

OBTENCIÓN DE GAMETOCIONES DERIVADOS DE PLANTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) MEDIANTE EL CULTIVO DE ANTERAS DE HÍBRIDOS Y VARIEDADES

Elizabeth Cristo[✉], María C. González y Ana V. Pérez

ABSTRACT. This work was developed in the laboratory of Biotechnology from “Los Palacios” Rice Research Station, belonging to the National Institute of Agricultural Sciences (INCA), from March to July, 2000 and 2001. Anthers of the genotypes J-104, Perla de Cuba, Amistad 82, INCALP-10, IR-36, IR-42, Amistad-82/C4 153, Amistad-82/IR-36, Amistad-82/IR-20, INCALP-10/C4 153, 8073/C4 153 and INCALP-10/Amistad-82 were disinfected and sown *in vitro* in a N_{6-1} culture medium. The formed calluses were transferred to a regeneration culture medium containing Murashige and Skoog mineral salts, as well as 1 mg.L^{-1} of NAA, 4 mg.L^{-1} Kinetine and 2 mg.L^{-1} of IAA. The percentage of calluses formed with buds, as well as the percentage of green plants and regenerated albino plants were determined, obtaining differences as for the *in vitro* answer of anthers, standing out the hybrid combinations INCALP-10/C4 153, Amistad-82/C4 153 and INCALP-10 as well as Amistad-82 varieties during green plant regeneration.

Key words: rice, anther culture, genotypes, callus, revegetation, *in vitro* experimentation

RESUMEN. El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios”, perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) desde marzo hasta julio del 2000 y 2001. Anteras de los genotipos J-104, Perla de Cuba, Amistad 82, INCALP-10, IR-36, IR-42, Amistad-82/C4 153, Amistad-82/IR-36, Amistad-82/IR-20, INCALP-10/C4 153, 8073/C4 153 e INCALP-10/Amistad-82 fueron desinfectadas y sembradas *in vitro* en un medio N_{6-1} . Los callos formados fueron transferidos a un medio de regeneración que contenía las sales minerales de Murashige y Skoog, así como 1 mg.L^{-1} de ANA, 4 mg.L^{-1} de Kinetina y 2 mg.L^{-1} de AIA. Se determinaron el porcentaje de callos con brotes, así como el porcentaje de plantas verdes y plantas albinas regeneradas, obteniéndose diferencias en cuanto a la respuesta *in vitro* de las anteras de los genotipos, destacándose en la regeneración de plantas verdes las combinaciones híbridas INCALP-10/C4 153, Amistad-82/C4 153 y las variedades INCALP-10 y Amistad-82.

Palabras clave: arroz, cultivo de anteras, genotipos, callos, regeneración vegetal, experimentación *in vitro*

INTRODUCCIÓN

La importancia de los haploides en los campos de la genética y el mejoramiento de las plantas ha sido verificada por largo tiempo. No obstante, su explotación ha permanecido restringida por la baja frecuencia con la que ellos ocurren en la naturaleza (usualmente 0.001-0.01 %). Además, los haploides son de gran importancia especialmente en estudios sobre la inducción de mutaciones y también para la producción de plantas homocigóticas (1).

Los primeros en regenerar plantas con esta técnica en arroz fueron Niizeki y Oono (2) y desde entonces el cultivo de anteras (CA) ha sido utilizado exitosamente en el mejoramiento de este cereal, generando más de 80 variedades en Asia y Estados Unidos (2).

Sin embargo, la implementación de esta técnica como una herramienta rutinaria en el programa de mejo-

ramiento ha sido lenta, principalmente porque la respuesta depende del genotipo utilizado (1).

La producción de haploides de arroz a través del cultivo de anteras tiene importantes aplicaciones en el mejoramiento de este cereal. La duplicación del complemento cromosómico del material haploide es un método rápido para inducir homocigosis, así como el acortamiento del tiempo requerido en el desarrollo de la nueva variedad. Además, los haploides expresan los genes recesivos que llegan a ser fijados cuando el complemento cromosómico es duplicado (3, 4).

Las variaciones estacionales en la respuesta de las anteras han sido reconocidas entre plantas donantes desarrolladas en diferentes estaciones, las cuales pueden ser atribuidas a diferencias en el estado fisiológico de las plantas donantes, causadas por variaciones ambientales tales como: temperatura, fotoperíodo, intensidad de la luz; etc. (4).

El crecimiento de la producción de arroz ha dependido, casi exclusivamente, de los métodos tradicionales de mejoramiento; sin embargo, los avances logrados en la Biotecnología representan nuevas herramientas de investigación, con las cuales el fitomejorador podrá desarrollar mejores variedades que aseguren una alta y estable producción (5).

Ms.C. Elizabeth Cristo, Investigadora Agregada de la Estación Experimental del Arroz “Los Palacios”; Dra.C. María C. González, Investigadora Titular del Departamento de Genética y Mejoramiento Vegetal, Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA), Gaveta Postal 1, San José de las Lajas, La Habana, CP 32 700; Ms.C. Ana V. Pérez, Investigadora Auxiliar del Instituto de Investigaciones del Arroz (COCA), La Habana.

✉ ecristo@inca.edu.cu, ecristo70@yahoo.com

El cultivo de células y tejidos haploides garantiza la homocigosis en una sola generación y, por ende, reduce considerablemente el ciclo de mejora. Esto se puede lograr mediante el cultivo de anteras (4, 6).

Con el cultivo de anteras se han logrado obtener un gran número de variedades con alto potencial productivo, buenas características culinarias, resistentes a las bajas temperaturas y al virus *Stripe*, así como a la salinidad (7, 8). Teniendo en cuenta la problemática existente y dada la importancia que tiene para nuestra agricultura la obtención y evaluación de variedades, el presente trabajo tuvo como objetivo lograr el gametoclón de arroz mediante el cultivo de anteras de híbridos y variedades de arroz.

MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se desarrolló en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental del Arroz "Los Palacios", perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA); el esquema general del trabajo empleado para la obtención de gametoclón se encuentra reflejado en la Figura 1.

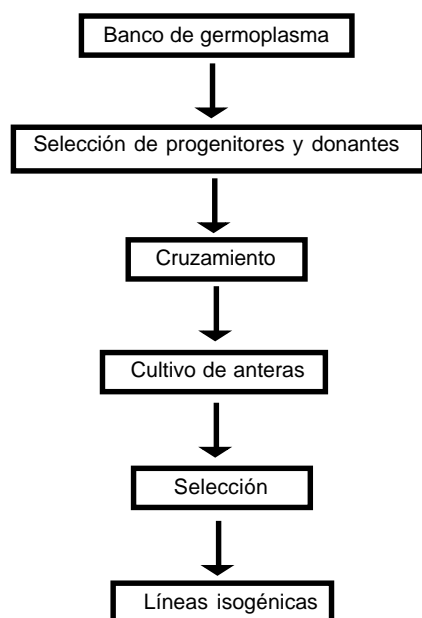


Figura 1. Esquema del procedimiento metodológico para la obtención de nuevas líneas de arroz

La selección de panículas para anteras se realizó a los 60 ó 70 días (de acuerdo con el ciclo del material genético), después del trasplante en la etapa de embuchamiento, la que se caracteriza por la diferenciación de las espiguillas en la inflorescencia y su crecimiento dentro de la vaina de la hoja bandera. Se seleccionaron las mejores plantas y de ellas se tomaron de dos a tres panículas, teniendo en cuenta su estado fitosanitario. En el laboratorio se esterilizaron externamente con etanol 70 % y se conservaron protegidas con una bolsa plástica oscura a temperatura de 8 a 10°C durante siete-ocho días.

Las anteras de los genotipos Perla de Cuba, Amistad 82, J-104, INCA LP-10, IR-36, IR-46, Amistad-82/C4153, Amistad-82/IR-36, Amistad-82/IR-20 e INCA LP-10/C4153, fueron desinfectadas durante tres minutos con lejía comercial al 50 % y Tween 80 como agente dispersante; luego se lavaron cuatro o cinco veces con agua destilada estéril y se sembraron *in vitro* (Figura 2), cultivándose hasta 50 flores/frasco, teniendo en cuenta que por cada flor caen cuatro y cinco anteras. Se sembraron de 150 a 200 anteras/frasco en cada tratamiento, según la metodología propuesta por el Centro Internacional de Agricultura Tropical (9); los frascos contenían 10 mL del medio de cultivo N₆₋₁ para la inducción de callos (10). Después de sembradas las anteras se mantuvieron en ausencia de luz a temperaturas entre 24 y 27°C durante 30 a 60 días. Se evaluó el número de callos formados.

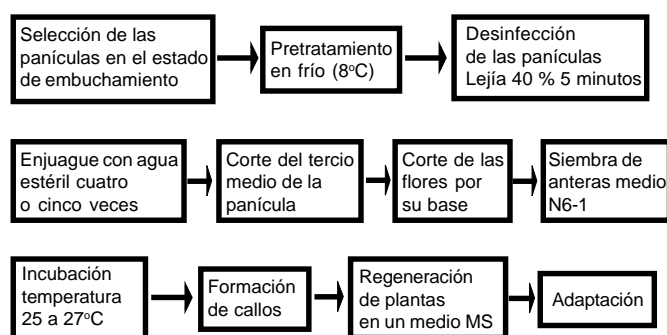


Figura 2. Metodología empleada para la siembra de anteras

Los callos formados alcanzaron un tamaño de 1 a 2 mm, apropiados para transferirlos al medio MS de regeneración que contenía las sales minerales de MS (11), así como 1 mg.L⁻¹ de ANA, 4 mg.L⁻¹ de Kinetina y 2 mg.L⁻¹ de AIA. Se determinó el porcentaje de callos con brotes, así como el porcentaje de plantas verdes y albinas regeneradas.

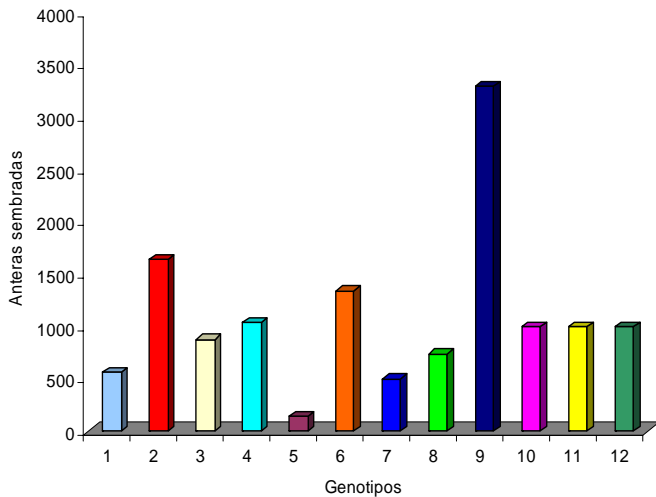
La temperatura de incubación debe estar entre 24 y 36°C y un fotoperíodo de 16 horas luz y 8 oscuridad.

Se utilizó un diseño completamente aleatorizado con cuatro repeticiones y los datos fueron procesados por un análisis de comparación de proporciones.

Para la adaptación de las plántulas a condiciones *ex vitro*, a los 30 ó 40 días se retiraron del frasco para lavar con agua sus raíces y eliminar residuos de callos y medio de cultivo; se cortó a la mitad la lámina foliar y se sumergieron las raíces en agua por uno o dos días, todo esto en el laboratorio; luego se llevaron las plantas al invernadero, se trasplantaron en bandejas con un sustrato compuesto por una mezcla de suelo Hidromórfico Gley Nodular Ferruginoso y permanecieron a temperatura ambiente y en condiciones de iluminación reducida al 70 % mediante una malla plástica o saram para evitar deshidratación. A los ocho días se fertilizaron con fórmula completa y se pasaron posteriormente a la casa de malla en las mismas bandejas; a las dos semanas se trasplantaron al campo y recibieron el manejo apropiado del cultivo.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se apreció que en el número de anteras sembradas (Figura 3), el genotipo Amistad-82 fue el de mayor cantidad, seguido por la combinación híbrida INCA LP-10/C4 153, debido fundamentalmente a que en casi todas las combinaciones híbridas empleadas estaba como progenitor femenino y además es el donante de la variedad INCA LP-10.



- | | | |
|---------------------|---------------------|---------------------------|
| 1. J-104 | 2. INCA LP-10/C4153 | 3. 8073/C4153 |
| 4. Perla de Cuba | 5. Amistad-82/IR-36 | 6. Amistad-82/C4153 |
| 7. Amistad-82/IR-20 | 8. IR-36 | 9. Amistad-82 |
| 10. IR-42 | 11. INCA LP-10 | 12. INCA LP-10/Amistad-82 |

Figura 3. Número de anteras sembradas

En la formación de callos por 100 anteras sembradas (Figura 4), se observaron diferencias significativas en todas las combinaciones híbridas y varietales, en cuanto a la respuesta *in vitro* de las anteras, pues a pesar de que todos los genotipos empleados fueron capaces de formar callos, no lo hicieron con la misma frecuencia ni todos fueron capaces de regenerar plantas, destacándose la combinación híbrida INCA LP-10/C4153 con la mayor cantidad de callos formados, seguida por Amistad-82/IR-20 y Perla de Cuba. Algunos investigadores encontraron que las variedades de arroz varían en su habilidad de producir callos y plantas a partir del cultivo de anteras (12). Los callos que se transfirieron al medio de regeneración mostraron un crecimiento favorable, permitiendo una apariencia compacta y nodular, con una coloración cremosa y verde clara; sin embargo, los callos de las combinaciones 8073/C4 153, Amistad-82/IR-36, Amistad-82/IR-20, INCA LP-10/Amistad-82 y la variedad IR-42 se necrosaron.

Asimismo, se pueden observar diferencias significativas en los callos con brotes, destacándose la variedad Perla de Cuba con la mayor formación de callos con brotes y las de peor comportamiento fueron las combinaciones híbridas 8073/C4153, A-82/IR-36, A-82/IR-20, INCA LP-10/A-82 y la variedad IR-42; es notorio destacar que al parecer en las combinaciones donde se encontraba la variedad Amistad-82, no existió correspondencia

entre la respuesta de los genotipos en cuanto a porcentaje de callos formados y el número de callos con brotes (Figuras 4 y 5 y Foto 1), lo cual puede estar dado por la capacidad embriogénica de los callos formados (2).

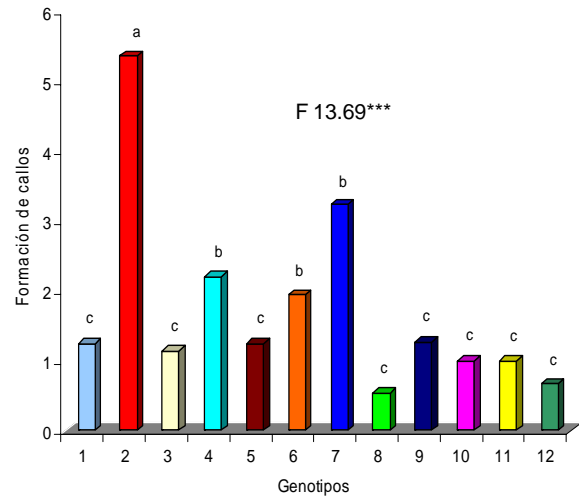


Figura 4. Formación de callos por 100 anteras sembradas

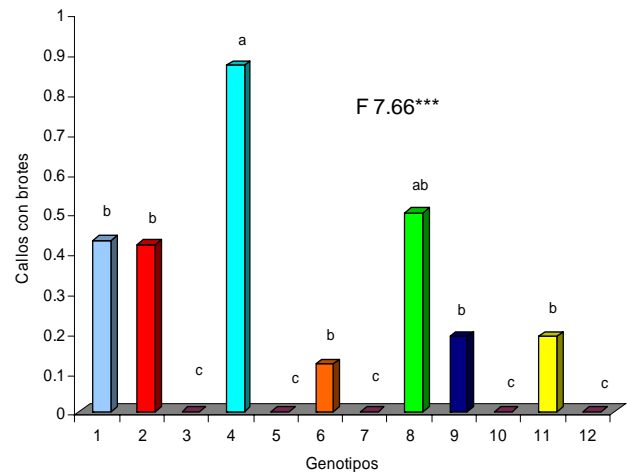


Figura 5. Callos con brotes por 100 anteras sembradas



Foto 1. Callos con brotes

En trabajos desarrollados con otros genotipos, se han encontrado diferencias en cuanto a la respuesta *in vitro* de las variedades empleadas (4, 12, 13). Además, utilizando distintos tipos de cruces entre variedades de tipo indica y japónica, se observaron diferencias en cuanto a las respuestas de estos genotipos en el porcentaje de formación de callos y callos con brotes (2).

Otro aspecto de interés fue la diferencia en cuanto al tipo de plantas regeneradas (verdes o albinas) (Figuras 6 y 7 y Fotos 2 y 3), pues se apreciaron diferencias significativas en el material obtenido; variedades como J-104, Perla de Cuba e IR-36 solamente formaron plantas albinas, mientras que otras regeneraron de ambos tipos.

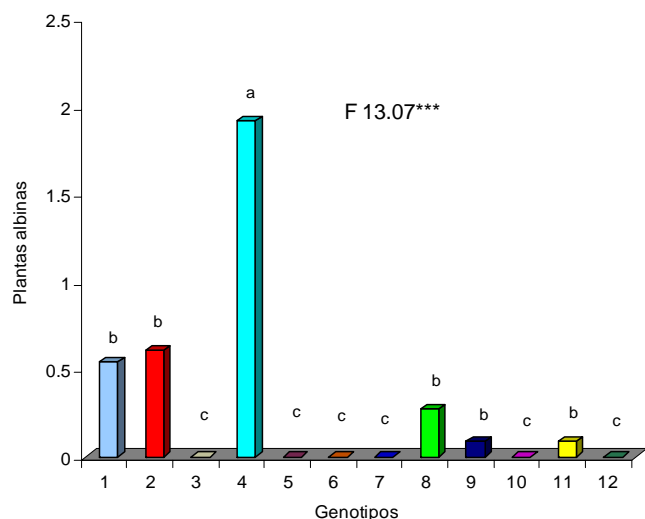


Figura 6. Formación de plantas albinas por 100 anteras sembradas

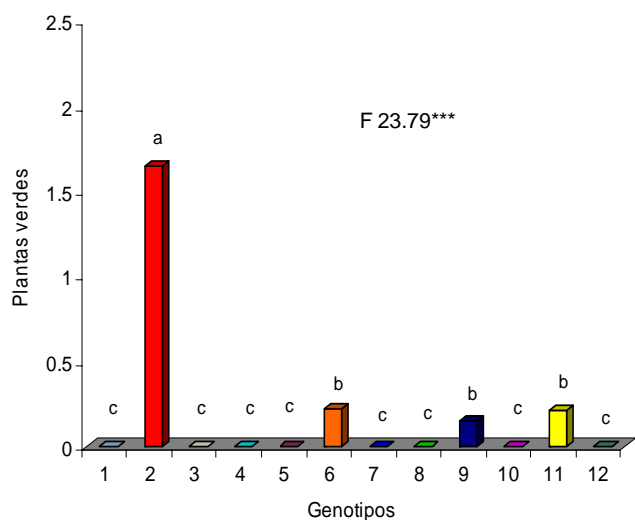


Figura 7. Formación de plantas verdes por 100 anteras sembradas

La producción de plantas albinas es un fenómeno común en el cultivo de anteras de cereales. En arroz la aparición de plantas carentes de clorofila varía con el genotipo; en algunos casos, puede obtenerse una alta tasa de regeneración de plantas, pero el porcentaje de

plantas albinas puede variar desde 10 hasta 100 % (14). De igual forma, otros encontraron que el albinismo es particularmente predominante en plantas derivadas de polen inmaduro de híbridos interéspecificos o intraespecificos entre las subespecies japónicas e índica (3).

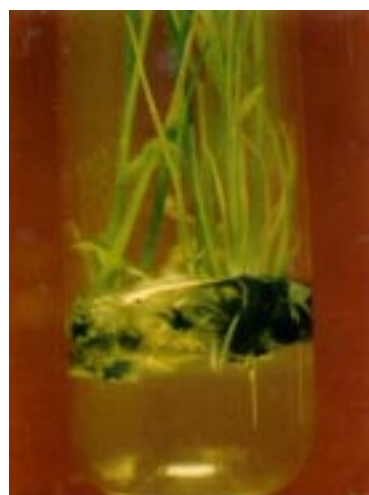


Foto 2. Plantas verdes



Foto 3. Plantas albinas

Se ha indicado que no solo existen diferencias entre las especies en las anteras, sino entre cultivares de la misma especie (15, 16), teniendo el genotipo un efecto significativo sobre la regeneración de plantas verdes. Este comportamiento puede deberse a los diferentes factores que pueden afectar la eficiencia de formación de callos y regeneración de plantas verdes en esta técnica, como son el genotipo, las condiciones físicas de crecimiento de las plantas donantes, el estado de desarrollo del grano de polen, la composición del medio de cultivo y las condiciones de cultivo: luz, temperatura, tratamientos físico y químico antes o durante el proceso (12, 14, 17).

Se informó que el genotipo es el factor que más influye en la frecuencia de la antera de producir callos y la capacidad del callo de diferenciar plantas, la producción de plantas verdes, albinas y la ploidía en las plantas re-

generadas. Mientras que es posible producir un alto número de dobles haploides de muchas variedades e híbridos de arroz de tipo japónica, la producción de callos y regeneración de plantas verdes de la mayoría de las variedades tipo índica es baja (2). Por otro lado, se ha mostrado que las variedades de arroz varían en su habilidad de producir callos y plantas de cultivo de anteras. Además, se ha planteado que el efecto del genotipo sobre el cultivo de anteras fue observado en muchos cultivares, por ejemplo, tabaco, tomate, papa, cebada y otros (13).

En cuanto a la formación de plantas verdes, se apreciaron diferencias significativas en todo el material genético, obteniendo el mejor comportamiento la combinación híbrida INCA LP-10/C4153, seguida por las variedades Amistad-82, INCA LP-10 y la combinación híbrida Amistad-82/C4153. Debe destacarse que la variedad INCA LP-10 es un somaclón de la Amistad-82, existiendo una estrecha relación genética entre ellos, lo cual puede estar asociado con la respuesta obtenida; asimismo, la variedad C4153 es del tipo japónica, la cual tiene como característica principal un buen comportamiento en las condiciones de cultivo *in vitro*, fundamentalmente cuando se emplea en el cultivo de anteras (1). Algunos plantean que para obtener una buena respuesta en las condiciones de cultivo de anteras, es necesario trabajar con cruzamientos donde uno de los progenitores sea del tipo japonico (4, 6, 17). De igual forma, otros examinaron 18 variedades de arroz en subespecie índica y dos variedades en subespecie japónica y encontraron variaciones en relación con su potencial para dar callos y embriones; aunque ellos probaron la capacidad de producir plantas en anteras cultivadas de cinco arroces japónicos y siete arroces híbridos, encontraron que la frecuencia de ambas para dar callos de anteras y plantas regeneradas varió considerablemente de una variedad a la otra (12, 14).

En cuanto a la adaptación de los gametoclonos a condiciones *ex vitro*, se pudo observar que todas las plántulas no crecieron en estas condiciones de iluminación reducida, pero muchas de ellas lograron sobrevivir, mostrando un excelente vigor inicial, una coloración verde oscura y fundamentalmente la aparición de la primera hoja nueva, lo que es un síntoma de adaptación a las condiciones semicontroladas; posteriormente se apreció que todas las plántulas no presentaban tallos fuertes y vigorosos, y algunos en la fenofase de floración no eran fértiles, a estas se les hizo un tratamiento con colchicina para duplicar su número cromosómico.

De manera general, podemos plantear que la combinación híbrida INCA LP-10/C4153 fue la de mejor comportamiento, en cuanto a la formación de callos y a la regeneración de plantas verdes, seguida por las variedades Amistad-82, INCA LP-10 y la combinación híbrida Amistad-82/C4153; las plántulas obtenidas de estos materiales mencionados que lograron sobrevivir en las condiciones de adaptación fueron cosechadas sus semillas y sembradas en condiciones de campo, para evaluar su comportamiento agronómico junto a sus progenitores y comprobar su homocigosis.

REFERENCIAS

1. Victoria, P. A. Obtención de plántulas de arroz mediante el cultivo de anteras. [Tesis de Maestría]; UH, 1997. 56 p.
2. Sangwan, R. S. Haploid plants from pollen grains: advances and potential in plant breeding. International Training Course on Application of Induced Mutations & Biotechnology for Crop Salt Tolerance Improvement. Institute of Crop Science, (2004 aug 2-6: Beijing), 2004.
3. Lynch, P. T.; Finch, R. P.; Davey, M. R. y Cocking, E. C. Rice tissue culture and its application. *Rice Biotechnology*, 1991, p. 135-147.
4. Yamagishi, N. Gametoclonal variation in anther culture-derived rice plants. II. Segregation of mutated plants at the first progeny generation. *J. Genetics Breeding*, 2002, vol. 56, no. 4, p. 303-308.
5. Suárez, E.; Deus, J. E.; Pérez, J. A.; Alfonso, R.; Hernández, J. L.; Puldón, V.; Peña, R.; Fuentes, J. L. y Duany, A. Avances y perspectivas de programa de mejoramiento genético del arroz en Cuba. IIA. En: Encuentro Internacional del Arroz: Memorias (2: 2002: La Habana), 2002, p. 74.
6. Pérez, N.; Admetlla, E. y Aguilar, M. Evaluación de líneas de arroz obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras de híbridos. *Cultivos Tropicales*, 2003, vol. 24, no. 2, p. 81- 83.
7. Zapata, F. J.; Torrizo, L. B. y Ando, A. Current development in plant biotechnology for genetic improvement: The case of rice (*Oryza sativa* L.). *World Journal of Microbiology*, 1995, vol. 11, p. 245-247.
8. Ching, Ch. Anther and microspore culture. International Training Course on Application of Induced Mutations & Biotechnology for Crop Salt Tolerance Improvement. Institute of Crop Science, (2004 aug 2-6: Beijing), 2004.
9. IRRI-CIAT, Sistema de evaluación estándar para arroz. ISBM, Cali, CIAT, 1983, 61 p.
10. Murashige, T. y Skoog, F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*, 1962, no. 15, p. 473-497.
11. Meifang, L. Anther culture breeding of rice at the CAAS. *Chinese Academy of Agricultural Science (CAAS)*, 1992, p. 75-86.
12. Rodríguez, Y.; González, M. C. y Verde, G. Determinación de indicadores simples para la selección de anteras con alta capacidad androgenética en tres variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). *Temas de Ciencia y Tecnología. Revista de la Universidad Tecnológica de la Mixteca*, 2004, vol. 8, no. 22, p. 9-17.
13. Victoria, A. P.; Morales, L. y Verde, G. Resultados obtenidos con la técnica de rescate de embrión entre las especies *O. sativa* (2N) y *O. latifolia* (4N) en el IIA, Cuba. IIA. En: Encuentro Internacional del Arroz: Memorias (2: 2002:La Habana), 2002. p. 67-70.
14. Cristo, E. y González, M. C. Androgénesis *in vitro* de híbridos y variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 2000, vol. 20, no. 4, p. 21-22.
15. Mandal, N. Androgenesis in rice breeding. International Rice Research Notes. *IRRI*, 1995, vol. 20, no. 3, p. 6-7.
16. Huijun, H. *et al.*. Factors influencing anther culture of indica rice. *Rice Abstracts*, 1999, vol. 22, no. 2, p. 114.
17. Jain, M. J. y Maluszynski, M. Induced mutations and biotechnology in improving crops. En: *In vitro* application in crop improvement. *Science Publishers*, 2004. 200 p.

Recibido: 24 de marzo de 2005

Aceptado: 3 de abril de 2006