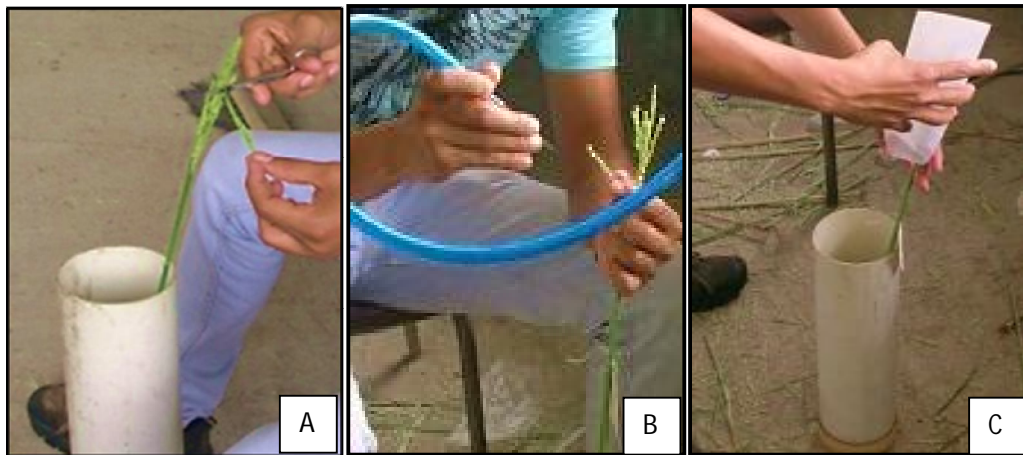


**Figura 2.** Selección y colección de macollas a ser polinizadas: condición óptima de las panículas para emascular (A); extracción de las macollas, de raíz (B); eliminación de hojas para evitar deshidratación (C); etiquetado y mantenimiento de las macollas colectadas en agua (D).



### 3.5.3. Emasculación

La emasculación se realizó en horas de la tarde. Para el efecto, utilizando una tijera pequeña, se eliminaron las flores ya abiertas ubicadas en el tercio superior de la panícula y aquellas inmaduras ubicadas en el tercio inferior, quedando solo aquellas que se ubican en el tercio medio, de condición óptima para la polinización; luego con la finalidad de exponer las anteras, se realizó un corte transversal a la mitad de cada flor seleccionada. Seguido, utilizando un equipo de succión, se procedió a extraer las anteras, dejando únicamente el pistilo. Posteriormente, las panículas fueron cubiertas con sobres de papel cristal para evitar el contacto con polen extraño (Figura 3).



**Figura 3.** Emasculación: eliminación de flores del tercio superior e inferior de la panícula y corte transversal a la mitad de cada flor seleccionada para emascular (A); succión de las anteras, utilizando una bomba de vacío (B); colocación de sobre de papel cristal (C).

### 3.5.4. Polinización

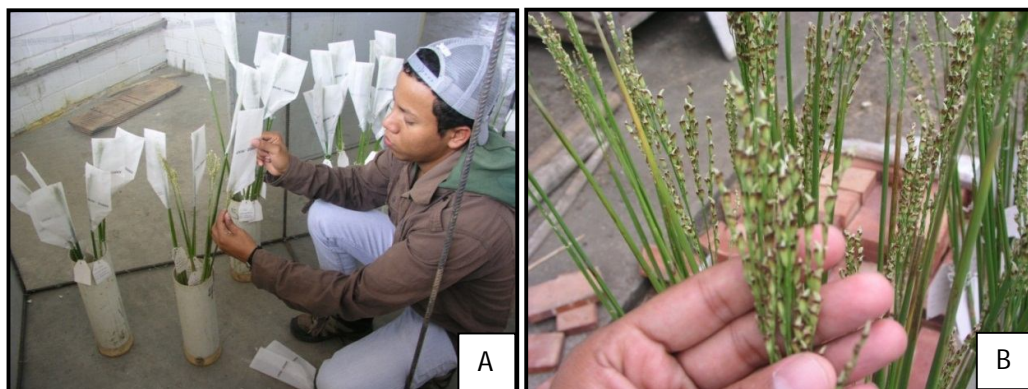
La polinización se realizó en horas próximas al medio día, al momento en que ocurrió la antesis de las plantas utilizadas como progenitores masculinos. Las panículas emasculadas (progenitor femenino) fueron trasladadas a los bloques de cruzamiento para proceder a polinizarlas. Se retiró el sobre de papel cristal y se agitaron sobre las panículas con polen de su respectivo progenitor masculino. Una vez polinizado, se cubrieron nuevamente con el sobre de papel cristal, etiquetándose con datos de la fecha de polinización y nombre del progenitor masculino (Figura 4).



**Figura 4.** Polinización: presencia de muchos insectos que colectan polen como un indicador de la antesis (A); polinización cruzada, inducida mediante agitación de la panícula al momento de la antesis (B).

### 3.5.5. Manejo de plantas polinizadas

Las plantas polinizadas fueron llevadas a una casa de mallas. A los 6 días se retiró el sobre protector, exponiéndose a la luz directa a los 12 días. Cada dos días se cambió de agua a los recipientes que portaban las macollas hasta llegar a cosecha (Figura 5).



**Figura 5.** Manejo de plantas polinizadas: plantas polinizadas al momento de retirar el sobre protector, 6 días después de la polinización (A); plantas con semillas F1, 12 días después de la polinización(B).

### 3.5.6. Cosecha de semillas F1

La cosecha de las semillas F1 se realizó a los 30 días después de la polinización. Se seleccionaron solo granos sanos y con buen desarrollo; luego se procedió a descascarar teniendo cuidado de no dañar el embrión. Las semillas de cada cruce fueron contadas y guardadas en sobres de papel, y se les incorporó vitavax (fungicida) para prevenir contaminación por patógenos; luego se almacenaron en cuarto frío (13°C) donde permanecieron hasta romper latencia (Figura 6).

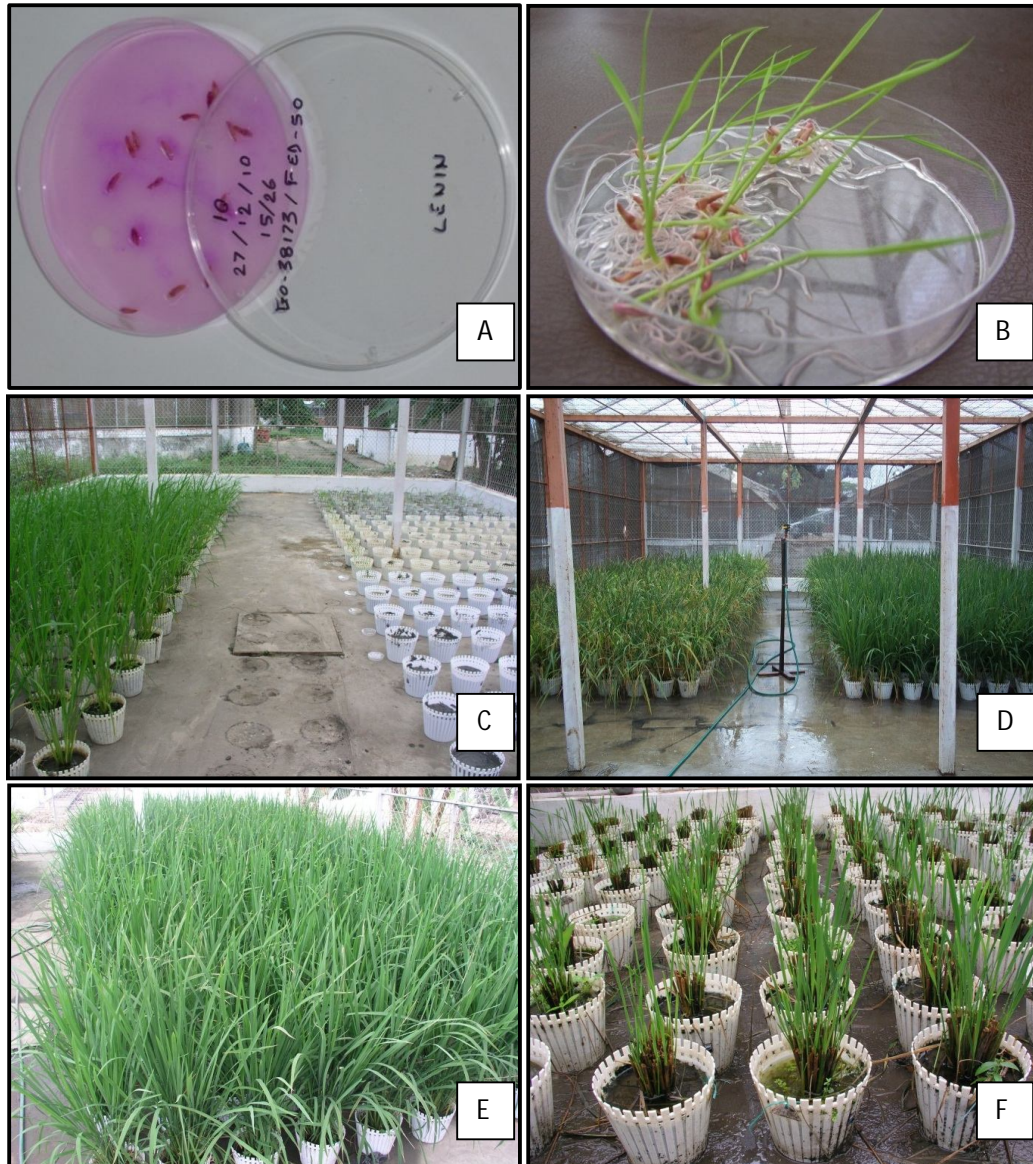


**Figura 6.** Cosecha de semilla F1: semillas F1 descascaradas (A); tratamiento químico de semillas en los sobres, con vitavax (B).

### 3.5.7. Siembra y manejo del germoplasma donante de anteras

Después de romper latencia las semillas F1, cada 7 días se colocaron a germinar 5 cruces (10 a 15 semillas de cada cruce) en cajas de Petri con una lámina de agua de 2 mm, hasta completar los 40 cruces del experimento; con la finalidad de intercalar la producción de panículas y disponer periódicamente el material de siembra (anteras). Se mantuvieron en las cajas de Petri durante 7 días, tiempo en el cual las plántulas desarrollaron una hoja, luego se trasplantaron a macetas con suelo fangueado donde se establecieron 10 plantas por cada cruce y se mantuvieron con riego continuo con una lámina de agua de 2 cm, en la casa de mallas del Programa Nacional de Arroz.

Se debe indicar también que debido a la falta de material (anteras), se realizó la siembra de anteras procedentes de soca (segunda emisión de panículas de un mismo tallo luego de la cosecha) de las plantas F1 donantes de anteras (Figura 7).



**Figura 7.** Siembra y manejo del germoplasma donante de anteras: germinación de semillas F1 en caja de Petri (A); plántulas F1 a los 7 días después de la siembra en cajas de Petri, óptimas para el trasplante a macetas (B); fase vegetativa del material donante de anteras, en etapas de plántula (derecha) y macollamiento (izquierda) (C); fase de reproducción (derecha) y maduración (izquierda) del material donante de anteras (D); plantas F1 en etapa de “embuchamiento”, 75 días después del trasplante, óptimas para el cultivo de anteras (E); soca de las plantas F1 que también fueron utilizados como material donante de anteras (F).

### 3.5.8. Colección de las panículas para cultivo de anteras.

A los 67 días después de la siembra, se colectaron las primeras panículas. La producción de anteras se fue dando de manera progresiva debido a que la siembra de los cruces se realizó de la misma manera.

Las panículas fueron colectadas en horas de la mañana y en la tarde, teniendo cuidado de no hacerlo al momento de la antesis. De cada planta se colectaron 4 panículas, conservando su entrenudo y la vaina de la hoja para protegerlas de la contaminación por patógenos. Se colectaron en estado de embuchamiento cuando la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas emitidas de cada panícula, se encontraban de 2 a 5 cm entre sí; y las flores presentaban glumas de color amarillo verdoso y consistencia frágil. Estas características están altamente correlacionadas con el estado de desarrollo de las microsporas correspondiente a las fases uninucleado medio o tardío, que es el óptimo para el cultivo de anteras (Figura 8) de acuerdo al análisis de microesporogénesis realizado.

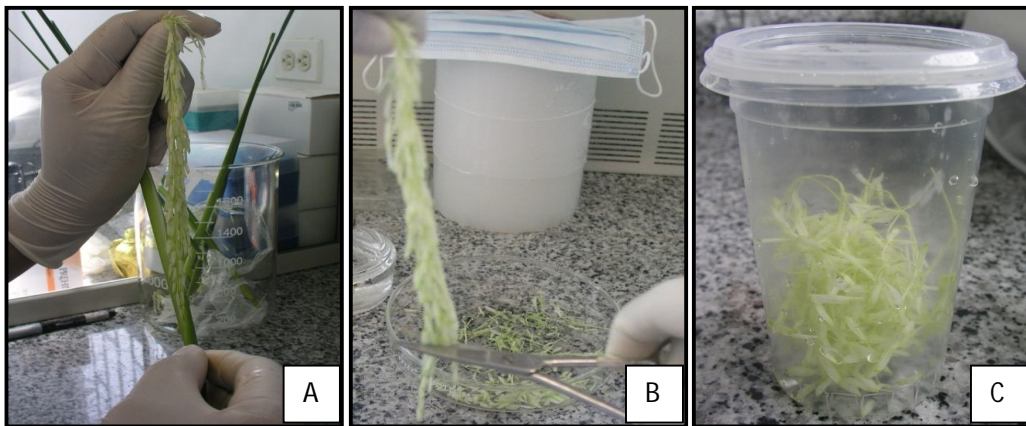
Una vez colectadas las panículas (un total de 200), se llevaron al laboratorio donde se esterilizaron superficialmente con etanol 70%, luego se colocaron dentro de un tubo de PVC con tapa y se incubaron en el cuarto frío a 13°C.



**Figura 8.** Panículas con 2 a 5 cm de distancia entre aurículas de las dos últimas hojas; óptimas para cultivo de anteras.

### 3.5.9. Selección y desinfección de flores para el cultivo de anteras

Previo a la siembra de las anteras de las panículas incubadas en refrigeración, se procedió así: se abrió la vaina de cada panícula y se extrajo la inflorescencia, tomándose de la base de forma invertida para cortar con una tijera la sección con flores óptimas para el cultivo de antera, teniendo cuidado de no manipular las flores con las manos. La sección de interés de la inflorescencia, se colocó en un vaso de plástico estéril con tapa donde se desinfectó con etanol 70 % durante 1 minuto y se enjuagó por tres veces con agua destilada estéril (Figura 9).



**Figura 9.** Selección y desinfección de flores para cultivo de anteras. Extracción de panícula de la vaina, tomándose de la base de forma invertida (A); selección de las flores óptimas y eliminación con tijeras de las no deseadas (B); desinfección de las flores con etanol 70% y agua destilada estéril (C).

### 3.5.10. Inducción de callos: Aislamiento y siembra de las anteras en medios de cultivo para la inducción de microcallos e incubación en cuarto oscuro

Para la siembra se utilizaron vasos plásticos que contenían 25 mL de medio de cultivo para la inducción de microcallos. Se sembraron de 100 anteras por vaso (provenientes de 50 flores), teniendo en cuenta que por cada flor caen al medio de cultivo dos anteras aproximadamente de las seis que contiene cada estructura floral.

Con el fin de aislar las anteras de los filamentos, se cortaron 50 flores por su base con bisturí # 10, se tomaron de 10 a 15 flores por el extremo no cortado con una pinza mediana; seguido se golpearon contra el borde interior del vaso plástico que contenía el medio de cultivo, luego los vasos fueron cerrados y sellados con stretch film. Una vez realizada la siembra de las anteras en el medio de cultivo de inducción de callos, se almacenaron en un cuarto oscuro a 24°C. Bajo estas condiciones ocurre la división mitótica de las microsporas, lo cual conduce a la formación de microcallos (Figura 10).



**Figura 10.** Inducción de callos: corte de las flores por su base (A); colección de las flores por el extremo no cortado (B); siembra de las anteras mediante golpes continuos en el borde interior del vaso (C); incubación de anteras en oscuridad (D).

### **3.5.11. Regeneración de plantas: Transferencia de microcallos al medio de regeneración de plantas**

En esta fase, los microcallos fueron transferidos a vasos plásticos de 1 litro con tapa, los cuáles contenían 100 mL de medio de cultivo MS para regeneración. Se usó un bisturí # 10 para transferir los callos del medio de inducción al medio de regeneración.

Durante la incubación, se mantuvieron a una temperatura de 24 °C, colocados en una estantería con luz indirecta, por una semana. Luego fueron llevados a luz directa de 80 a 100  $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ , la cual se logra con lámparas fluorescentes tipo luz día, con un fotoperiodo de 12 horas/día.

### **3.5.12. Aclimatación de plantas R1**

Una vez regeneradas las plantas y habiendo desarrollado raíces y área foliar al cabo de dos meses en medio de regeneración en el cuarto de crecimiento, estas se llevaron a la casa de mallas donde se procedió a retirar las tapas de las tarrinas conteniendo aun el medio de cultivo y se mantuvieron expuestas al ambiente durante un día, al siguiente día se les retiró el medio de cultivo de las raíces, se dejó en agua de grifo un día más y finalmente se trasplantaron en macetas.

## **3.6. Variables registradas**

- Semillas por cruce
- Relación panícula/microspora
- Viabilidad del polen
- Ciclo de callogénesis
- Callos por germoplasma
- Callos por condiciones ambientales
- Callos por tratamiento en frío
- Callos por medio de cultivo
- Regeneración de plantas
- Plantas aclimatadas
- Ploidía



### **3.6.1. Semillas por cruce**

Se cuantificó las semillas obtenidas de cada uno de los 40 cruces realizados para conocer la disponibilidad de las mismas.

### **3.6.2. Relación panícula/microspora**

Para precisar las características morfológicas de la panícula (longitud entre la aurícula de la hoja bandera y la aurícula de la hoja anterior; consistencia y color de las glumas y florecillas) al momento de la colecta, indicadoras del estado óptimo de desarrollo de los granos de polen en los genotipos utilizados, se realizó un análisis citológico a las microsporas procedentes del tercio medio de 5 panículas en diferentes estados de crecimiento (distancia entre aurículas: 0, 3, 7, 11, 25 cm).

Para llevar a cabo el proceso, se incubaron las anteras sumergiendo las flores seleccionadas en baño de María a 70 °C por 45 minutos, en una solución fijadora compuesta por tres partes de etanol absoluto y una parte de ácido acético glacial, al cual se agregó cloruro férrico al 0,5%. Se montaron 3 placas por cada panícula, para lo cual se presionaron las anteras sobre un porta objetos para permitir que salgan las microsporas, con dos a tres gotas de acetocarmín al 0,5%. Se colocó el cubre objeto, y se observó al microscopio con lente de 40x. Finalmente se correlacionó el estado de crecimiento de la panícula con los estados de desarrollo de las microsporas y se determinó las características morfológicas de la panícula óptimas para el cultivo de anteras.

### **3.6.3. Viabilidad del polen**

Para medir el porcentaje de viabilidad de los granos de polen provenientes de las plantas F1 donantes de anteras, se realizó un análisis citológico.

De cada cruce se tomaron 20 flores provenientes de panículas que iniciaron el proceso de emergencia y se sumergieron en un tubo de ensayo conteniendo una solución de etanol al 70 %, luego se extrajeron todas las anteras de seis flores, se colocaron en un porta objeto que contenía una gota de solución Lugol (I-KI), se

punzaron cuidadosamente las anteras para la liberación de los granos de polen y se retiraron los residuos. Finalmente se observó en el microscopio y se clasificaron los granos de polen de acuerdo a la siguiente escala aplicada en el CIAT:

<b>Forma, tamaño y grado de tinción</b>	<b>Escala</b>
Granos de polen alargados, no teñidos	Estériles
Granos de polen esféricos, no teñidos	Estériles
Granos de polen esféricos, ligeramente teñidos	Estériles
Granos de polen esféricos, teñidos	Fértiles
<b>Esterilidad del polen</b>	<b>Escala</b>
Completamente estéril	100 %
Estéril	91-99 %
Parcialmente estéril	71-90 %
Parcialmente fértil	31-70 %
Fértiles	21-30 %
Completamente fértiles	0-20 %

Fuente: CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). Comunicación personal (2011).

#### **3.6.4. Ciclo de callogénesis**

Se evaluó el tiempo de inducción, desde que aparecen los primeros callos hasta obtener una formación masiva de los mismos

#### **3.6.5. Callos por germoplasma**

Para observar la respuesta del germoplasma utilizado en el cultivo de anteras (40 generaciones F1), se promedió el número de callos obtenidos por cada 100 anteras provenientes de 38 cruces índica/índica, y 2 cruces japónica/índica.

#### **3.6.6. Callos por condiciones ambientales**

Para observar el efecto del ambiente de cultivo de las plantas donantes de anteras sobre la inducción de callos, se promedió el número de callos obtenidos por cada 100 anteras provenientes de plantas cultivadas a campo abierto y en condiciones de invernadero.

### **3.6.7. Callos por tratamiento en frío**

Para observar el efecto del tratamiento en frío a 13°C sobre la inducción de callos, se promedió el número de callos obtenidos por cada 100 anteras incubadas durante 0 (testigo sin incubar) 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días.

### **3.6.8. Callos por medio de cultivo**

Para observar el efecto del medio de cultivo en la inducción de callos, se promedió el número de callos obtenidos por cada 100 anteras a partir de los medios utilizados en este trabajo: M1 (desarrollado y utilizado actualmente en el CIAT) L1, L2, L3, L4, L5, L6 y L7 (modificaciones de los medios M1 y MS); los componentes por cada litro de medio se muestran en el Anexo 1 y la preparación de los mismos, en los 2 y 3.

### **3.6.9. Plantas regeneradas**

En la fase de regeneración de plantas se utilizó el medio MS (Murashige y Skoog) modificado. Los componentes por cada litro del medio se muestran en el Anexo 1 y la preparación en el Anexo 4. Debido a la poca regeneración de plantas no fue necesario evaluar este dato.

### **3.6.10. Plantas aclimatadas**

Se contabilizaron el número de plantas aclimatadas.

### **3.6.11. Ploidía**

Se determinó el nivel en base a lo expuesto por Lentini, Martínez y Roca (1997). Para el efecto, se evaluó la viabilidad del polen de la R1, mediante un análisis citológico en solución lugol (I-KI). Además se mantuvo la planta en observación todo el ciclo de vida para observar su morfología y corroborar el nivel de fertilidad (características indicadoras del nivel de ploidía).

## IV. RESULTADOS

### 4.1. Semillas por cruce

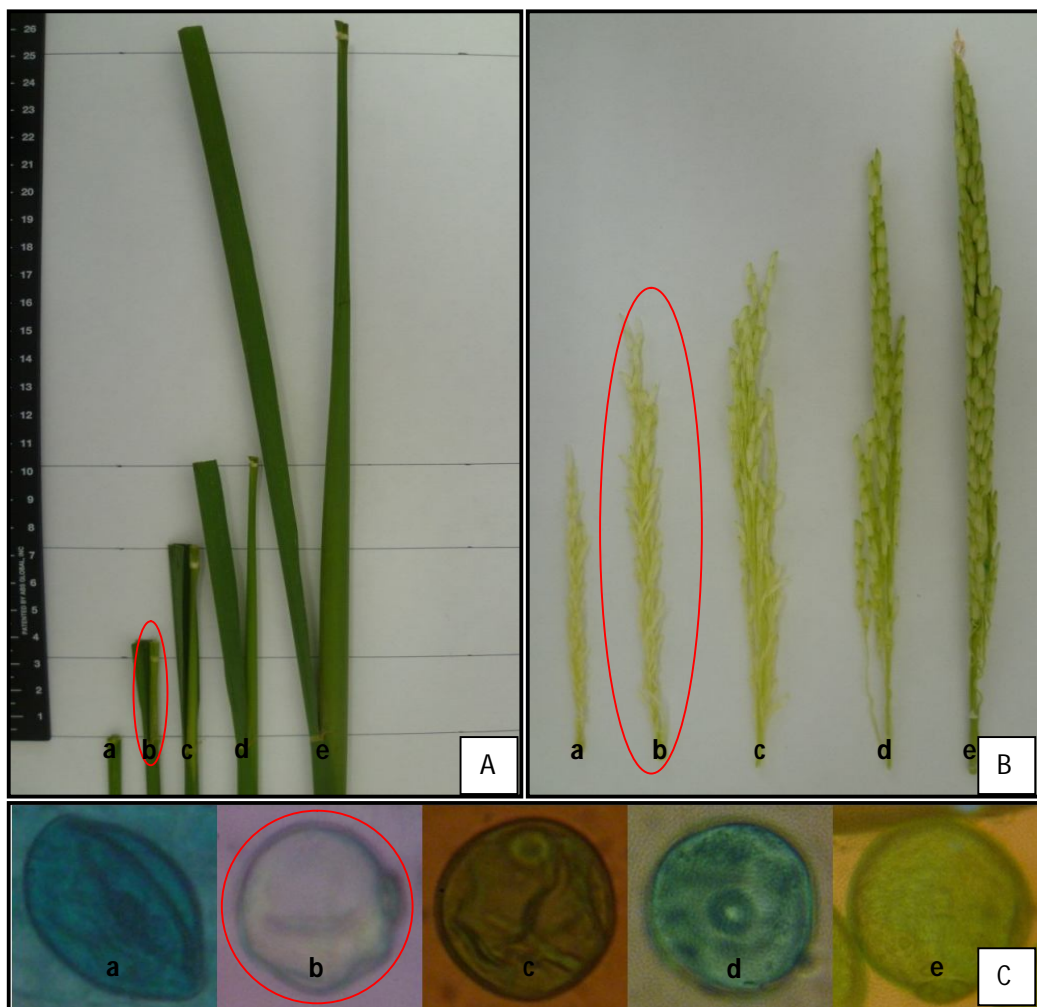
En el Cuadro 4, se presenta el número de semillas obtenidas a partir de los cruces realizados; las cuales fueron cultivadas y mantenidas en invernadero para disponer de plantas F1 donantes de anteras.

**Cuadro 4.** Semillas F1 obtenidas a partir de 40 cruces simples.

CRUCE		N° DE SEMILLAS/CRUCE		CRUCE	
♀	♂			♀	♂
GO-38007/INIAP-14		35	20	INIAP-15/GO-38007	
GO-38007/SPA-2707		48	20	INIAP-15/SPA-2707	
GO-38016/FED-50		43	42	INIAP-16/GO-38007	
GO-38016/SPA-2707		26	21	INIAP-17/FED-275	
GO-38063/INIAP-12		25	13	JAPON/FED-50	
GO-38063/INIAP-14		62	19	JAPON/FED-275	
GO-38066/FED-275		12	52	LINEA-14/FED-50	
GO-38066/INIAP-12		38	14	LINEA-14/FED-275	
GO-38066/INIAP-14		45	18	LINEA-14/SPA-2707	
GO-38173/FED-50		32	14	LINEA-37/FED-50	
GO-38173/INIAP-14		22	23	LINEA-37/INIAP-15	
GO-38173/INIAP-15		49	25	LINEA-130/FED-50	
GO-38242/FED-50		22	15	LINEA-130/INIAP-15	
GO-38242/INIAP-12		74	39	LINEA-257/FED-50	
GO-38242/INIAP-14		17	18	LINEA-257/SPA-2707	
INIAP-12/FED-50		95	14	SPA-2707/FED-50	
INIAP-12/FED-275		19	40	SPA-2707/FED-275	
INIAP-12/SPA-2707		30	17	SPA-2707/GO-38007	
INIAP-12/GO-38007		17	36	SPA-2707/INIAP-14	
INIAP-14/GO-38007		28	23	SPA-2707/INIAP-15	

## 4.2. Relación panícula/microspora

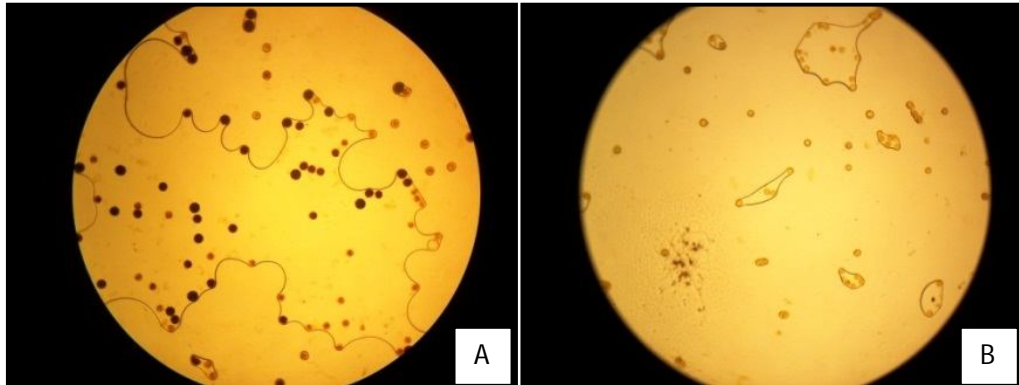
En este estudio se determinó mediante el análisis citológico que las panículas que contenían una distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas de 2 a 5 cm entre sí (Figura 11, A), con glumas de color amarillo verdoso y consistencia frágil (Figura 11, B), contenían las microsporas en estado uninucleado medio o tardío (Figura 11, C)



**Figura 11.** Análisis de cinco panículas en diferentes estados de desarrollo: diferencia de distancias entre aurículas de las 5 panículas, observándose en el literal (b) la panícula óptima (A); diferencias en el color y consistencia entre flores de las 5 panículas, observándose en el literal (b) la inflorescencia óptima (B); estados de desarrollo del polen de las 5 panículas, observándose en el literal (b) el estado uninucleado (C).

### 4.3. Viabilidad del polen

Se determinó mediante el análisis citológico que dos de los cruces (JAPON/FED-50 y JAPON/FED-275) fueron estériles; es decir son plantas androestéril. Los demás cruces son fértiles (Figura 12). Esta condición también se pudo observar *in vivo* una vez que las plantas culminaron su ciclo.



**Figura 12.** Viabilidad del polen: polen fértil de color café oscuro, luego de la tinción con lugol (A); polen infértiles de color amarillo, luego de la tinción con lugol (B).

### 4.4. Ciclo de callogénesis

En general los primeros callos se observaron alrededor de los 30 días de cultivo y la proliferación se dio entre los 45 y 50 días; para entonces su tamaño estuvo de 2 a 3 mm de diámetro, siendo este el momento indicado para transferirlos al medio de regeneración (Figura 13).



**Figura 13.** Inducción de callos: microcallos en diferentes estado de crecimiento (A); liberación del microcallo de la antera al medio de cultivo (B); callo de 45 días en medio de inducción (C)

#### 4.5. Callos por germoplasma

De los 40 genotipos utilizados en el cultivo de anteras, 31 respondieron a la inducción de callos, mientras 9 de ellos no dieron respuesta alguna; los cruces que mejor respondieron a la inducción de callos fueron: GO-38016/SPA-2707; SPA-2707/GO-38007; GO-38793/GO-38063, con 80, 116 y 180 callos/100 anteras respectivamente. Los que dieron resultados más bajos fueron: GO-38173/INIAP-15; GO-38173/GO-38404; GO-38016/FED-50 con 2, 2 y 3 callos/100 anteras respectivamente (Cuadro 5; Figura 14).

**Cuadro 5.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del germoplasma.

CRUCE	CALLOS/100 ANTERAS		CRUCE
FED-60/GO-38790	5	10	GO-38173/FED-275
FED-60/GO-38426	54	20	GO-38173/FED-50
FED-60/GO-38242	4	30	GO-38173/INIAP-14
FED-275/INIAP-17	40	2	GO-38173/INIAP-15
FED-275/INIAP-12	0	6	GO-38242/FED-50
GO-38007/INIAP-15	7	25	GO-38242/INIAP-12
GO-38007/INIAP-14	10	32	GO-38242/INIAP-14
GO-38007/SPA-2707	49	18	GO-38790/GO-38242
GO-38016/FED-50	3	180	GO-38793/GO-38063
GO-38016/SPA-2707	80	0	INIAP-12/FED-50
GO-38063/INIAP-12	0	0	INIAP-12/FED-275
GO-38063/INIAP-14	15	10	INIAP-12/SPA-2707
GO-38066/FED-275	25	14	INIAP-12/GO-38007
GO-38066/INIAP-12	40	0	INIAP-14/GO-38007
GO-38066/INIAP-14	0	10	JAPON/FED-50
GO-38066/GO-38242	0	20	JAPON/FED-275
GO-38119/GO-38242	6	30	LINEA-250/INIAP-12
GO-38119/FED-60	0	13	SPA-2707/FED-50
GO-38119/GO-38404	0	16	SPA-2707/FED-275
GO-38173/GO-38404	2	116	SPA-2707/GO-38007

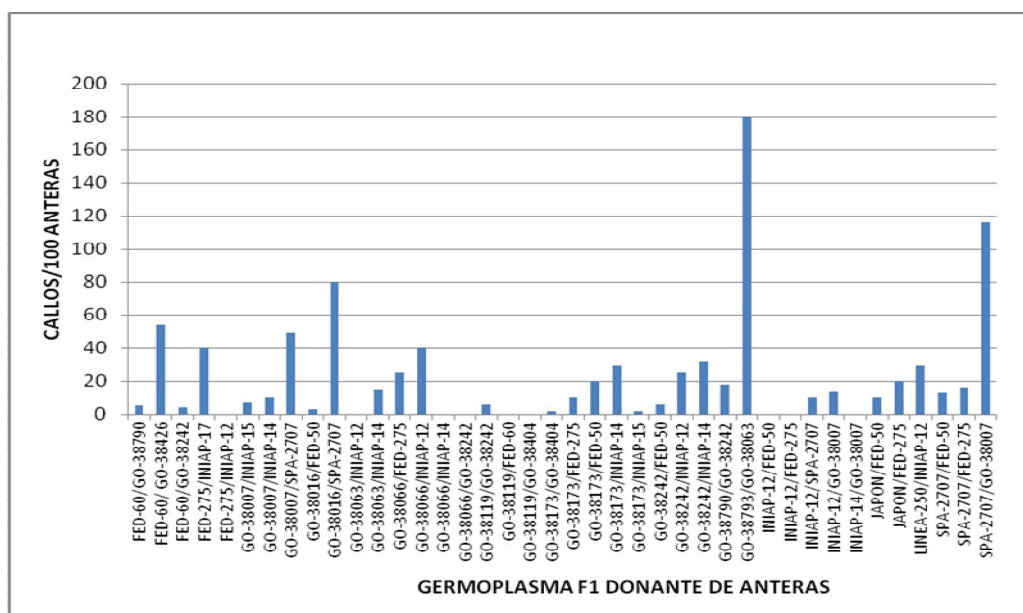


Figura 14. Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del germoplasma.

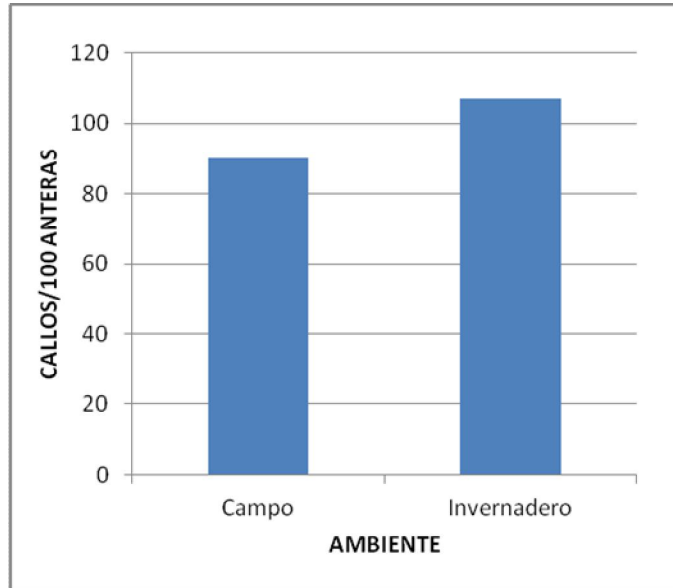
#### 4.6. Callos por condiciones ambientales

Se observó que el ambiente de cultivo no es un factor determinante en la inducción de callos, en este estudio se cultivaron anteras proveniente de plantas cultivadas a campo abierto y plantas cultivadas en invernadero. Se obtuvo callos a partir de anteras provenientes de ambas condiciones de cultivo. Las anteras provenientes del invernadero dieron mayor respuesta con 107 callos/100 anteras vs 90 callos/100 anteras en aquellas provenientes de campo abierto (Cuadro 6; Figura 15).

**Cuadro 6.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del ambiente de cultivo del material donante de anteras.

AMBIENTE	CALLOS/100 ANTERAS
Campo	90
Invernadero	107





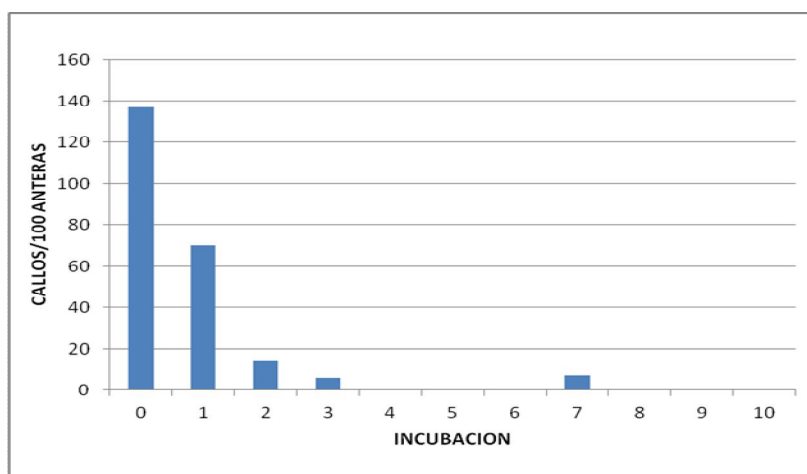
**Figura 15.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del ambiente de cultivo del material donante de anteras.

#### 4.7. Callos por tratamiento en frío

El tratamiento en frío a las panículas previo a la siembra de las anteras fue un factor muy determinante, se realizaron pruebas sembrando anteras de panículas tratadas desde 1 hasta 10 días a 13°C, y panículas sin tratamiento en frío. Los mejores resultados en la inducción de callos se obtuvo en la siembra de anteras provenientes de panículas sin tratamiento en frío, es decir, aquellas sembradas el mismo día que fueron colectadas, llegando a obtener en promedio hasta 137 callos/100 anteras; seguido de aquellas que fueron tratadas durante 1, 2 y 3 días a 13°C, con 70, 14 y 6 callos/100 anteras, respectivamente. No se obtuvo respuesta a la inducción de callos de aquellas panículas que fueron sometidas al tratamiento en frío por más de 3 días (Cuadro 7; Figura 16).

**Cuadro 7.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del tratamiento en frío de las panículas

DÍAS/13 °C	CALLOS/100 ANTERAS
0	137
1	70
2	14
3	6
4	0
5	0
6	0
7	0
8	0
9	0
10	0



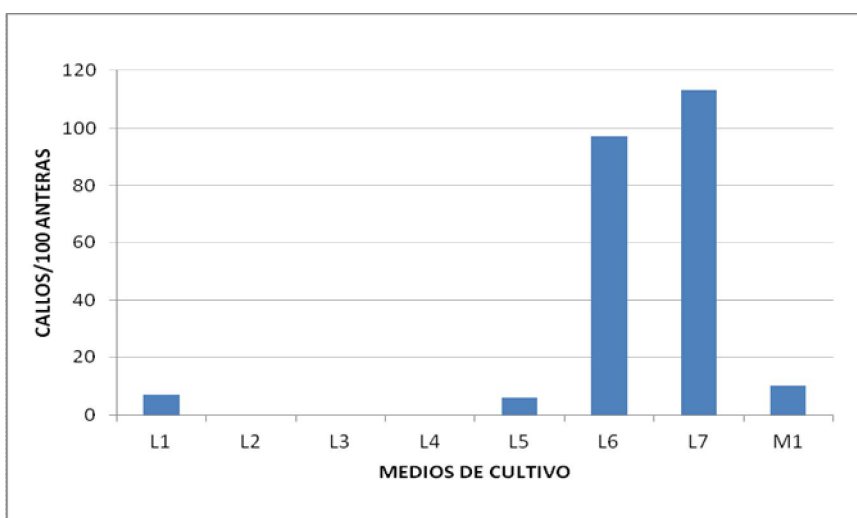
**Figura 16.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del tratamiento en frío de las panículas.

#### 4.8. Callos por medio de cultivo

La mejor respuesta a la inducción de callos se presentó en el medio L7 con un promedio de 113 callos/100 anteras, seguido de los medios L6, M1, L1 y L5 con 97, 10, 7 y 6 callos/100 anteras, respectivamente. Los demás medios de cultivo no respondieron a la formación de callos (Cuadro 8; Figura 17).

**Cuadro 8.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del medio de cultivo

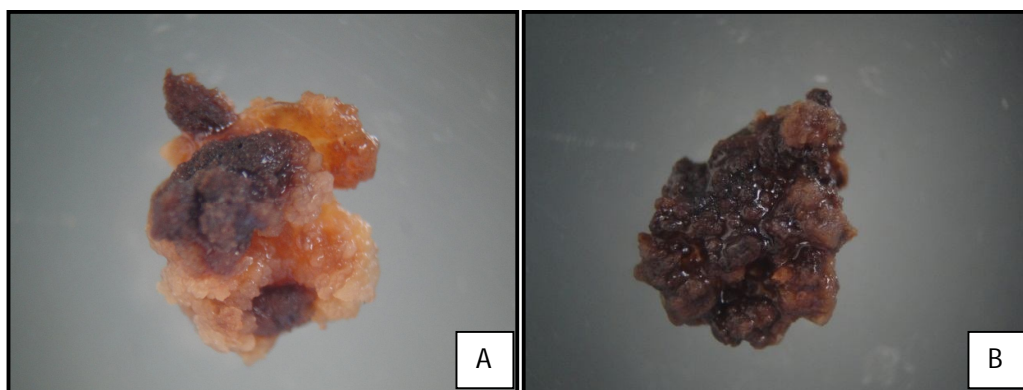
MEDIOS DE CULTIVO	CALLOS/100 ANTERAS
L1	7
L2	0
L3	0
L4	0
L5	6
L6	97
L7	113
M1	10



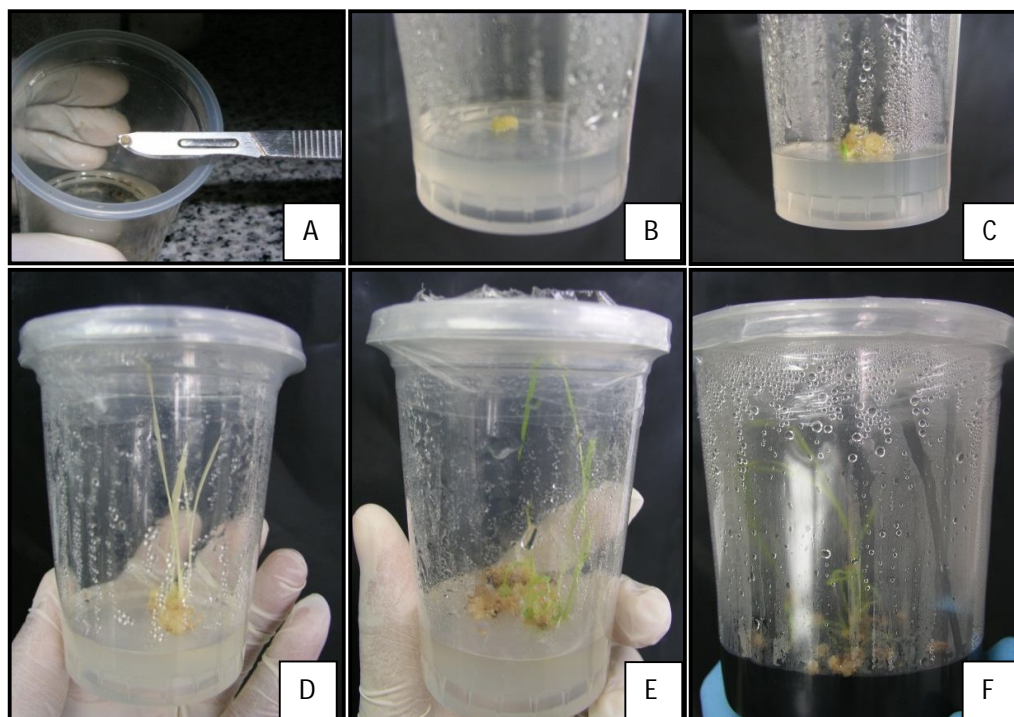
**Figura 17.** Promedio de callos/100 anteras sembradas *in vitro*, en función del medio de cultivo

#### 4.9. Plantas regeneradas

La regeneración de plantas fue mínima, casi todos los callos tenían un crecimiento acelerado hasta alcanzar 2 cm de diámetro, unos pocos llegaban a la diferenciación de órganos (presentaban puntos verdes y pequeñas raíces) pero no lograron prosperar, algunas se necrosaron y murieron (Figura 18). El cruce JAPON/FED-50 fue el único donde se regeneraron seis plantas, de las cuales cinco resultaron albinas y solo una planta regenerada a partir de este cruce resulto verde (Figura 19); sin embargo existen muchos callos que se han sometido a otros tratamientos de regeneración, resultados no publicados en este documento.



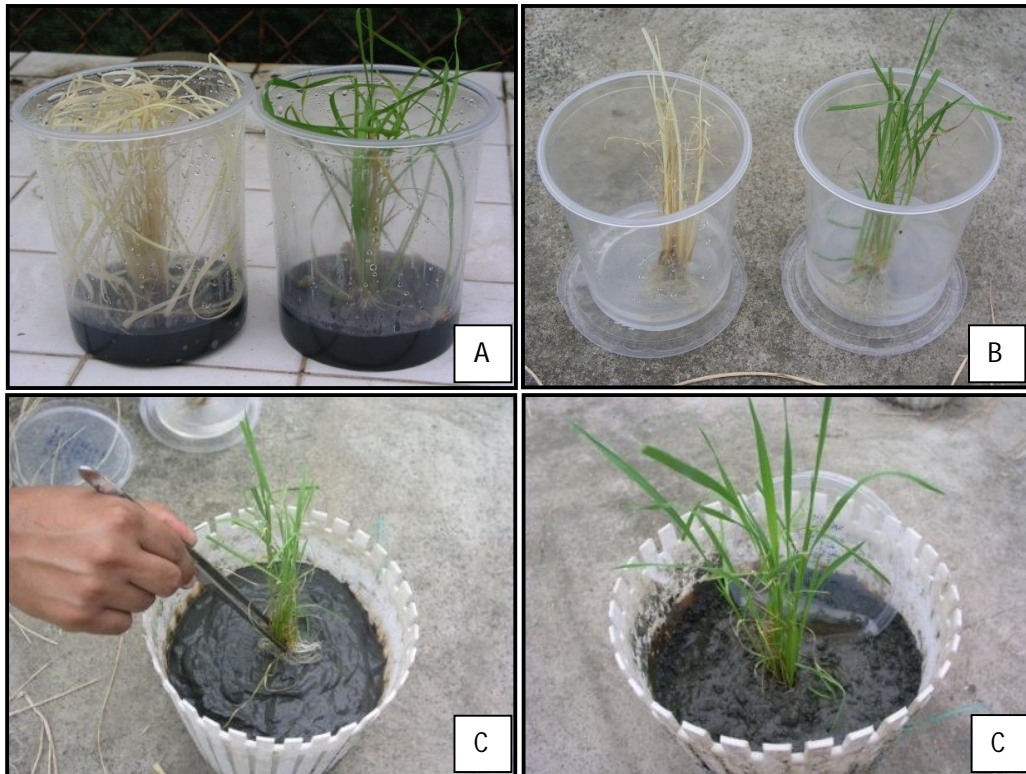
**Figura 18.** Muerte de callos: Callo con necrosis parcial a los 30 días en medio de regeneración (A); callo con necrosis total a los 60 días en medio de regeneración (B).



**Figura 19.** Regeneración de plantas (R1): Transferencia de los microcallos a medio de regeneración (A); callo de 8 días en medio de regeneración (B); diferenciación de órganos en un callo de 20 días, en medio de regeneración (C); Plántula R1 albina de 30 días en medio de regeneración (D); plántula R1 verde de 40 días en medio de regeneración (E); planta R1 verde de 60 días en medio de regeneración con carbón activado (F).

#### 4.10. Plantas aclimatadas

Las plantas R1 albinas perecieron a las 48 horas en el proceso de aclimatación debido a la carencia de clorofila, mientras que la planta verde si logró aclimatarse (Figura 20).



**Figura 20.** Aclimatación de plantas R1: plantas R1 albina y verde en el primer día de aclimatación, en medio de cultivo (A); plantas R1 albina y verde en el segundo día de aclimatación, en agua de grifo (B); trasplante de R1 a suelo fangueado (C); R1 aclimatada a los 5 días después del trasplante (D).

#### 4.11. Ploidía

Se determinó que la planta R1 obtenida, es doble haploide; debido a que tiene 100% de fertilidad y presenta las características morfológicas de una planta normal (diploide), (Figura 21). Cabe mencionar que esta planta R1 proviene de una generación F1 (JAPON/FED-50) con polen estéril, es decir, androestéril y al ser regenerada como doble haploide ha recuperado la fertilidad.



**Figura 21.** Floración de R1 a los 50 días después del trasplante(A); polen de planta R1 100% fértil teñido con I-KI (B); planta R1 doble haploide en fase de maduración a los 70 días después del trasplante(C); semilla de planta R1 con 100% de granos llenos.

## V. DISCUSIÓN

Al seleccionar las panículas, se debe tener en cuenta que la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas esté en un rango de 4 a 8 cm, aunque puede variar según el genotipo y las condiciones ambientales en que ella se encuentre. Esta distancia está asociada con el estado de desarrollo de las microsporas correspondiente a las fases uninucleado medio o tardío, que es el óptimo para el cultivo de anteras (Lentini, Martínez y Roca, 1997). Quintero (2003) menciona en su trabajo de tesis realizado en el CIAT, que al seleccionar las panículas para el cultivo de anteras, tomó en cuenta que la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas estuviera en un rango de 3 a 5 cm. En el presente estudio la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas, asociada con el estado de desarrollo de las microsporas correspondiente a las fases uninucleado medio o tardío, estuvo en un rango de 2 a 5 cm; concordando con lo mencionado por este autor.

En este estudio los mejores resultados en la inducción de callos se obtuvo en la siembra de anteras provenientes de panículas sin tratamiento en frío, es decir, aquellas sembradas el mismo día que fueron colectadas, seguido de aquellas que fueron tratadas durante 1, 2 y 3 días a 13°C. No se obtuvo respuesta a la inducción de callos de aquellas panículas que fueron sometidas al tratamiento en frío por más de 3 días; difiriendo con Genovesi y Magill (1979) quien ha obtenido una máxima inducción de callos durante 10 a 14 días a 13°C; con Hu (1978) quien obtuvo un 10% de inducción de callos en anteras tratadas durante 4 a 8 días a 10°C y un 2% en anteras no tratadas; con Trejo *et al.* (2002) quien determinó que el tratamiento óptimo de las panículas previo a la siembra de las anteras es a 4°C durante 7 días; y Lentini, Martínez y Roca (1997) quienes indican que la inducción óptima se consigue con un pretratamiento de 8 a 10°C durante 7 días. Probablemente las condiciones de cultivo de las anteras en los diferentes medios de cultivo promovieron la formación de callos cuando se utilizaron anteras frescas, en contraste con las anteras almacenadas hasta por 10 días que posiblemente sufrieron una etapa de deshidratación y estrés que influyeron en la poca o nula formación de microcallos.

Los primeros callos se observaron alrededor de los 30 días de cultivo y la proliferación se dio entre los 45 y 50 días; para entonces su tamaño estuvo de 2 a 3 mm de diámetro, siendo este el momento indicado para transferirlos al medio de regeneración, lo que coincide con Lentini, Martínez y Roca (1997) y Quintero (2003), quienes expresan que los callos empiezan aparecer alrededor de los 20 días de cultivo y alcanzan una inducción masiva entre los 40 y 50 días.

En el presente estudio el AFA fue un factor determinante en la inducción de callos. Cuando se usó esta auxina en el medio de cultivo a una concentración de 10 mg/L, se obtuvo una inducción masiva de callos, mientras que en los medios sin AFA la inducción fue relativamente baja. En relación a estos resultados, se concuerda con Quintero (2003) quien manifiesta que el AFA a una concentración de 10 mg/L, reduce el tiempo e incrementa la inducción de callos esencialmente en las variedades recalcitrantes. Sin embargo, se difiere con los resultados obtenidos por Lentini, Martínez y Roca (1997) quienes mencionan que el ácido fenilacético (AFA) en concentraciones de 2, 5, 10, 20, 50 y 100 mg/L inhibe significativamente la inducción de callos.

Para la diferenciación de plantas, a partir de callos de anteras de arroz, el medio MS es el más utilizado; en el CIAT se emplea este medio con callos que provienen de los distintos medios de inducción (Lentini, Martínez y Roca, 1997). En esta investigación también se utilizó este medio de cultivo, pero la regeneración de plantas fue mínima. Es probable que dependa de los genotipos utilizados o que para la conversión de los microcallos en plantas completas se necesiten otros componentes hormonales.

En el presente estudio se regeneraron seis plantas, de las cuales solamente una se desarrolló totalmente verde lográndose estimar que sus granos de polen fueron 100% fértiles, produciendo una panícula sin granos vanos. Sin embargo; cinco fueron plantas albinas y de acuerdo a la mencionado por Chen (1977) y Sun (1978), en arroz, la formación de embriones es posible si las anteras se cultivan cuando sus granos de polen están en el estado uninucleado (temprano, medio o tardío), pero ello no ocurre cuando se cultivan granos binucleados; además, en este último caso la mayoría de las plantas regeneradas son albinas.



## VI. CONCLUSIONES

Se puede inducir callogénesis a partir de anteras provenientes de plantas cultivadas en invernadero o en campo abierto, en nuestras condiciones ambientales cuando se utilizó anteras de plantas cultivadas en invernadero la inducción de callos fue mayor.

Las microsporas en estado uninucleado medio o tardío se encuentran en panículas que están en estado de embuchamiento, cuando la hoja bandera ha emergido y la distancia entre la aurícula de esta hoja y la aurícula de la hoja anterior está en un rango de 2 a 5 cm. En las variedades de arroz pequeñas el estado uninucleado se encuentra cuando la longitud entre las aurículas esta próxima a los 2 cm; y en las variedades grandes cuando la longitud se encuentra próxima a los 5 cm. En este estudio cuando se cultivaron anteras provenientes de panículas con mayor madurez fisiológica, no se obtuvo formación de callos.

No se obtuvo inducción de callos cuando se sometieron las panículas al tratamiento en frío por más de 3 días. Los mejores resultados se obtuvieron cuando se cultivaron anteras sin tratamiento en frío a 13°C.

En la inducción de callos, el medio L7 dio la mejor respuesta. Este medio es una variante del medio M1; se esterilizó mediante filtración para evitar la degradación y precipitación de sus componentes que ocurre al ser autoclavado, y se enriqueció con agua de coco.

En la regeneración de plantas no se obtuvo resultados favorables, a excepción de pocos casos, muchos de los callos murieron una vez transferidos al medio de regeneración MS, modificado por el CIAT. Es probable que las causas sean el genotipo, el tipo de callo y/o el medio de cultivo.

Mediante esta técnica se ha podido conseguir un material doble haploide homocigótico en un ciclo de cultivo *in vitro* a partir de una generación F1 (JAPON/FED-50).

## **VII. RECOMENDACIONES**

Determinar protocolos para ajustar la fase de regeneración a partir de microcallos, sugiriéndose transferir los callos a un medio MS para regeneración de plantas sin hormonas, con el fin de “lavar” restos de estas, luego transferirlos al MS con hormonas hasta diferenciación de órganos y finalmente para el desarrollo foliar y radical, pasarlos al MS sin hormonas adicionando carbón activado.

## RESUMEN

Esta investigación apunta a la generación de líneas homocigóticas doble haploides de arroz mediante la inducción de androgénesis a través del cultivo de anteras. Se realizó en la Estación Experimental del Litoral Sur “Dr. Enrique Ampuero Pareja” del INIAP, ubicada en las coordenadas geográficas 2° 15' 15" latitud Sur y 79° 30' 40" de longitud Occidental en el km. a 17 msnm, precipitación promedio anual de 1342,0 mm , 81% de humedad relativa media, y temperaturas promedio de 25.1°C.

El estudio se estableció con 40 generaciones F1 obtenidas a través de cruces simples. Previo a la siembra de las anteras se analizó el estado de desarrollo de las panículas en relación al estado de desarrollo de las microsporas. Se estudiaron los factores que inciden en el cultivo de anteras tales como: genotipo (40 generaciones F1), ambiente de cultivo de las plantas donantes de anteras (campo abierto e invernadero), tratamiento en frío de las panículas (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 y 10 días a 13°C), y medios de cultivo (Inducción de callos: L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 y M1; Regeneración de plantas: MS modificado).

Se determinó que las microsporas en estado uninucleado medio o tardío, óptimo para el cultivo de anteras, se encuentran en panículas que están en etapa de embuchamiento; cuando la hoja bandera ha emergido y la distancia entre la aurícula de esta hoja y la aurícula de la hoja anterior está en un rango de 2 a 5 cm.

De los genotipos utilizados, 31 respondieron a la inducción de callos, mientras 9 de ellos no; la mayor formación de callos se dio en los cruces: GO-38016/SPA-2707; SPA-2707/GO-38007; GO-38793/GO-38063, con 80, 116 y 180 callos/100 anteras respectivamente.

Cuando se utilizaron anteras de plantas cultivadas en invernadero se obtuvieron 107 callos/100 anteras vs. 90 callos/100 anteras cuando provenían de campo abierto.

No se obtuvo inducción de callos cuando se sometieron las panículas al tratamiento en frío a 13°C por más de 3 días, mientras que los mejores resultados se lograron cuando se cultivaron anteras sin dicho tratamiento, llegando a obtener en promedio hasta 137 callos/100 anteras.

La mejor respuesta a la inducción de callos se presentó con el medio L7, siendo una modificación del medio M1 (2 g/L de 2,4-D, 10 g/L de AFA, 0.5 mg/L de Cinetina, 80 g/L de maltosa y pH 5.8 antes del autoclavado); el cual se modificó adicionando 100 mL/L de agua de coco y la forma de esterilización, lo que se realizó mediante filtración con filtros de 0.22 micras; dando un promedio de 113 callos/100 anteras.

En la regeneración de plantas se obtuvieron pocos resultados, obteniéndose plantas regeneradas solo con el cruce JAPON/FED-50. La mayoría de los callos murieron una vez transferidos al medio de regeneración MS (1 mg/L de ANA, 4 mg/L de Cinetina, 30 g/L sacarosa, pH 5.8, 3 g/L Gellan Gum).

Mediante esta técnica se ha podido conseguir un material doble haploide homocigótico en un ciclo de cultivo *in vitro* a partir de la generación F1 JAPON/FED-50. El nivel de ploidía se estimó tomando en cuenta que posee 100% de fertilidad y presenta las características morfológicas de una planta normal (diploide); considerando que las plantas haploides ( $n = x$ ) son pequeñas, débiles, con problemas de crecimiento y estériles, las doble haploides ( $n = 2x$ ) son plantas fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla y las poliploides generalmente muestran un mayor crecimiento, con estructuras florales más desarrolladas, granos con aristas largas y parcialmente estériles.

## SUMMARY

This research aims to generate doubled haploid homozygous lines of rice across the induction of androgenesis through anther culture. This research performed at the Experimental Station of the South Coast "Dr. Enrique Ampuero Pareja", INIAP; located at the geographic coordinates 2°15'15" south latitude and 79°30'40" west longitude at. 26 km to 17 meters above the sea level, average annual rainfall of 1342.0 mm, 81 % relative humidity and average temperatures of 25.1°C.

The investigation was established with 40 generations F1 obtained by single crosses. Prior to planting the anthers the state of development of panicle in relation to the state of development of microspores were analyzed. The factors that affect anther culture such as genotype (40 generations F1), culture environment of the anther donor plants (open field and greenhouse), cold treatment in panicles (0, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 and 10 days at 13°C), and culture media (Callus induction: L1, L2, L3, L4, L5, L6, L7 and M1; Regeneration of plants: MS modified) were studied.

Uninucleate microspores in middle or late state optimal for anther culture were in panicles booting stage when the flag leaf has emerged and the distance between the atrium of this sheet and the atrium of the previous sheet is in a range of 2 to 5 cm.

Thirty one of the genotypes responded to callus induction, even though nine of them not, the greatest callus formation occurred in the crosses: GO-38016/SPA-2707; SPA-2707/GO-38007, GO-38793 / GO-38063, with 80, 116 and 180 callus/100 anthers, respectively.

When using anthers of greenhouse-grown plants were obtained 107 callus/100 anthers vs. 90 callus/100 anthers that came from open field.

No induction of callus was obtained when the panicles were subjected to cold treatment at 13°C for more than 3 days, whereas the best results were achieved when cultured anthers without that treatment, obtaining average 137 callus/100 anthers.

The best response to callus induction occurred with the medium L7, being a modification of the medium M1 (2 mg/L of 2.4-D, 10 mg/L of AFA, 0.5 mg/L kinetin, 80 g/L of maltose and pH 5.8 before autoclaving); which modified adding 100 mL/L coconut water and the sterilizing form, by filtration with filters of 0.22 micron; giving an average of 113 callus/100 anthers.

The regeneration of plants had no favorable results with the exception of few, many of the callus died once were transferred to regeneration medium MS (1 mg / L NAA, 4 mg/L kinetin, 30 g/L sucrose, pH 5.8, 3 g/L Gellan Gum).

Through this technic homocytotic double haploid material were obtained in a cycle of *in vitro* culture from F1 generation JAPON/FED-50. The ploidy level was estimated considering 100% of fertility and morphological characteristics of diploid plant, in face of haploid plants ( $n = x$ ) are usually small, weak, stunted and sterile, the double haploid ( $n = 2x$ ) are fertile plants with a development similar to plants derived from seed and the polyploid ones generally show higher growth, more developed flower structures, grains with long awns and partially sterile.

## LITERATURA CITADA

- Jennings, P.; Coffman, W. y Kauffman, H. 1981. Mejoramiento del arroz. (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO) Cali, CO. (09SR-3) ISBN 89206-06-6, 236 p.
- CIAT. 1989. El cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. (Centro Internacional de Agricultura Tropical, CO) Contenido científico: Núñez, V.; Roca, W. y Martínez, C. Producción: Liliana Bejarano. Cali, CO. (04SR-07.02).
- CIAT. 1991. Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Roca, W. M. y Mroginski, L. A. Cali, CO. p. 280
- Chaleff, R., Hill, S. y Dunwell, J. 1981. Rice anther culture. En: John Innes Institute. Annual report. p. 64-66.
- Chen, C. C. 1977. *In vitro* development of plants from microspores of rice. *In vitro*. 13:448-489.
- Chen, C. C.; Tsay, H. S. y Huang, C. R. 1991. Factors affecting androgenesis in rice (*Oryza sativa* L.). In: Bajaj, Y. P. S. (ed.). Biotechnology in agriculture and forestry. Springer Verlag, Berlín, DE. 14: 193-215.
- Chirinos, M. 2006. Cultivo de anteras en dos clones de yuca. *Agronomía Trop.* VE. 56(4): 633-641.
- Chu, C. 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, CN. p. 43-50.
- Genovesi, A. y Magill, C. 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop. Sci.* 19:662-664.
- Ghua-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. *J. Exp. Bot.* 24:139-144.
- Hu, C. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Peking, CN. p. 87-95.
- Lentini, Z.; Mora, A.; Delgado, G.; Reyes, R.; Ortega, J.; y Ordoñez, L. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Centro Internacional de Agricultura Tropical. [http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/cultivo\\_anteras.PDF](http://webapp.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/cultivo_anteras.PDF)
- Lentini, Z.; Martínez, C.; y Roca, W. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali, CO. Centro Internacional de Agricultura Tropical (Publicación CIAT; Nº 293) ISBN 958-9439-92-6. 57 p.

Marassi, MA. 2004. Optimización del cultivo de anteras de la subespecie indica de arroz (*Oryza sativa L.*) mediante el pretratamiento con 2,4-D. Facultad de Ciencia Agrarias, UNNE. Sargento Cabral 2131, 3400 Corrientes 1 p. <http://agr.unne.edu.ar/Extension/Res2004/Biotecnologia/Biotec-008.pdf>

Niizeki, H. y Oono, K. 1968. Induction of haploid rice plan from anther culture. Proc. Jap. Acad. 44:554-557.

Nitsch, C., 1974. Pollen culture: A new technique for mass production of haploid and homozygous plants. En: Kasha, K. J. (Ed.). Haploids in higher plants: Advances and potential. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canada. p. 123-135.

Pérez A, I. 2004. Aplicaciones Biotecnológicas en el Mejoramiento del Arroz. [http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas\\_tec/ceniaphoy/articulos/n6/arti/perezalmeida\\_i/arti/perez\\_almeida\\_i.htm#HOY](http://sian.inia.gob.ve/repositorio/revistas_tec/ceniaphoy/articulos/n6/arti/perezalmeida_i/arti/perez_almeida_i.htm#HOY)

Quintero M., MA. 2003. Ajuste del Sistema Rita® para la Inducción de Callo Embriogénico y Regeneración de Plantas a partir del Cultivo de Anteras de Arroz. Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, CO 107 p.

Ramírez, R.; Borodanenko, A.; Neftalí, A.; Pérez, L.; Barrera, J. y Núñez, H. 2007. Efecto del genotipo, ambiente y ácido húmico en el cultivo in vitro de anteras de trigo. Revista Fitotecnia Mexicana, 3(2): 159-165.

Suárez C., E., 2006. Principios del mejoramiento genético en el arroz. In: Curso de capacitación en mejoramiento genético en arroz. Sancti Spiritu, CU. <http://agr.unne.edu.ar/fao/Cuba-pt/1MEJORAMIENTO%20GENeTICO.pdf>

Sun, C. S. 1978. Androgenesis of cereal crops. In: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, CN. p. 117-123.

Sunderland, N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. En: Proceedings of a Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Beijing, CN. p. 65-86.

Sunderland, N. y Roberts, M. 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. Ann. Bot. 43:405-414.

Trejo, G.; Maldonado, U.; Jiménez, A.; Blanqueto, M.; Salcedo, G.; Martínez, B. y Sanchez, A. 2002. Efecto del tiempo de exposición a baja temperatura y de reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz *Oryza sativa L.* (cultivar japónica H2005). Texcoco, MX. Agrociencia. 36(4): 441-449.

Universidad Nacional del Nordeste. 2008. Ciclo de vida del arroz cultivado *in vitro*. <http://www.biologia.edu.ar/botanica/animaciones/ciclos/arroz/ciclo%20invitro/paginas/texto-cinvit.html>



Velásquez S., R.; Noguera A., A.; Blanca, I. y Mata C., J. 2010. Evaluación de dos metodologías para la determinación del nivel de ploidía en plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) regeneradas por cultivo de anteras. Rev. Fac. Agron. (UCV) 36(1): 1-6.

Wernichke, W. C. y Kohlenback, H. W. 1976. Investigations on liquid medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol. 79:189-198.

Zapata, F.; Torrizo, L.; Romero, R. y Alejar, M. 1982. Androgenesis in *Oryza sativa*. En: Fujiwara, A. (ed.). Proceedings of the Fifth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture. Tokyo, JP. p. 531-532.

## ANEXOS

**Anexo 1.** Medios de cultivo utilizados en la inducción de callos y regeneración de plantas

COMPONENTES (mg/L)	L1	L2	L3	L4	L5	L6	L7	M1	MS
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-----	-----	-----	-----	232	232	232	232	-----
KNO <sub>3</sub>	1900	1900	1900	1900	3134	3134	3134	3134	1904
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	370	370	370	186	186	186	186	368
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	51,04	51,04	51,04	51,04	150	150	150	150	435
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1662,5	1662,5	1662,5	1662,5	-----	-----	-----	-----	1648
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2	6,2	6,2	6	6	6	6	6,2
MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9	16,9
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	10,5	10,5	10,5	10,5	10	10	10	10	8,6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-----	-----	-----	-----	0,25	0,25	0,25	0,25	0,25
H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,5	0,5	0,5	0,5	-----	-----	-----	-----	-----
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,5	0,5	0,5	0,5	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025
CoCl <sub>2</sub>	0,05	0,05	0,05	0,05	0,014	0,014	0,014	0,014	0,014
KI	0,8	0,8	0,8	0,8	1	1	1	1	0,83
Tiamina-HCl	1	1	1	1	2,5	2,5	2,5	2,5	0,1
Acido nicotínico	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5
Piridoxina-HCl	0,5	0,5	0,5	0,5	2,5	2,5	2,5	2,5	0,5
Glicina	2	2	2	2	2,5	2,5	2,5	2,5	2
Arginina	0,0125	0,0125	0,0125	0,0125	-----	-----	-----	-----	-----
Biotina	1,7	1,7	1,7	1,7	-----	-----	-----	-----	-----
Acido ascórbico	50	50	50	50	-----	-----	-----	-----	-----
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170	170	170	540	540	540	540	168
Na <sub>2</sub> EDTA	37,4	37,4	37,4	37,4	37,5	37,5	37,5	37,5	37,5
Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8	27,8	27,8	27,5	27,5	27,5	27,5	27,5
Myo-Inositol	100	100	100	100	-----	-----	-----	-----	100
2,4-D	2	4	6	8	2	2	2	2	-----
AFA	-----	-----	-----	-----	-----	10	10	10	-----
ANA	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	-----	1
AIA	0,05	0,05	0,05	0,05	-----	-----	-----	-----	-----
Cinetina	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	4
Maltosa	-----	-----	-----	-----	80000	80000	80000	80000	-----
Sacarosa	30000	30000	30000	30000	-----	-----	-----	-----	30000
Agua de coco (mL)	100	100	100	100	-----	-----	100	-----	-----
Ph	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8	5,8
Gellan gum	3000	3000	3000	3000	-----	-----	-----	-----	3000
Estado	Solido	Solido	Solido	Solido	Liquido	Liquido	Liquido	Liquido	Solido
Esterilización	Autoc	Autoc	Autoc	Autoc	Autoc	Filtr	Filtr	Autoc	Autoc

**Anexo 2.** Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo M1, para la inducción de callos. (Fuente: CIAT)

SOLUCIÓN	COMPONENTES	CANTIDAD (mg)	H <sub>2</sub> O (mL)	SOLUCIÓN STOCK/LITRO DE MEDIO (mL)	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS
1	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> KNO <sub>3</sub> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	2320 31340 1860 1500	1000	100	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración máximo un mes
2	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> KI	25 600 1690 1000 2,5 1,4 100	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O se disuelve previamente en 1 mL de agua destilada y deionizada, de igual forma se disuelve CoCl <sub>2</sub> antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
3	Tiamina-HCl Acido nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	125 125 125 125	50	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Cuando al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante 1 ó 2 meses, en refrigeración.
4	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	5400	100	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses.
5	Na <sub>2</sub> EDTA Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	750 550	100	5	Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven por separado en agua destilada y deionizada, el Na <sub>2</sub> EDTA y el Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, en la cuarta parte del volumen final de la solución, al disolver el Na <sub>2</sub> EDTA se debe calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agitan bien y se deja enfriar, para luego completar con el agua el volumen final. La solución se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente, donde puede mantenerse hasta por 5 meses.

6	2,4-D	50	100	4	La solución 2,4-D se prepara adicionando los 50 mg del compuesto a 5 mL de etanol de 50% calentado levemente al baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 100 mL, con agua previamente calentada a la misma temperatura. Almacenar en refrigeración.
7	AFA	100	100	10	Disolver 100 mg de AFA en 50 mL de agua destilada, calentar suavemente, ajustar el volumen final a 100 mL con agua destilada y filtrar utilizando filtros de 0,22 micras; debe hacerse en cámara con extractor de aire. Almacenar en refrigeración en frasco oscuro.
8	Cinetina	100	100	0,5	La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 100 mg del compuesto en aproximadamente 5 mL de HCl 0,5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 100 mL. Esta solución se divide en alícuotas de aproximadamente 10 mL cada una, para almacenar en el congelador a 0°C. Antes de usar cada alícuota se debe descongelar en baño de María, y el remanente se almacena a 4°C (refrigerador) por un máximo de 1 mes.

Preparación de 1 litro de medio M1 para inducción de callos:

1. Colocar 500 mL de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio
2. Adicionar las cantidades de las soluciones madres, siguiendo el mismo orden y con agitación continua; excepto el AFA.
3. Adicionar 80 g de maltosa
4. Completar el volumen a 1 litro
5. Ajustar el pH a 5,8
6. Esterilizar el medio en un autoclave a 122 °C de temperatura y 20 psi de presión, durante 15 minutos
7. Enfriar, adicionar el AFA en cámara (esterilizado con filtro 0,22 micras), dispensar y almacenar en refrigeración, donde puede permanecer hasta por 2 meses

**Anexo 3.** Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo L1, para la inducción de callos.

SOLUCIÓN	COMPONENTES	CANTIDAD (mg)	H <sub>2</sub> O (mL)	SOLUCIÓN STOCK/LITRO DE MEDIO (mL)	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS
1	KNO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	38000 33250 3400 7400	500	25	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 1 meses
2	MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O H <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> CoCl <sub>2</sub>	1690 620 50 1050 50 5	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O se disuelve previamente en 1 mL de agua destilada y deionizada, de igual forma se disuelve CoCl <sub>2</sub> antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
3	Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA	278 374	100	10	Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven por separado en agua destilada y deionizada, el Na <sub>2</sub> EDTA y el Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, en la cuarta parte del volumen final de la solución. Al disolver el Na <sub>2</sub> EDTA se debe calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agitan bien y se deja enfriar, para luego completar con el agua el volumen final. La solución se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente, donde puede mantenerse hasta por cinco meses.
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1760	100	2,9	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por cinco meses.
5	KI	20	25	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por un meses

6	Acido nicotínico Piridoxina Thiamina Glicina Arginina Biotina	50 50 100 200 1,25 170	1000	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Cuando al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante uno ó dos meses, en refrigeración.
7	Acido Indol Acético	25	1000	2	La solución AIA se prepara adicionando los 25 mg del compuesto a 2.5 mL de etanol al 50% calentado levemente al baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 1000 mL, con agua previamente calentada a la misma temperatura. Almacenar en refrigeración.
8	Cinetina	25	100	2	La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 25 mg del compuesto en 1 mL de HCl 0.5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 100 mL. Almacenar en refrigeración.
9	2,4-D	25	25	1	La solución 2,4-D se prepara adicionando los 25 mg del compuesto a 2.5 mL de etanol al 50% calentado levemente al baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 100 mL, con agua previamente calentada a la misma temperatura. Almacenar en refrigeración.

Preparación de 1 litro de medio MS para inducción de callos:

1. Colocar 500 mL de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio
2. Adicionar las cantidades de las soluciones madres, siguiendo el mismo orden y con agitación continua
3. Adicionar 100 mg de Myo-Inositol
4. Adicionar 50 mg de Acido Ascórbico
5. Adicionar 30 g de sacarosa
6. Adicionar 100 mL de agua de coco
7. Completar el volumen a 1 litro, Ajustar el pH a 5.8 y adicionar 3 g de Gellan Gum
8. Esterilizar el medio en un autoclave a 122 °C de temperatura y 20 psi de presión , durante 15 minutos
9. Dispensar en cámara de flujo, enfriar y almacenar en refrigeración, donde puede permanecer hasta por 2 meses

**Anexo 4.** Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo MS, para regeneración de plantas. (Fuente: CIAT)

SOLUCIÓN	COMPONENTES	CANTIDAD (mg)	H <sub>2</sub> O (mL)	SOLUCIÓN STOCK/LITRO DE MEDIO (mL)	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS
1	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> KNO <sub>3</sub> MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	82400 95200 18400 8400	1000	20	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 1 meses
2	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub>	25 620 1692 860 2.5 1.4	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O se disuelve previamente en 1 mL de agua destilada y deionizada, de igual forma se disuelve CoCl <sub>2</sub> antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
3	KI	83	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
4	CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	1500	100	29	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
5	Na <sub>2</sub> EDTA Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	750 550	100	5	Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven por separado en agua destilada y deionizada, el Na <sub>2</sub> EDTA y el Fe <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O, en la cuarta parte del volumen final de la solución. Al disolver el Na <sub>2</sub> EDTA se debe calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agitan bien y se deja enfriar, para luego completar con el agua el volumen final. La solución se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente, donde puede mantenerse hasta por 5 meses
6	Tiamina-HCl Acido nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	10 50 50 200	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Cuando al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante 1 ó 2 meses, en refrigeración.
7	myo-Inositol	5000	500	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 2 meses

8	ANA	200	200	1	La solución de ácido naftalenacético (ANA) se prepara disolviendo 200 mg del compuesto en aproximadamente 5 mL de KOH 0,5 N. Luego se calienta a temperatura baja hasta disolver y se completa con agua el volumen final a 200 mL. Es aconsejable preparar esta solución semanalmente.
9	Cinetina	500	500	4	La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 500 mg del compuesto en aproximadamente 25 mL de HCl 0.5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 500 mL. Esta solución se divide en alícuotas de aproximadamente 10 mL cada una, para almacenar en el congelador a 0°C. Antes de usar cada alícuota se debe descongelar en baño de María, y el remanente se almacena a 4°C (refrigerador) por un máximo de 1 mes.

Preparación de 1 litro de medio MS para regeneración de plantas:

1. Colocar 500 mL de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio
2. Adicionar las cantidades de las soluciones madres, siguiendo el mismo orden y con agitación continua
3. Adicionar 30 g de sacarosa
4. Completar el volumen a 1 litro
5. Ajustar el pH a 5.8
6. Adicionar 3 g de Gellan Gum
7. Esterilizar en un autoclave a 122°C de temperatura y 20 psi de presión , durante 15 minutos
8. Dispensar en cámara de flujo, enfriar y almacenar en refrigeración, donde puede permanecer hasta por 2 meses