

OBTENCION DE LINEAS HOMOCIGOTAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) TOLERANTES A LA TOXICIDAD DE ALUMINIO UTILIZANDO EL CULTIVO DE ANTERAS

Victor M. Nuñez Z.*

Cesar P. Martinez **

Javier Narvaez V. **

William Roca **

COMPENDIO

Se evaluaron 24 variedades de arroz por su tolerancia a toxicidad de aluminio y por la respuesta de sus anteras al cultivo *in vitro*; además, se cultivaron anteras de híbridos F_1 de variedades seleccionadas. El 46.3 o/o de las plantas obtenidas de anteras resultaron diploides, el 31.8 o/o haploides y el 21.9 o/o triploides. En las plantas diploides provenientes de un mismo híbrido se observaron diferencias fenotípicas marcadas (segregación), pero cada línea fue homocigota (floración, altura de la planta, macollamiento, tamaño de panícula). Las plantas diploides provienen de las microsporas y no del tejido somático de la antera. Además, la progenie de plantas obtenidas de anteras presentó características heredadas de los progenitores. El cultivo de anteras permite producir plantas diploides homocigotas con características deseadas, en poco tiempo, a partir de híbridos convencionales.

ABSTRACT

Twenty four rice cultivars were evaluated for tolerance to aluminum toxicity under greenhouse conditions and response to anther culture *in vitro*. Besides, anthers from F_1 plants obtained by crossing cultivars tolerant and susceptible to aluminum toxicity were cultured. Chromosome counting in root tips indicated that 46.3 o/o of the total plants regenerated were diploid, 31.8 o/o haploid and 21.9 o/o triploid. Lines derived from the same cross showed marked differences among them (segregation) but each line was homozygous for most agronomic characters (flowering, plant height, tillering, and panicle size) and reaction to *Pyricularia oryzae* and *Sogatodes oryzae*. Diploid plants originated from microspores and not from the somatic tissue of the anther; these plants inherited several characters from each parent involved in the cross. Through anther culture improved homozygous lines can be obtained in 1-2 generations with saving in time, labour, land, and money.

* Estudiante de pre-grado, Universidad Nacional de Colombia, Palmira.

** Centro Internacional de Agricultura Tropical, CIAT - A.A. 6713, Cali, Colombia.

1. INTRODUCCION

En América Latina existen unas 700 millones de hectáreas potencialmente cultivables con arroz, como los Llanos Orientales de Colombia, pero que están subutilizadas debido a la alta acidez de los suelos, asociada con problemas de toxicidad de aluminio (CIAT, 2).

Una forma rentable de producir en estas áreas con poco uso de insumos consiste en el desarrollo de genotipos superiores adaptados a condiciones adversas. El cultivo *in vitro* de anteras, por la economía en tiempo, espacio y mano de obra, figura entre las herramientas modernas que podrían emplearse en la obtención de variedades mejoradas (Bajaj, 1; Oono, 23; Zeng, 34).

Cultivando anteras o polen inmaduro de plantas F_1 o F_2 de cruces convencionales, se pueden obtener plantas homocigotas sin segregación posterior, ni pérdida de vigor. Las poblaciones producidas tienen la variación inherente que podría encontrarse en generaciones segregantes, pero los individuos tienen un genotipo fijo que no segrega y mantiene el vigor. Las progenies producidas se pueden evaluar por rendimiento y otras características deseables, lo cual requiere mayor tiempo y esfuerzo cuando se siguen las técnicas convencionales de mejoramiento. Además, los caracteres controlados por genes recesivos, como tolerancia a la toxicidad por aluminio (Martinez, 17), se manifiestan en líneas producidas por este sistema.

Los objetivos del trabajo fueron, seleccionar líneas homocigotas de arroz tolerantes a la toxicidad del aluminio mediante el cultivo de anteras e investigar *in vitro* las diferencias varietales en la respuesta de callos de semillas provenientes de variedades susceptibles y tolerantes a la toxicidad del aluminio.

2. PROCEDIMIENTO EXPERIMENTAL

En el Centro de Agricultura Tropical-CIAT, se evaluaron 24 variedades de arroz por su tolerancia a la toxicidad de aluminio y por la respuesta de sus anteras al cultivo *in vitro* y se cultivaron *in vitro* anteras de los cruces seleccionados (IR 5/Tox 1010-45-1-1, IR 43/IAC 25, IAC 164// IR 43/Monolaya e IAC 165 // IR 43/Monolaya).

Se utilizó la técnica de la longitud relativa radicular-LRR (Howeler y Cavdavid, 12) y la solución nutritiva de Yoshida et al modificada (31), para evaluar la tolerancia de los materiales a la toxicidad de aluminio. Cinco plántulas de cada variedad se colocaron en una solución testigo y en otra con 30 ppm de $AlCl_3$, con tres repeticiones por tratamiento. Se utilizó

un diseño de bloque completos al azar y se hicieron análisis de varianza y la prueba de Duncan. Diariamente se ajustó el pH a 4.0 y se repuso el agua evaporada; se renovó la solución nutritiva cada ocho días.

La metodología del cultivo de anteras incluyó: planta donante y selección de la panícula, desinfestación de la panícula, determinación del estado de desarrollo del polen, tratamiento con frío de las anteras, medio de cultivo, cultivo *in vitro*, trasplante de las plantas regeneradas y análisis de las plantas obtenidas (Narvaez, 20). Se contó el número de cromosomas de la punta de la raíz cuando las plantas tuvieron 3 semanas.

Para determinar preliminarmente si la tolerancia al aluminio se manifiesta a nivel celular o es un fenómeno de la planta completa, se sembraron semillas de una variedad tolerante y otra susceptible, en condiciones asépticas en un medio nutritivo que contiene las sales minerales de Murashige y Skoog (19) suplementado con 2.0 mg/l de 2, 4-D y 2.0 mg/l de ANA, aminoácidos libres, sacarosa, vitaminas y agar. Se utilizaron cuatro concentraciones de Al EDTA (0.5, 1.0, 2.0 y 4.0 mM) con 6 repeticiones y 10 semillas por repetición. El pH se ajustó a 5.5 antes de filtrarlos para efectos de esterilización. Las semillas se incubaron en la oscuridad para inducir callos. Al cabo de 15 días se pasaron a medio fresco y a las cuatro semanas se evaluó el peso fresco y seco y se comparó con el testigo sin aluminio. Los resultados se sometieron a análisis estadístico mediante un diseño experimental completamente aleatorio.

3. RESULTADOS Y DISCUSION

3.1. Evaluación de las variedades a la toxicidad del aluminio y respuesta de sus anteras al cultivo in vitro.

Se encontraron diferencias significativas entre variedades y en la interacción variedad por aluminio en el índice de tolerancia al aluminio (LRR); las variedades MI 48, Colombia 1, Miramono, etc. son significativamente diferentes de las restantes (Cuadro 1). Empleando este método se pueden clasificar las variedades tolerantes y susceptibles al aluminio (Howeler y Cadavid, 12; IRRI, 14).

El 56 o/o de las variedades produjeron callos, pero solo cinco regeneraron plantas (Cuadro 1), lo cual señala el efecto del genotipo puesto que las variedades del grupo Japónica responden mejor que las del Indica al cultivo *in vitro* (Chaleff y Stolarz, 3; Oono, 23; Tsai y Lin, 28; Zapata et al, 32). Por otro lado, se puede notar que las variedades con mayor índice de tolerancia presentan cierta tendencia a responder mejor al cultivo *in vitro*. Sin embargo, buen número de las variedades tolerantes a la toxicidad

Cuadro 1

Respuesta de 23 variedades de arroz a la toxicidad causada por aluminio y al cultivo *in vitro* de anteras

Variedad	Indice LRR ^a	Formación de callo anteras inoculadas		Regeneración de plantas Callos inoculados	
		No.	o/o	No.	o/o
MI 48	1.078 a	372	7.5	24	4.1
Colombia 1	1.068 ab	344	17.7	38	0
Miramono	0.98 ab	383	11.22	30	0
Monolaya	0.96 abc	362	16.2	28	3.5
IAC 25	0.94 abc	257	35.0	40	0
IAC 164	0.93 abc	258	29.0	42	0
Tox 1010-45-1-1	0.93 cd	520	23.65	11	54.4
Ceysvoni	0.87 cd	312	0	0	0
Bbt 50	0.86 cd	327	17.7	30	0
O. S. 6	0.85 cd	329	18.23	32	0
Camponi	0.81 defg	310	0	0	0
IRAT 13	0.79 efgh	325	22.4	14	7.14
Ciwini	0.75 efgh	344	26.0	40	0
Tox 728	0.71 fghij	328	0	0	0
IRAT 8	0.71 fghi	324	0	0	0
IR 5	0.68 fghij	318	6.28	15	0
IR 4568	0.68 ghij	320	0	0	0
Tapuripa	0.66 jk	308	0	0	0
IR 1144	0.65 ijk	332	0	0	0
IR 43	0.63 hij	287	19.3	13	7.6
Damaris	0.63 jk	293	0	0	0
CR 1113	0.61 ghij	264	0	0	0
IR 4422	0.48 k	282	0	0	0

$$^a \text{LRR} = \frac{\text{Longitud raíz } 30 \text{ ppm}}{\text{Longitud raíz } 0 \text{ ppm}}$$

Medio de inducción de callos: N 6 + 2.0 mg/l 2,4-D + 2.0 mg/l ANA + 6 o/o sacarosa + 0.8 o/o agar.

Medio de regeneración: MS + 3 o/o sacarosa + 0.8 agar.

del aluminio pertenecen al grupo Indica (Howeler y Cadavid, 12; IRRI, 14).

3.2. Respuesta de híbridos F_1 al cultivo in vitro.

La generación F_1 responde mejor al cultivo in vitro que sus progenitores (Cuadro 2), como lo habían registrado otras investigaciones (Chung, 2; Raina, 25; Zapata et al, 33). En la mayoría de los casos la respuesta de los híbridos fue superior o igual a la de los padres, excepto IR 5/Tox 1010-45-1-1, el cual presentó menor producción de callos, pero alto porcentaje de regeneración de plantas. La superioridad de los híbridos F_1 se explica como resultado de la heterosis del híbrido, la cual puede incrementar el vigor en la producción de callos y regeneración de plantas (Zapata et al, 33). La mejor respuesta de la F_1 es importante puesto que vuelve innecesaria la evaluación previa de los progenitores para determinar su respuesta al cultivo de anteras.

3.3. Medio de cultivo.

En la regeneración de plantas de anteras de híbridos F_1 influyen el genotipo, el medio de cultivo y la interacción de ambos factores (Cuadro 3).

El híbrido IAC 165// IR 43 / Monolaya mostró mayor capacidad de regeneración de plantas presentando a la vez el más alto índice de plantas albinas, factor que también se ha asociado con el genotipo (Chung, 10; Oono, 23; Wang et al, 29). Sin embargo, el medio 4 permitió regenerar mayor número de plantas verdes en todos los materiales, lo cual indica que modificando el medio de cultivo se puede mejorar la respuesta de algunos genotipos.

El medio de inducción de callos parece que influye notablemente sobre la rediferenciación de plantas a partir de callos (Institute of Genetic, 13). Es probable que la proliferación celular inducida por el 2, 4-D, dificulte los procesos de rediferenciación de esas mismas células. Sin embargo, en los medios con anti-auxina (ácido tri-iodobenzoicoico-TIBA) el número total de plantas regeneradas fue similar al de los otros dos medios.

3.4. Análisis de plantas obtenidas de anteras de híbridos F_1 y su progeñie.

Las plantas regeneradas a partir del cultivo de anteras de arroz generalmente presentan diferentes niveles de ploidía (Chu, 9; Heszky, 11; Institute of Genetic, 13; Kucherenko, 16; Raina, 25), lo cual se ha tratado de explicar con base en fenómenos de endomitosis, fusión de núcleos, pérdida de cromosomas y otros cambios cariológicos que acontecen durante la fase de cultivo in vitro de los callos (Chen et al, 6; Institute of Genetic, 13).

Cuadro 2

Respuesta de las anteras de híbridos de arroz al cultivo *in vitro*

Material	Formación de callos		Regeneración de plantas	
	Anteras No.	o/o	Callos No.	o/o
IAC 164 (♂)	257	6.28	20	0.00
Monolaya (♂)	362	16.20	28	3.50
F ₁ (IAC 164// IR 43/Monolaya)	1354	51.70	148	11.48
IR 5 (♀)	318	6.28	20	0.00
Tox 1010-45-1-1 (♂)	478	24.60	20	50.00
F ₁ (IR 5/Tox 1010-45-1-1)	1200	3.00	25	56.00
IR 43 (♀)	287	19.30	13	7.60
IAC 25 (♂)	257	35.00	34	0.00
F ₁ (IR 43/IAC 25)	1095	34.90	206	19.19

Medio de inducción de callos: N6 + 0.2 mg/l 2.4-D + 2.0 mg/l ANA + 6 o/o sacarosa + 0.8 o/o agar.

Medio de regeneración: MS + 0.4 ppm BAP + 0.05 ppm GA + 0.02 ANA + 2 o/o sacarosa + 0.6 o/o agar.

Cuadro 3

Evaluación de cuatro medios para regeneración de plantas en tres genotipos (híbridos F₁).

Medio	IAC 164//IR 43 / Monolaya			IAC 165 // IR 43 / Monolaya			IR 43 / IAC 25		
	Callos inoculados No.	No. callos con plantas		Callos inoculados No.	No. callos con plantas		Callos inoculados No.	No. callos con plantas	
		Verdes	Albinas		Verdes	Albinas		Verdes	Albinas
MS + 0.1 ppm TIBA + 500 ppm CH + 5 o/o Sacarosa + 0.6 o/o agar	37	3	1	40	6	6	50	3	1
MS + 0.2 ppm ANA + 0.2 ppm BAP + 0.2 ppm 2ip + 5 o/o sacarosa + 0.6 o/o agar	37	3	1	40	5	6	50	3	1
MS + 0.2 ppm TIBA + 0.05 BAP + 0.2 ppm GA + 5 o/o sacarosa + 0.6 o/o agar	37	2	2	40	3	4	50	3	1
MS + 0.04 ppm BAP + 0.05 ppm GA + 0.02 ANA + 2 o/o sacarosa + 0.6 o/o agar.	37	4	1	40	7	0	50	7	2

Medio inducción de callo: N6 + 2.0 mg/l 2.4-D + 2.0 mg/l ANA + 6 o/o sacarosa + 0.8 o/o agar.

De 14 plantas regeneradas del cruzamiento IR 5/Tox 1010-45-1-1 siete (50 o/o) fueron diploides, 4 (28.5 o/o) haploides y 3 (21.5 o/o) triploides. Las plantas haploides fueron estériles y de menor tamaño, las diploides fértiles y las triploides parcialmente estériles y de mayor tamaño.

3.5. Variaciones observadas.

En algunas de las plantas obtenidas se observaron cambios en la altura, mal formación de la hoja bandera, espigas anormales y esterilidad. Algunos investigadores (Institute of Genetic, 13; Kucherenko, 16; Nishi et al, 22; Yin et al, 30) han indicado la presencia de variaciones morfológicas (cambio en altura, macollamiento, tamaño de la panícula, tamaño y forma de las hojas y esterilidad) que ocurren durante la fase del cultivo *in vitro* y pueden servir como nuevas fuentes de variabilidad genética.

En este trabajo una de las plantas triploides prevalentemente estéril presentó algunas panículas fértiles de mayor tamaño, hecho debido probablemente a la fusión de dos callos provenientes de microsporas diferentes o a mutaciones.

3.6. Segregación y recombinación de caracteres.

La progenie de las siete plantas diploides obtenidas mediante el cultivo de anteras a partir del cruzamiento IR 5/Tox 1010-45-1-1, se sembró en el campo con el fin de determinar el grado de homocigosis.

Hubo diferencias fenotípicas marcadas entre las líneas y entre las líneas y los parentales en cuanto a macollamiento, floración, ciclo vegetativo, altura de la planta, fertilidad, longitud de la panícula, peso de 1000 granos y tipo de grano. Los valores promedios de las líneas para casi todos los caracteres estuvieron dentro del rango presentado por los padres. Se observó que mientras IR 5 es resistente al daño mecánico del insecto *Sogatodes oryzae* y Tox 1010-45-1-1 es susceptible, todas las líneas resultaron resistentes. En el caso de *Piricularia oryzae* todas las líneas, al igual que los parentales, resultaron resistentes (Cuadro 4).

Las variedades IR 5 y Tox 1010-45-1-1 presentaron granos sin arista con y sin pubescencia respectivamente, mientras que las líneas exhibieron granos pubescentes y tres de ellas con arista. Estos resultados concuerdan con los de otros trabajos (Raina, 25; Shen et al, 27) y demuestran que las plantas obtenidas de anteras de híbridos son producto de la recombinación genética que acontece durante la meiosis y tienen la variación inherente que podría encontrarse en una población segregante F_2 . Eventos meióticos tales como segregación, distribución independiente, unión y recombinación

Cuadro 4

Algunas características de la progenie de plantas diploides obtenidas de anteras del híbrido F₁ (IR 5/Tox 1010-45-1-1) y sus parentales.

Material Material	Macollas No.	Días a floración	Días a madurez	Panículas No.	Altura planta (cm)	Fertilidad o/o **	Longitud panícula	Peso 1000 granos	Tipo de grano	Reacción a	
										Sogata pyricularia (hojas)	
IR 5 (♀)	31.50	119	150	26.8	86.6	83.0	19.2	29.40	Pubescente Sin arista	R	R
A*	28.00	108	129	18.9	95.5	70.3	19.8	22.60	Pubescente Sin arista	R	R
B	29.00	110	130	24.9	89.0	60.5	20.8	23.50	Pubescente Aristado	R	R
C	27.60	115	140	19.8	76.6	68.6	18.8	23.72	Pubescente Aristado	R	R
D	31.32	113	134	21.3	69.5	67.0	18.6	23.73	Pubescente Aristado	R	R
E	29.37	114	136	24.0	68.9	72.4	21.1	25.23	Pubescente Aristado	R	R
F	22.50	98	120	20.1	72.6	78.0	23.4	25.57	Pubescente Sin arista	R	R
G	22.09	104	126	20.1	95.6	82.0	21.0	26.62	Pubescente Sin arista	R	R
Tox 1010- 45-1-1- (♂)	16.50	92	114	16.2	98.2	81.0	20.0	33.77	Glabro Sin arista	S	R

*A - G = Progenie de plantas diploides.

R = Resistente; S = Susceptible

** = Número de granos llenos en una muestra de 100 granos.

que ocurren en arroz pueden detectarse en plantas provenientes de polen y los rangos de segregación de los caracteres estudiados coinciden con los esperados (Chen et al, 6). Esto demuestra que cada grano de polen tiene la misma capacidad de regenerar plantas.

3.7. Prueba de uniformidad en el campo.

Las líneas regeneradas a partir del cultivo de anteras tuvieron valores promedios diferentes en cuanto a número de macollas, número de panículas, longitud de la panícula y altura de las plantas; esos valores también fueron diferentes a los de IR 5 y Tox 1010-45-1-1 (Cuadro 5). En general, los valores promedios correspondientes a las líneas cayeron dentro de los rangos exhibidos por los padres; sin embargo, las líneas E, F y G tuvieron panículas más largas que Tox 1010-45-1-1. Los datos indican que las líneas son genéticamente distintas y que la variabilidad observada en los cuatro caracteres analizados se debe a factor ambiental y no a segregación de caracteres; tanto en los padres como en las líneas el número de macollas y el número de panículas fueron más afectadas por el medio ambiente. Se concluye que las líneas diploides son homocigotas y que tuvieron su origen en la duplicación espontánea de los cromosomas (haploides doblados) durante el cultivo *in vitro*; tal como se ha registrado en otros trabajos (Chase, 4; Chen et al, 6; Chen y Li, 7; Kinoshita, 15).

3.8. Tolerancia a la toxicidad del aluminio.

Se evaluó la respuesta a la toxicidad del aluminio de la progenie de siete plantas diploides, obtenidas a partir del cultivo de anteras del híbrido IR 5/Tox 1010-45-1-1, y de los progenitores.

Con excepción de la línea F, las otras presentaron niveles de tolerancia intermedios entre los valores de sus progenitores, uno de los cuales es susceptible (IR 5) y el otro tolerante (Tox 1010-45-1-1) a la toxicidad del aluminio (Fig. 1). Aún cuando no hubo diferencias significativas entre el índice de tolerancia de las líneas y del padre susceptible, los datos sugieren que las líneas A, G, E, D y B son más tolerantes que IR 5. Estas líneas se evaluaron en suelos ácidos de Villavicencio, donde impera la toxicidad de aluminio, para comprobar su comportamiento en el campo, esperando que exista alta correlación entre la respuesta a nivel de invernadero y campo (Howeler y Cadavid, 12).

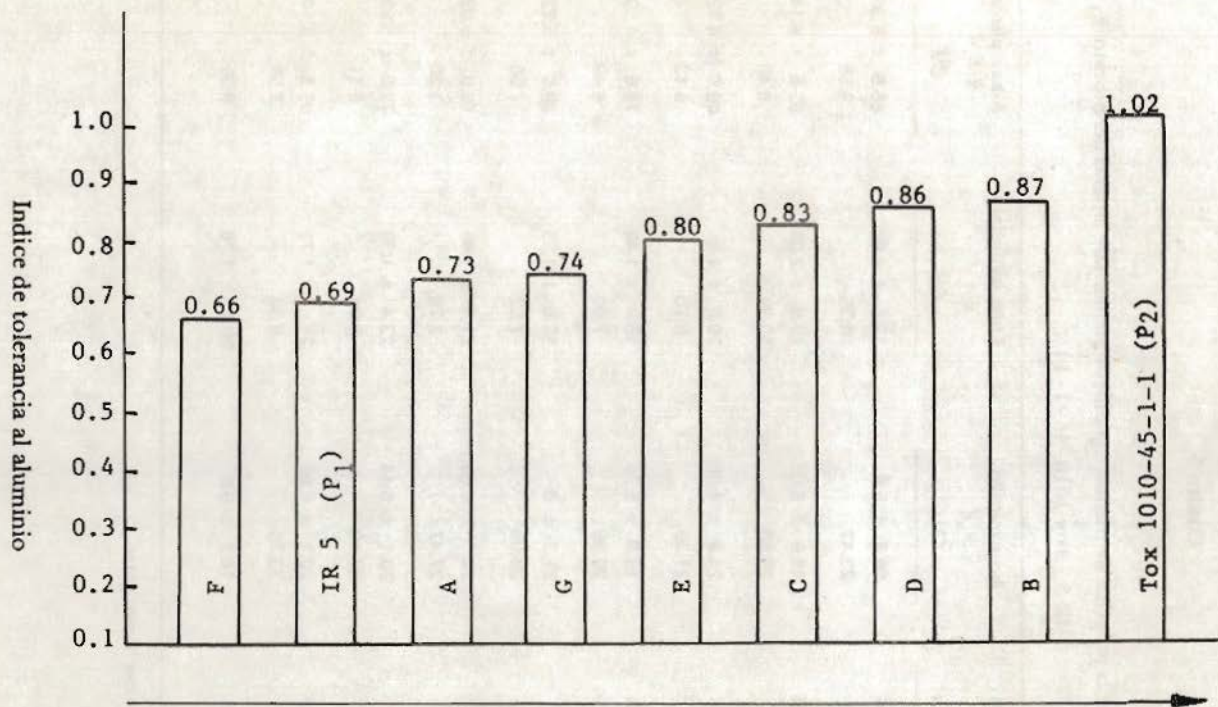
Este hecho es de gran importancia en la producción de materiales con tolerancia a la toxicidad del aluminio, ya que utilizando la técnica del cultivo de anteras de híbridos F_1 se pueden producir líneas puras (homocigotas) y seleccionar las líneas tolerantes mediante el método de la longitud re-

Cuadro 5

Análisis de algunos caracteres de la progenie de plantas diploides obtenidos de anteras del híbrido F₁
(IR 5 / Tox 1010-45-1-1)

Material	No. macollas $\bar{x} \pm \delta$ CV	No. panículas $\bar{x} \pm \delta$ CV	Long. panículas $\bar{x} \pm \delta$ CV	Altura plantas $\bar{x} \pm \delta$ CV
IR 5 (♀)	31.5 ± 6.54 9.58	26.8 ± 5.8 23.42	19.5 ± 1.6 8.35	86.6 ± 8.39 9.58
A*	28 ± 6.16 23.19	18.9 ± 6.06 25.60	19.8 ± 2.08 10.39	95.5 ± 6.14 6.40
B	29 ± 4.45 15.91	24.9 ± 4.86 21.39	20.8 ± 1.8 8.70	89.0 ± 4.92 5.13
C	17.6 ± 7.32 26.88	19.6 ± 5.75 29.36	18.9 ± 1.49 7.60	76.6 ± 4.59 6.49
D	31.32 ± 8.1 27.27	21.3 ± 6 28.06	18.6 ± 1.39 7.52	69.5 ± 5.22 7.50
E	29.37 ± 8.6 29.80	24 ± 6.69 27.47	21.1 ± 1.45 7.70	68.9 ± 5.03 7.30
F	22.5 ± 7.4 33.02 ±	20.1 ± 6.44 32.10	23.4 ± 1.38 5.94	72.6 ± 5.89 8.11
G	22.09 ± 7.20 32.60	20.1 ± 6.69 33.30	21 ± 1.73 8.38	95.6 ± 8.16 8.59
Tox 1010-45- 45-1-1- (♂)	16.5 ± 6.38	16.2 ± 5.8	20.1 ± 1.76	8.35

*A - G : Progenie de plantas diploides homocigotas.



Incremento de la tolerancia al aluminio en solución nutritiva

P₁ = Variedad parental (♀) susceptible (IR 5)

P₂ = Variedad parental (♂) tolerante (Tox 1010-45-1-1)

A-G = Líneas provenientes del cultivo de anteras del híbrido F₁ (IR 5/Tox 1010-45-1-1)

Fig. 1. Respuesta de la progeñe de plantas diploides obtenidas de anteras del híbrido F₁ (IR 5/Tox 1010-45-1-1) y sus parentales a la toxicidad causada por aluminio.

lativa de la raíz. Con lo cual se estaría eliminando el problema de la segregación de los híbridos y a la vez acortando el ciclo de mejoramiento.

3.9. Respuesta a la toxicidad del aluminio a nivel celular.

El cultivo de células *in vitro* permite incrementar la variabilidad genética disponible y la selección de un genotipo específico (Chaleff y Stolarz, 3 ; Kucherenko, 16). Con el cultivo de polen o anteras, las células se pueden inducir a crecer como organismos haploides y exponerlas a factores estresantes, como sucede con el aluminio a nivel celular (Kucherenko, 16). Si la tolerancia a la toxicidad del aluminio existe a nivel celular en arroz, como es el caso en otros cultivos (Kucherenko, 16), *in vitro* se podrían seleccionar líneas de células tolerantes que originarían plantas igualmente tolerantes; reduciendo el tiempo requerido para la obtención de líneas puras tolerantes a la toxicidad del aluminio.

El peso fresco y seco de los callos de las variedades Tox 1010-45-1-1 e IR 5 disminuyeron conforme aumentó la concentración de aluminio en el medio de cultivo (Fig. 2). Sin embargo, a más de 2 mM Al-EDTA el peso fresco de los callos aumentó; lo cual sugiere que hubo problemas en el medio de cultivo, específicamente en la estabilidad del aluminio *in vitro*, puesto que se precipita a pH altos, como los utilizados en cultivo *in vitro*, para evitar esto es necesario emplearlo quelatado en forma de aluminio EDTA (Meredith, 18).

Hubo diferencias significativas entre los genotipos y entre las concentraciones de aluminio, pero no hubo interacción entre variedades y niveles de aluminio. Lo anterior puede indicar que las diferencias en peso seco y fresco, se deban más a la respuesta de las variedades al cultivo *in vitro* que al efecto del aluminio. Además, si se tiene en cuenta el crecimiento relativo de los callos, se puede corroborar esta hipótesis, ya que la tolerancia y susceptibilidad de las variedades que se observó en la planta completa, no fue posible distinguir las *in vitro* a nivel celular. Los resultados sugieren que la tolerancia a la toxicidad del aluminio a nivel celular, es diferente del mecanismo que controla dicha tolerancia en una planta completa que crece en una solución nutritiva.

4. APLICACIONES Y PERSPECTIVAS

La producción de líneas puras con características heredadas de sus padres, utilizando el cultivo de anteras de híbridos F_1 en arroz, se ha comprobado en este trabajo al igual que por otros autores (Chen y Li, 7; Oono, 24). El hecho de que sean diploides (haploides doblados) un alto porcentaje (50-60 o/o) de las plantas regeneradas, es de gran significancia para el aprove-

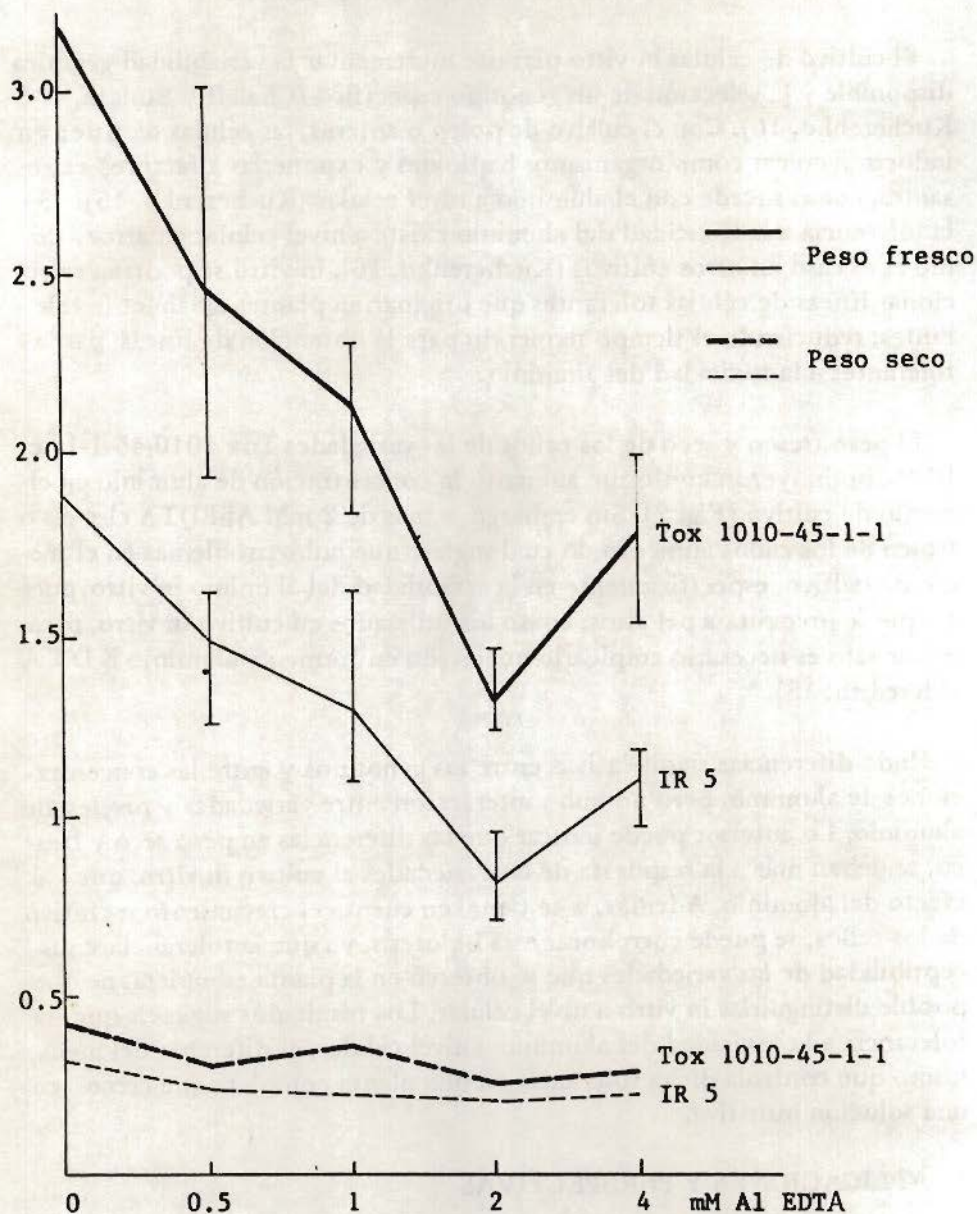


Fig. 2. Efecto del aluminio sobre el incremento en peso fresco y seco de callos provenientes de semillas de dos variedades de arroz.

chamiento de esta técnica por un programa de fitomejoramiento, pues evita el tener que inducir la duplicación de cromosomas. Por otra parte, las variantes que se pueden suscitar en el cultivo *in vitro*, v. gr. plantas enana, pueden servir como nuevas fuentes de variabilidad genética, sobre todo si se tiene en cuenta que muchos de esos cambios debidos a mutaciones controladas por genes recesivos aparecerán inmediatamente en las plantas haploides o diploides homocigotas.

Se han propuesto muchas aplicaciones de la técnica del cultivo de anteras en fitomejoramiento (Chen y Li, 7; Niizeki, 21; Zeng, 34). Algunas de las ventajas son: a) se reducen el tiempo y el esfuerzo empleados en desarrollar genotipos reproducibles, con especial uso en la transferencia y fijación de la resistencia de plantas con características agronómicas no comerciales a variedades comerciales; b) obtención de poblaciones pequeñas que pueden entrar en un proceso de selección; c) expresión de caracteres controlados por genes recesivos; d) utilización de líneas homocigotas para identificar razas de patógenos o biotipos de insectos, con una reducción del error experimental debido a problemas de heterocigosis en variedades conocidas (Rush et al, 26) y e) aprovechamiento en la hibridación interespecífica o distante (Chen y Li, 7; Zeng, 34).

En el Cuadro 6, se resume la metodología a seguir si se integra la técnica de cultivo de anteras a un programa práctico de mejoramiento de arroz para solucionar problemas específicos v. gr. tolerancia a toxicidad del aluminio.

La clasificación y selección de variedades por su tolerancia a la toxicidad causada por aluminio, seguida de la evaluación de su respuesta al cultivo de anteras, serán los pasos previos a la producción de híbridos entre variedades tolerantes, pero con características agronómicas no comerciales, y variedades comerciales susceptibles al aluminio. Como se ha demostrado en este estudio, los híbridos generalmente responden mejor que los parentales al cultivo *in vitro* de anteras. El paso siguiente, sería el cultivo de anteras de híbridos F_1 y la producción de plantas. Posteriormente la evaluación de su progenie, prueba de uniformidad y pruebas específicas de los caracteres agronómicos, incluyendo la tolerancia a toxicidad del aluminio.

Las etapas siguientes como ensayos de rendimiento, pruebas regionales, selección y multiplicación de la nueva variedad son iguales a las del método convencional. La diferencia radical está en que en el método convencional generalmente se requieren 5-6 generaciones para obtener la homocigosis, mientras que por el cultivo de anteras se logra en 1-2 generaciones.

Cuadro 6

Representación esquemática para obtener teóricamente líneas homocigotas de arroz mediante el cultivo de anteras

Banco de germoplasma		Tiempo (meses)
(variedades)		
Evaluación		
Respuesta al cultivo <i>in vitro</i>	Tolerancia (toxicidad de Al)	3
	Selección de variedades	4
	Producción de híbridos F ₁	2
	Cultivo de anteras	
	Obtención de plantas	3
	Determinación de niveles de ploidía	4
	Evaluación de la progenie	
	- Uniformidad	
	- Caracteres agronómicos	4
	- Tolerancia a aluminio	
	Selección de líneas puras tolerantes	20 meses

5. CONCLUSIONES

- 5.1. Los híbridos F_1 presentaron mejor respuesta al cultivo *in vitro* que sus parentales.
- 5.2. La composición del medio de cultivo para la inducción de callos influye en la posterior regeneración de plantas.
- 5.3. Las plantas regeneradas presentaron diferentes niveles de ploidía: 50 o/o fueron diploides, 28.5 o/o haploides y 21.5 o/o triploides.
- 5.4. Las plantas producidas a partir del cultivo de anteras de híbridos F_1 tienen su origen en las células gaméticas (granos de polen), por lo tanto son el producto de la recombinación y segregación de caracteres después de la meiosis.
- 5.5. Las plantas diploides obtenidas a partir de anteras de híbridos F_1 son homocigotas.
- 5.6. A partir de híbridos F_1 y utilizando el cultivo de anteras y la longitud relativa radicular, es posible producir y seleccionar líneas puras con tolerancia a la toxicidad del aluminio.
- 5.7. La tolerancia a la toxicidad de aluminio en dos variedades de arroz no se manifestó a nivel celular bajo las condiciones del presente ensayo.

6. BIBLIOGRAFIA

1. BAJAJ, Y. P. S. Implications and prospects of protoplasmic cell, and tissue culture in rice improvement programs. *In*: Innovative approaches to rice breeding. Los Baños, IRRI, 1980. pp. 93 - 103.
2. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL. Internal Program Review, 1981. Annual Report. Rice Program.
3. CHALEFF, R. S. and STOLARZ, A. Factor influencing frequency of formation among culture rice (*Oryza sativa*) anthers. *In*: Special planning conference on rice tissue culture. Int. Rice Res. Inst., Los Baños, Philippines, 28 - 30 April, 1980.
4. CHASE, S. S. Plant cell culture technology. *In*: Sen, S. K. and Giles, K. L. (ed). Plant cell culture in crop improvement. New York, Plenum Press, 1981. pp: 1- 6.

5. CHEN, C. C. and LIN, M. H. Inductions of rice plantlets from anther culture. Bot. Bull. Acad. Sin. (Taipei). 17: 18-24. 1976.
6. CHEN, C. C. et al. Genetic analysis of anther derived plants of rice. In: Plant tissue culture. Int. Congr. Plant tissue and cell culture, 5th, Tokio and Lake Yamanaka, Japan, July 11-16, 1982. Proc.. pp.565-566.
7. CHEN and LI. Investigation and utilization of pollen-derived haploid plants in rice and wheat. In: Symposium on plant tissue culture, Pekin, May 25-30, 1978. Proc. p. 199.
8. CHU, C. C. et al. Establishment of an efficient for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin. 18(5): 658-66. 1976.
9. CHU, C. C. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization. In: Rice Tissue Culture Planning Conference. Int. Rice Res. Inst. Los Baños, Philippines, 1982. p. 47.
10. CHUNG, G. S. Progress of tissue culture work on rice in Korea. In: Special planning conference on rice tissue culture. Int. Rice Res. Inst. Los Baños, Philippines, 28-30 April, 1980.
11. HESZKY, L. and PAUK, J. Induction of haploid rice plants of different origin in anther culture. Riso 24: 197-204. 1975.
12. HOWELER, R. H. and CADAVID, L. F. Screening of rice cultivars for tolerance to Al toxicity in nutrient solutions as compared with a field screening method. Agron. J. 68: 551-555. 1976.
13. INSTITUTE OF GENETIC, 2nd. DIVISION, 3rd. LABORATORY, ACADEMIA SINICA. Investigation on the induction and genetic expression of rice pollen plants. Scientia Sinica 17(2): 209-226. 1974.
14. INTERNATIONAL RICE RESEARCH INSTITUTE. Annual Report, 1979. p. 121-122.
15. KINOSHITA, T. Fundamental problems on haploid breeding by means of anther culture in rice plants. In: Fujivara, A. (ed). Plant tissue culture, Tokio, 1982. p. 567.
16. KUCHERENKO, L. A. Tissue culture in rice improvement: Experiences in the USSR. In: Innovative approaches to rice breeding. Los Baños, I R R I, 1980. pp. 93-102.
17. MARTINEZ, C. Aluminum toxicity studies in rice (*Oryza sativa*). Oregon State University, 1976. 113 p.. (Ph. D. Thesis).

18. MERDITH, C. P. Selection and characterization of aluminum-resistant tomato cell cultures plant. *Science Letters*. 12 -25-34 (1978) p. 25 - 34.
19. MURASHIGE, T. and SKOOG, F. A. A derived medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant*. 15: 473-497. 1962.
20. NARVAEZ, J. Cultivo de tejidos del arroz (*Oryza sativa*); inducción de callos y regeneración de plantas. Palmira, Univ. Nacional de Colombia, Facultad de Ciencias Agropecuarias, 1981. (Tesis Ing. Agr.).
21. NIIZEKI, H. Uses and application of anther and pollen culture techniques for cereal crop improvement. In: *Inst. Genet. Acad. Sin, Int. Rice Res. Inst. (ed.)*. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. 1983. p. 165.
22. NISHI, T. et al. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219: 508-509. 1968.
23. OONO, K. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Natl. Inst. Agric. Sci. Japan Ser. D*. 26: 139-22. 1975.
24. ———. Genetic variability in rice plants regenerated from cell culture. In: *Inst. Genet. Acad. Sin, Int. Rice Res. Inst. (ed.)*. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. 1983. p. 95.
25. RAINA, S. K. Recent progress in rice anther culture studies. In: Sen, S. K. and Giles, K. L. (ed.). *Plant cell culture in crop improvement*. New York, Plenum Press, 1981. p. 159.
26. RUSH, M. C. et al. Protoplast cell and rice tissue culture: prospects for the future. Special planning conference on rice tissue culture. *Int. Rice Res. Inst.*, Los Baños, Philippines. 28-30 April, 1980.
27. SHEN, J. H. A. et al. Improving rice by anther culture. In: *Inst. Genet. Acad. Sin., Int. Rice Res. Inst. Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvements*. 1983.
28. TSAI, S. y LIN, M. Production of rice plantlets by anther culture. *J. Agric. Res. China*. 26 (2): 100-112. 1977.
29. WANG, C. C. et al. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of inoculation. *Acta Bot. Sin.* 1: 52-53. 1974.
30. YIN, K. C. et al. A study of new cultivar of rice raised by haploid breeding method. *Sci. Sin.* 19(2): 227-242. 1972.

31. YOSHIDA, S. et al. Laboratory manual for physiological studies of rice. 2 ed. Los Baños, IRRI, 1972. pp. 53 - 57.
32. ZAPATA, F. J. et al. Rice anther culture at IRRI. Los Baños, IRRI, 1980.
33. ————— et al. Anther culture research for rice breeding at IRRI. In: International Rice Research Conference, Int. Rice Res. Inst., April 19-23, 1982.
34. ZENG, J. Application of anther culture technique to crop improvement in China. In: Sen, S. K. and Giles, K. L. (ed). Plant cell culture in crop improvement. New York, Plenum Press, 1981. p. 351.