

CULTIVO DE TEJIDOS DEL ARROZ, *Oryza sativa* L.: INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS

Por:

Javier Narváez V.\*

Joaquín González F.\*\*

COMPENDIO

Se estudió la capacidad de diversos tejidos de cuatro genotipos de arroz (*Oryza sativa*) de regenerar plantas *in vitro* y la posibilidad de obtener plantas haploides o diploides homocigotas cultivando anteras.

El genotipo determinó la respuesta primaria de los tejidos (porciones de raíces y hojas de plántulas, embriones y semillas maduras, anteras), pero el medio de cultivo incrementó las frecuencias de inducción de callo y regeneración de plantas. La concentración de auxina requerida para la inducción y crecimiento de callos varió con la clase de tejido. La adición al medio de cultivo de 2.0 mg/l de 2,4-D y de ANA aumentó la frecuencia de inducción y el crecimiento de callos a partir de semillas y anteras de todos los genotipos. ANA estimuló la rediferenciación de plantas generadas de anteras, sin tener que transferir los callos a otros medios. La iluminación alta (9 000 lux) promovió la síntesis de clorofila. La edad y estado de fenolización del callo influyeron en la rediferenciación de vástagos. Callos provenientes de anteras mayores de 2 mm de diámetro, exhibieron mayor habilidad organogénica. El 62.5 o/o de las plantas diferenciadas a partir de anteras fueron diploides y haploides el 37.5 o/o.

ABSTRACT

Capacity to regenerate plants *in vitro* of different tissues coming from four rice phenotypes (*Oryza sativa*) were studied as well as the possibility of obtaining homozygous haploid and diploid plants from anther culture. The primary response of tissues (pieces of seedling root and leaves embryos and mature seeds, anthers) however the culture medium increased the frequency of callus induction and plant regeneration. Auxin concentration required for callus induction and grow varied with the class of tissue. Additions to the culture medium of 2.0 mg/l of 2,4-D and ANA increased the induction frequency and grow of callus originated from anthers and seeds in all genotypes.

Redifferentiations of plants originated from anthers was stimulated by ANA without need to transfer the callus to other medium. High light intensity (9 000 lux) stimulated chlorophyll synthesis. Callus age and phenolisation state influenced shoot redifferentiation. Callus arised from anthers larger than 2 mm of diameter showed greater organogenic capacity 62.5 o/o of differentiated plants arised from anthers were diploids, and 37.5 o/o of them were haploids.

\* Estudiante de pre-grado U. Nacional - Palmira.

\*\* Centro Internacional de Agricultura Tropical. CIAT - Palmira.

## 1. INTRODUCCION

Recientes avances en la técnica del cultivo de tejidos posibilitan su utilización en el fitomejoramiento. El incremento de la variabilidad genética que puede ocurrir *in vitro* y la utilización de los métodos del cultivo de anteras y polen, permiten una rápida selección, fijación y propagación de materiales mejorados; conllevando una mayor economía en tiempo, espacio y mano de obra, con respecto a los métodos tradicionales de mejoramiento (Bajaj, 1; Chaleff, 3; Chu, 9; Kucherenko, 17; Rush et al, 26; Zhang, 32).

Algunos problemas que dificultan el uso de estas técnicas en los programas de mejoramiento del arroz son la baja producción de callos y diferenciación de plantas en numerosas variedades, la poca información sobre la reacción de variedades al cultivo de tejidos y el desarrollo de plantas albinas (Chaleff, 3).

Los factores que influyen sobre la dediferenciación de los tejidos y el crecimiento de los callos, así como en la rediferenciación de órganos y plantas son los siguientes: genotipo (Guha - Mukherjee, 12; Maeda, 19); clase de tejido (Henke et al, 13; Wuyli, 29); medio de cultivo (sales minerales, vitaminas, carbohidratos, pH, fitohormonas y aditivos orgánicos (Chen, 7; Chu et al, 8; Inoue y Maeda, 14; Institute of Genetic, 16; Nishi et al, 23); condiciones de incubación (luz y temperatura) (Rush et al, 26); edad del callo (Chen, 6; Wang et al, 28; Yin et al, 31); estado fisiológico de la planta donante (Chaleff y Storlaz, 4; Tsai y Lin, 27) albinismo (Chu, 9), variaciones citoplasmáticas (Oono, 25), y diploidización (Yin et al, 31).

El estudio detallado e integrado de cada uno de estos factores es necesario si se pretende hacer un eficaz uso de esta técnica en los programas de fitomejoramiento.

Por estas razones, el objetivo del presente trabajo fué estudiar la capacidad de diversos tejidos del arroz, *Oryza sativa* L., para la regeneración de plantas *in vitro*, teniendo en cuenta los siguientes factores que influyen en el proceso: genotipo, clase de tejido, composición del medio de cultivo, condiciones de incubación, edad, tamaño y estado del callo. Además explorar la posibilidad de obtener plantas haploides o diploides homocigotas mediante el cultivo de anteras, con miras a su posterior utilización en la crianza de nuevos cultivares.

## 2. PROCEDIMIENTO

El trabajo se llevó a cabo en el Centro Internacional de Agricultura Trópic (CIAT), utilizando porciones de raíces y hojas de plántulas jóvenes,

embriones maduros, semillas maduras y anteras de cuatro genotipos (variedad Bluebonnet - 50 y las poblaciones  $F_2$  de los cruces CICA 4 x BG 90 -2, IR 262 x BG 90 -2 y Camponi x  $K_8$ ).

### 2.1. Preparación del material vegetal.

Las semillas maduras de arroz, descascaradas manualmente, desinfectadas con bicloruro de mercurio al 0.2 o/o durante 15 minutos y enjuagadas 4- 5 veces en agua destilada estéril, se imbibieron durante una noche a 5°C. Los embriones se removieron de semillas estériles. Las porciones de raíz y hoja se obtuvieron según la técnica de Henke et al (13).

La metodología para el precultivo de anteras fue la siguiente : Se extrajeron las primeras cinco panículas de cada planta envueltas en la vaina de la hoja bandera (Chen y Lin, 5) y se depositaron en agua destilada para evitar su desecamiento. Posteriormente se desinfectaron con hipoclorito de calcio al 6 o/o durante cinco minutos y se enjuagaron 4 - 5 veces con agua destilada estéril. Se emplearon anteras que contenían polen entre los estados de desarrollo uninucleado tardío y binucleado temprano (Wang, et al, 28; Yin et al, 31).

El método de tinción de los granos de polen se basó en la técnica descrita por Khan (Genovesi y Magill, 11). Como el tratamiento de las anteras del arroz con frío estimula la formación de callos (Genovesi y Magill, 11; Wang et al, 28), las flores desinfectadas se conservaron a 10°C durante 2 o 3 días antes del cultivo de las anteras.

### 2.2. Medios de cultivo.

Los medios basales (sales minerales y vitaminas) empleadas para el cultivo *in vitro* de los tejidos fueron el de Murashige y Skoog-MS (21) y el de Chu et al -N6 (8). Dependiendo del ensayo, los medios basales se suplementaron con los fitoreguladores del crecimiento: ácido 2,4 diclorofenoxiacético (2,4- D), ácido naftalenacético (ANA), ácido indolacético (AIA), cinetina, bencil adenina (BA) ó 2- isopentil adenina (2iP ). Se usaron los aditivos orgánicos leche de coco (LC), extracto de levadura (EL), caseína hidrolizada (CH) o lactalbúmina hidrolizada (LH) y diferentes concentraciones de sacarosa. El pH de los medios se ajustó a 5.8 antes de solidificarlos con 0.8 o/o de agar.

### 2.3. Incubación.

Las condiciones de incubación variaron según el experimento. Para in-

La mayor capacidad de diferenciación de órganos y plantas la presenta la población  $F_2$  del cruce Camponi x  $K_8$  y la menor, la población  $F_2$  del cruce CICA 4 x BG 90-2. Resultado que coincide con el de otras investigaciones e indica un marcado efecto del genotipo sobre las frecuencias de inducción de callo y regeneración de órganos a partir de los diferentes tejidos (Chung, 10; Guja. Mukherjee, 12; Maeda, 19; Oono, 25).

El albinismo es un factor que depende básicamente del genotipo, ya que mientras en Bluebonnet - 50 el 80 o/o de las plantas regeneradas a partir de anteras fueron albinas, en IR-262 x BG 90-2 lo fueron sólo el 20 o/o.

### 3.4. Clase de tejido.

Los niveles de 2, 4-D requeridos para la inducción y crecimiento de callos dependen del tipo de tejido (Cuadro 2). Así, para inducir la formación de callo a partir de raíces, embriones y semillas, se requiere 1.0 mg/l de 2, 4-D, pero con hojas se necesitan 2.0 mg/l. Sin embargo, el mejor crecimiento de los callos inducidos a partir de raíces y hojas se alcanza con 8.0 y 3.0 mg/l de 2,4-D, respectivamente, mientras que en el caso de embriones y semillas, el crecimiento es similar en todos los niveles siendo ligeramente mayor con 1.0 y 2.0 mg/l. Resultado que concuerda con los de Henke et al (13), Inoue y Maeda (14) y Wu y Li (29).

Las más elevadas frecuencias de inducción de callo se obtienen con raíces, embriones y semillas y la mayor capacidad de diferenciación de vástagos y plantas (Cuadro 1) la tienen los callos provenientes de anteras, aunque la diferenciación de raíces es más alta en los callos obtenidos de tejido somático (embriones y semillas).

### 3.5. Composición del medio de cultivo.

#### 3.5.1. Fitohormonas.

Algunos niveles de auxinas y combinaciones de auxinas y citoquininas influyen diferencialmente en las frecuencias de inducción de callo y regeneración de plantas, dependiendo del genotipo. Sin embargo, algunas combinaciones de fitohormonas, como la de 2 mg/l de 2,4-D y 2 mg/l de ANA son igualmente efectivas para la inducción de callo a partir de anteras de todos los genotipos (Cuadro 3). En la misma forma, la bencil adenina tiende a incrementar la frecuencia de diferenciación de órganos en callos provenientes de semillas de diversos genotipos (Cuadro 4). Además, cabe destacar que las anteras de ninguno de los materiales forman callo cuando se cultivan sobre un medio desprovisto de hormonas (Cuadro 3) y que las anteras de la población  $F_2$  del cruce CICA 4 x BG 90-2 no forman callo en ninguno de los tratamientos del medio de cultivo (Cuadro 1).

Cuadro 2

Inducción de callo a partir de diferentes tejidos de plantas de arroz ( $F_2$  de IR 262 x BG 90 - 2) usando varios niveles de 2, 4 - D

2, 4 - D (mg/l)	Raíz		Hoja		Embrión		Semilla	
	o/o de Callo	Tamaño $\bar{X}$ (mm)						
0	0	-	0	-	0	-	0	-
0.2	0	-	0	-	0	-	0	-
1.0	60	$\leq 1$	0	-	80	$> 5$	100	$> 5$
2.0	80	$\leq 1$	20	$\leq 1$	100	$> 5$	100	$> 5$
3.0	100	1 - 3	20	3 - 5	80	3 - 5	60	3 - 5
4.0	80	1 - 3	40	1 - 3	80	3 - 5	100	3 - 5
6.0	100	1 - 3	0	-	100	3 - 5	100	3 - 5
8.0	70	3 - 5	20	$\leq 1$	60	3 - 5	70	3 - 5

Medio: MS con 3 o/o sacarosa.

No. repeticiones : 10

Incubación : 30 días

Cuadro 3

Interacción del 2, 4 - D, ANA y Cinetina sobre la inducción de callo a partir de anteras de diferentes genotipos de arroz

Medio de cultivo*			Bluebonnet - 50		C - 159**		P - 2672***	
2, 4 - D (mg/l)	ANA (mg/l)	Cinetina (mg/l)	No. de anteras	o/o anteras con callo	No. de anteras	o/o anteras con callo	No. de anteras	o/o anteras con callo
0	0	0	115	0	95	0	105	0
2.0	0	0	306	12.7	262	5.7	121	0.8
2.0	0	0.5	146	0.7	125	7.2	114	1.8
2.0	2.0	0	150	15.3	187	11.2	168	5.4
0	4.0	0	254	8.7 <sup>1/</sup>	176	4.5 <sup>1/</sup>	154	1.3
0	4.0	2.0	304	5.6 <sup>1/</sup>	259	5.4 <sup>1/</sup>	137	3.7
			1275	8.0	1104	6.0	799	2.3

\* N<sub>6</sub> con 5 o/o de sacarosa

\*\* F<sub>2</sub>, IR 262 x BG 90 - 2

\*\*\* F<sub>2</sub>, Camponi x K<sub>8</sub>

1/ Algunos callos rediferenciaron plántulas en el mismo medio

Incubación: 45 días

Nota: Plantas donantes de anteras crecidas en el campo.

Lo anterior indica que el genotipo es un factor que determina la respuesta primaria de los tejidos al cultivo *in vitro*, pero que mediante la manipulación de los componentes del medio de cultivo, en este caso fitohormonas, es posible salvar la dificultad que presentan algunos materiales para la inducción de callo y regeneración de plantas o para incrementar sus frecuencias (Cornejo, Martín y Primo, 2; Chaleff, 3; Guha- Mukherjee, 12; Zhang, 32).

En cuanto al efecto de niveles y combinaciones de 2,4-D y ANA sobre el incremento en peso fresco y seco de callos no existe una tendencia clara y definida, ya que entre el nivel máximo y mínimo de 2,4-D y las combinaciones de 2,4-D y ANA, no se presentan diferencias significativas, pero sí entre estos y algunos niveles intermedios de 2,4-D (Cuadro 5). Además, las frecuencias de inducción de callo son muy similares. Esto sugiere, que no obstante ser la auxina requerida para la inducción de callo a partir de tejidos del arroz, su concentración no influye significativamente en la frecuencia e incremento de peso fresco y seco de los callos. Estos resultados son consistentes con los de Chaleff (3) y Ohira et al (24).

Por otra parte, cuando se utiliza ANA como única fuente de auxina para inducir la formación de callo en anteras, es posible rediferenciar plantas en el mismo medio de inducción (Cuadro 3). Este tratamiento ofrece la ventaja de evitar la transferencia de los callos a un medio sin auxina para inducir la rediferenciación, posiblemente porque el ANA, inhibe en menor grado y menos irreversiblemente la capacidad organogénica de las células del callo, como eventualmente si lo hace el 2,4-D (Chaleff y Stolarz, 4; Inoue y Maeda, 15; Institute of Genetic, 16).

En un medio desprovisto de hormona (Cuadro 4) también ocurre la rediferenciación de callos de arroz, lo cual es de gran significancia para la simplificación de los medios de cultivo como lo había reportado el Instituto de Genética (16).

### 3.5.2. Aditivos orgánicos.

Cuando se suplementa el medio de cultivo con aditivos orgánicos no existen diferencias significativas entre los tratamientos en cuanto al incremento en peso fresco y las frecuencias de inducción de callo; pero que sí se presentan en el incremento en peso seco de las semillas con callo (Cuadro 6).

En todos los casos en que se suplementa el medio basal con un aditivo de tipo orgánico, el peso seco de los callos aumenta significativamente, aunque las frecuencias de inducción de callo son muy similares en todos los tratamientos. Resultado que confirma los de Chaleff (3) y Oono (25) res-

Cuadro 4

Interacción de auxina y citoquininas en la organogénesis de callos provenientes de semillas de diferentes genotipos. Porcentajes sobre 10 repeticiones

Medio de Cultivo <sup>1/</sup>				C-144* o/o de Callos diferenciados		C-159** o/o de Callos diferenciados		P-2672*** o/o de Callos diferenciados	
ANA (mg/l)	Cinetina (mg/l)	BA (mg/l)	2 ip (mg/l)	con raíces	con vástagos y raíces	con raíces	con vástagos y raíces	con raíces	con vástagos y raíces
0	0	0	0	60	0	80	10	90	10
0.2	0	0	0	60	0	90	0	100	0
0.2	0	1.0	0	80	0	30	0	40	0
0	0	1.0	0	40	0	50	10	80	60
0	0	5.0	0	20	0	30	10	100	50
0.2	0	5.0	0	40	10	50	10	80	20
0	0	10.0	0	0	0	40	30	60	40
0.2	6.0	0	0	50	0	70	0	100	0
0	0	0	0.1	80	0	90	10	90	20

\* F<sub>2</sub>, CICA 4 x BG 90-2

\*\* F<sub>2</sub>, IR 262 x BG 90-2

\*\*\* F<sub>2</sub>, Camponi x Kg

1/ MS con 3 o/o sacarosa

Incubación: 45 días.

Cuadro 5

Efecto de niveles y combinaciones de dos auxinas sobre el crecimiento y la frecuencia de inducción de callo a partir de semillas de la variedad Bluebonnet - 50

Auxina		Peso fresco* (mg)	Peso seco* (mg)	o/o de inducción** de callo
2, 4-D (mg/l)	ANA (mg/l)			
0	0	-	-	0
0.2	0	-	-	0
0.5	0	209.2 b	21.7 b	95
1.0	0	158.4 d	17.0 d	100
2.0	0	215.6 b	20.2 bc	100
4.0	0	195.9 c	18.4 cd	95
8.0	0	228.1 ab	21.1 b	100
0	0.5	-	-	0
0	2.0	-	-	0
0	4.0	-	-	0
0	8.0	-	-	0
0.5	4.0	219.3 b	22.2 b	90
2.0	2.0	248.8 a	24.3 a	95
4.0	0.5	220.8 b	21.2 b	100

\* Promedios de 20 semillas que formaron callo

\*\* Porcentajes sobre 40 semillas

Medio: MS con 3 o/o sacarosa

Incubación: 30 días

Nota: Promedios seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales.

Cuadro 6

Efecto de algunos aditivos orgánicos sobre el crecimiento y la frecuencia de inducción de callo a partir de semillas de la variedad Bluebonnet - 50

Medio de cultivo*	Peso fresco** (mg)	Peso seco** (mg)	o/o de inducción*** de callo
MS + 2 mg/l 2, 4- D	98.8 a	10.9 c	100
MS + 2 mg/l 2, 4 - D + 1g/l E. L.	97.4 a	13.7 ab	100
MS + 2 mg/l 2, 4 - D + 1 g/l C. H.	93.4 a	12.6 b	100
MS + 2mg/l 2, 4 - D + 15 o/o L. C.	92.9 a	15.0 a	100
MS + 2mg/l 2, 4 - D + 5 o/o sacarosa	102.2 a	13.9 ab	100
N <sub>6</sub> + 2mg/l 2, 4 - D	78.9 a	14.8 ab	95

\* MS: Medio MS con 3 o/o de sacarosa

E. L.: Extracto de levadura

C. H. : Caseína hidrolizada

L. C. : Leche de coco

N<sub>6</sub> : Medio N<sub>6</sub> con 3 o/o de sacarosa

\*\* Promedios de 20 semillas que formaron callo

\*\*\* Porcentajes sobre 40 semillas

Incubación: 15 días

Nota: Promedios seguidos por la misma letra son estadísticamente iguales

Cuadro 7

Efecto de varios aditivos orgánicos sobre la frecuencia de inducción y rediferenciación de callos de anteras de la variedad Bluebonnet - 50

o/o Sacarosa	Aditivo orgánico*	No. de anteras	o/o de anteras con callo**	No. de callos	o/o callos diferenciados***	
					con raíces	con vástagos y raíces
1	-	217	1.4	-	-	-
5	-	238	6.7	30	10	0
10	-	270	4.4	17	59	41
5	E. L. 1 g/l	224	0	-	-	-
5	C. H. 1 g/l	263	2.3	20	10	5
5	L. C. 15 o/o	258	3.9	25	12	12
5	L. H. 1 g/l	224	1.8	-	-	-

\* E. L. : Extracto de levadura

C. H.: Casína hidrolizada

L. C.: Leche de coco

L. H.: Lactalbúmina hidrolizada

\*\* Medio de inducción de callo:  $N_6$  + 2.0 mg/l 2, 4 - D + 2.0 mg/l ANA

\*\*\* Medio organogénesis:  $N_6$  sin hormonas

Incubación: 45 días

Nota: Plantas donantes de anteras crecidas en el invernadero

pecto a que la clase y concentración de azúcares u otros aditivos en el medio de cultivo no son factores esenciales para la inducción de callo; y que también es consistente con los de Yatazawa (30) y Maeda (18), en el sentido de que la adición de dichas sustancias tiende a incrementar el crecimiento de los callos.

Con el 5 o/o de sacarosa se logran las más altas frecuencias de inducción de callo a partir de anteras (Cuadro 7), ratificando a Chu (9), el Instituto de Genética (16) y Tsai y Lin (27). Ninguno de los aditivos orgánicos estimula la frecuencia de inducción de callo por encima del medio control con 5 o/o de sacarosa; por lo contrario parecen tener un efecto detrimental sobresaliendo el extracto de levadura que inhibe la formación de callos.

Cuando se suplementa el medio de inducción con niveles de sacarosa al 6 o/o, leche de coco, lactalbúmina hidrolizada o caseína hidrolizada, la frecuencia de formación de callos no se afecta, pero los callos provenientes de anteras y formados en estos medios poseen una mayor capacidad para rediferenciar órganos y plantas; lo que indica que las fitohormonas y los aditivos orgánicos interaccionan sobre la inducción, crecimiento y diferenciación de los callos (Institute of Genetic, 16).

### 3.6. Iluminación.

La rediferenciación de vástagos no guardó relación con los regímenes altos (9 000 lux) y bajos (3 000 lux) de iluminación a que se sometieron los callos, aunque la síntesis de clorofila fue mayor con alta iluminación. Tampoco afectó la formación de raíces.

### 3.7. Edad del callo.

La capacidad organogénica disminuye conforme aumenta la edad del callo (20,60 y 90 días), siendo más notable en cuanto a la diferenciación de vástagos. La bencil adenina mantiene la capacidad de rediferenciación de vástagos en callos de todas las edades. El 2iP en cambio, parece no tener ningún efecto, al igual que el ANA y la cinetina, siendo estas dos últimas incapaces de inducir la rediferenciación de vástagos en todos los casos.

### 3.8. Tamaño del callo.

El porcentaje de callos provenientes de anteras que diferencian raíces y vástagos es prácticamente el doble en callos mayores de 2 mm que en los menores de 2 mm de diámetro. La formación de raíces fué mayor en callos de más de 5 mm, pero menor la de vástagos. La frecuencia de albinos también tiende a reducirse en callos mayores de 5 mm.

### 3.9. Estado de fenolización del callo.

Las frecuencias de rediferenciación son siempre mayores en callos sanos, sin áreas necróticas, generalmente producidas por fenolización extrema. Es importante destacar, sin embargo, que en los callos parcialmente necróticos se puede lograr la regeneración de plantas completas. Existe una relación entre la aparición de áreas necróticas en los callos y las condiciones de incubación, ya que altas temperaturas tienden a incrementar la frecuencia de callos necróticos.

### 3.10. Androgénesis y niveles de ploidía de las plantas.

Las plantas regeneradas a través del cultivo de tejido somático son generalmente diploides, dado que proceden de la multiplicación de células somáticas diploides (Nishi et al, 22). Sin embargo, aquellas plantas obtenidas del cultivo de anteras del arroz, provienen inicialmente de la multiplicación de células gaméticas haploides, las microsporas, y por lo tanto, la tendencia es a que se restablezcan individuos también haploides. Aun así, en las plantas que se regeneran a partir de anteras pueden ocurrir diferentes niveles de ploidía, incluyendo haploides, diploides, poliploides y aneuploides (Institute of Genetic, 16; Oono, 25; Yin et al, 31).

Lo cual se atribuye a fenómenos de endomitosis, fusión de núcleos, pérdida de cromosomas y otros cambios cariológicos que acontecen durante la fase del cultivo *in vitro* (Chen y Lin, 5; Chen, 6; Institute of Genetic, 16). Además, como las plantas diploides son generalmente homocigotas, se concluye que tienen su origen en la duplicación espontánea de los cromosomas durante el cultivo (Institute of Genetic, 16; Kucherenko, 17; Yin et al, 31).

Los callos obtenidos provenían de la multiplicación de células gaméticas que pasaban por diferentes estados de desarrollo, aumentando de tamaño y formando estructuras parecidas a proembriones globulares para dar origen a las formaciones callosas que posteriormente se diferenciaban en plantas.

Todas las plantas obtenidas mediante el cultivo de tejidos somáticos fueron fértiles (diploides) y crecieron en el invernadero hasta la madurez. De 24 plantas provenientes del cultivo de anteras, 15 (62.5 o/o) fueron diploides y 9 (37.5 o/o) haploides. Es posible que entre las plantas que murieron antes o después del trasplante, existieran algunos poliploides o aneuploides, como comunmente acontece. Las plantas haploides fueron fenotípicamente menos vigorosas que las diploides, destacándose por su menor altura, tamaño de sus hojas y panículas y su esterilidad.

Se ha sugerido que algunas variaciones fenotípicas entre plantas regeneradas a partir de tejido somático (Henke et al, 13; Kucherenko, 17; Nishi et al, 22) y de anteras (Murashige y Skoog, 21; Yin et al, 31) se deben a mutaciones que suceden en el proceso de cultivo *in vitro*.

Entre las plantas regeneradas en este ensayo se presentaron en algunos casos caracteres fenotípicos peculiares como variegación, acortamiento y malformación de la hoja bandera, esterilidad y la enfermedad fisiológica conocida como "espiga erecta". Además, existe cierta tendencia en las plantas regeneradas *in vitro* a presentar un mayor macollamiento.

#### 4. CONCLUSIONES

- 4.1. Las condiciones de crecimiento de la planta donante influyen sobre la respuesta de las anteras al cultivo *in vitro*.
- 4.2. Cuando la distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas de plantas en estado de prefloración oscila entre 3 y 6 cm, el estado de desarrollo de las microsporas en la panícula es el uninucleado, que es el más adecuado para el cultivo *in vitro* de las anteras.
- 4.3. El genotipo, es el factor más determinante de la respuesta de los tejidos de la planta de arroz, *Oryza sativa* L. al cultivo *in vitro*.
- 4.4. Los requerimientos de auxina para la inducción y crecimiento de callos varía con la clase de tejido.
- 4.5. Medios de cultivo adecuados incrementan las frecuencias de inducción de callo y regeneración de plantas dentro de un mismo genotipo.
- 4.6. No existen diferencias significativas entre los niveles de auxina requeridos para la inducción y el crecimiento de callos.
- 4.7. La combinación de 2.0 mg/l de ácido diclorofenoxiacético (2,4-D) y 2.0 mg/l de ácido naftalenacético (ANA) es óptima para la formación y crecimiento de callos a partir de semillas y anteras de todos los genotipos.
- 4.8. Mediante el uso del ANA para la inducción de callos a partir de anteras, es posible lograr la diferenciación de plantas en el mismo medio.
- 4.9. La suplementación del medio de inducción de callo con aditivos de tipo orgánico, no influye sobre las frecuencias de inducción de callos, pero tiende a estimular su crecimiento y la subsecuente rediferenciación de órganos en los mismos.

- 4.10. La bencil adenina, es la única citoquinina capaz de estimular la regeneración de vástagos en callos procedentes de semillas.
- 4.11. Un nivel alto de iluminación (9 000 lux) incrementa la síntesis de clorofila en callos, pero no influye sobre la organogénesis.
- 4.12. La capacidad de diferenciación de vástagos disminuye con la edad del callo.
- 4.13. Callos con áreas necróticas al momento del transplante, poseen menor capacidad para rediferenciar órganos.
- 4.14. Callos de 2 - 5 mm de diámetro provenientes de anteras, exhiben una mayor habilidad organogénica.
- 4.15. Es posible regenerar plantas haploides y/o haploides dobladas mediante el cultivo de anteras.

## 6. BIBLIOGRAFIA

1. BAJAJ, Y, P. S. Implications and prospects of protoplast, cell, and tissue culture in rice improvement programs. In: Innovative approaches to rice breeding. Los Baños, IRRI, 1980, pp 93-102.
2. CORNEJO M, M. J. y PRIMO, E. M. Factores que afectan la organogénesis en cultivos celulares de arroz. INIA (España) 9: 25-32. 1979.
3. CHALEFF, R. S. Tissue culture in rice improvement: an overview. In: Innovative approaches to rice breeding. Los Baños, IRRI, 1980. pp 81-91.
4. ————— and STOLARZ, A. Factors influencing the frequency of callus formation among culture rice (*Oryza sativa* L.) anthers. A paper presented at a special planning conference on rice tissue culture. IRRI, Los Baños, 28-30 April. 1980.
5. CHEN, C. C. and LIN, M. H. Induction of rice plantlets from anther culture. Bot. Bull. Acad. Sinica 17: 18-24. 1976.
6. —————. *In vitro* development of plants from microspores of rice. *In vitro* 13 (8): 484-489. 1977.

7. ————. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. *Crop Sci.* 18: 905-906. 1978.
8. CHU, C. C. et al. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica* 18 (5): 660-658. 1975.
9. CHU, C. C. The anther culture of rice and its significance in distant hybridization. A paper presented at a special planning conference on rice tissue culture. IRRI, Los Baños, 28-30 April. 1980.
10. CHUNG, G. S. Progress of tissue culture work on rice in Korea. A paper presented at a special planning conference on rice tissue culture. IRRI, Los Baños, 38-30 April. 1980.
11. GENOVESI, A. D. and MAGILL, C. W. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop Sci. Soc. Am.* 19 (5): 662-664. 1979.
12. GUHA-MUKHERJEE, S. Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. *J. Exp. Bot.* 24(78): 139-144. 1973.
13. HENKE, R. R. et al. Organogenesis and plantlet formation from organ-derived calli of rice (*Oryza sativa* L.). *Physiol. Plant.* 44: 11-14. 1978.
14. INOUE, M. and MAEDA, E. Effect of auxin concentration on the callus induction from various organs of rice seedlings. *Crop. Sci. Soc. Japan* 45(4): 545-557. 1976.
15. ————. Absorption and metabolism of radioactive auxins in the induced rice callus. *Crop. Sci. Soc. Japan* 48 (1): 1-9. 1979.
16. INSTITUTE OF GENETIC, 2 ND. DIVISION, 3 RD. LABORATORY, ACADEMIA SINICA. Investigation on the induction and genetic expression of rice pollen plants. *Scientia Sinica* 17 (2): 209-226. 1974.
17. KUCHERENKO, L. A. Tissue culture in rice improvement: Experiences in the USSR. In: *Innovative approaches to rice breeding*. Los Baños, IRRI, 1980. pp. 39-102.

18. MAEDA, E. Callus formation and isolation of single cells from rice seedlings. *Crop Sci. Soc. Japan* 34 (2): 139-148. 1965.
19. ———. Varietal difference in callus formation of rice seeds under sterile culture. *Crop. Sci. Soc. Japan* 36 (3): 233-239. 1967.
20. MUKHERJEE, P, and MUKHERJI, D. K, A simple propionorcin squash technique for the kariomorphological studies in rice (*Oryza sativa* L.). *Current Sci.* 48 (11): 496-497. 1979.
21. MURASHIGE T. and SKOOG F. A derived medium for rapid growth and bioassay tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497. 1962.
22. NISHI, T. et al. Organ redifferentiation and plant restoration in rice callus. *Nature* 219: 508-509, 1968.
23. ———. The role of auxins in differentiation of rice tissues cultured *in vitro*. *Bot. Mag. Tokyo* 86: 183-188. 1973.
24. OHIRA, et al. Studies on the nutrition of rice cell I. A simple, defined medium for rapid growth in suspension culture. *Plant Cell Physiol.* 14: 1113-1121. 1973.
25. OONO, K. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa* L.) by anther culture and their use for breeding. *Bull. Natl. Agric. Sci. Japan Ser. D* 26: 139-222. 1975.
26. RUSH, M. C. et al. Protoplast, cell and rice, tissue culture: prospects for the future. A paper presented at a special planning conference on rice culture. IRRI, Los Baños, 28-30 April. 1980.
27. TSAI, S. and LIN, M. Production of rice plantlets by anther culture. *J. Agric. Res. China* 26 (2): 100-112. 1977.
28. WANG, C. C. et al. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. *Acta Bot Sin.* 1: 52-53. 1974.
29. WU, L. and LI, H. W. Induction of callus tissues initiation from different somatic organs of rice plant by various concentrations of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid. *Cytologia* 36: 411-417. 1971.

30. YATAZAWA, M., et al. Growth of callus tissue from rice-root **in vitro**. *Plant Cell Physiol.* 8: 363-373. 1967.
31. YIN, K. C. et al. A study of the new cultivar of rice raised by haploid breeding method. *Scientia Sinica* 19 (2): 227- 242 . 1976.
32. ZHANG, Z. H. Application of anther culture technique to rice breeding. A paper presented at a special planning conference on rice tissue culture. IRRI, Los Baños, 28- 30 April. 1980.