

# Capítulo 24

## Cultivo de anteras de arroz

F. J. Zapata\*  
L. B. Torrizo\*  
R. O. Romero\*  
S. T. Mercy\*

---

\* International Rice Research Institute (IRRI), Manila, Filipinas.

## Introducción

Los últimos avances en el cultivo de anteras ofrecen nuevas posibilidades para la aplicación de esta técnica en los programas de fitomejoramiento. Mediante el cultivo de anteras se han regenerado plantas haploides de especies de los géneros *Solanum* (Irikura, 1975), *Petunia* (Sangwan y Norreel, 1975), *Hordeum* (Foroughi-Wehr et al., 1976), *Nicotiana* (Nakamura e Itagaki, 1973) y *Triticum* (Wei, 1982), entre otras.

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 (Niizeki et al., 1968; Guha-Mukherjee, 1973; Chaleff et al., 1981). 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.

El estado de desarrollo del polen en el momento de la inoculación es crítico para la inducción de la androgénesis. En el 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 (Chen, 1977; Sun, 1978).

Para mejorar la producción de callos y la regeneración de plantas se han utilizado tratamientos físicos tales como el estrés con frío (Nitsch, 1974; Sunderland et al., 1979). Se ha estudiado el efecto del enfriamiento de las panículas antes del cultivo de anteras, sometiéndolas a diferentes temperaturas, y se ha obtenido una máxima inducción de callos con 10 a 14 días a 13 °C (Genovesi et al., 1979). En anteras de arroz mantenidas a 10 °C durante 4 a 8 días, la inducción de callos fue del 10%, mientras que las anteras no tratadas sólo tuvieron un 2% de callos (Hu et al., 1978).

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 obtuvo un aumento en la producción de plantas (Chu, 1978; Zapata et al., 1982). Con las anteras de *Nicotiana* también se han encontrado diferencias en la respuesta al medio líquido o semisólido (Wernichke y Kohlenback, 1976).

En el presente capítulo se discutirán los resultados que el IRRI ha obtenido últimamente en relación con diferentes factores que inciden en la capacidad formadora de callos y en la regeneración de plantas verdes a

partir de anteras de arroz. Se emplearon dos variedades de arroz japónica: Taipei 309 y Giza 170.

## Estudios Adelantados

### Estado de desarrollo del polen

En el campo se recolectaron panículas jóvenes de la variedad Taipei 309 y se esterilizaron superficialmente con una solución al 19% (v/v) de blanqueador comercial (NaClO) durante 20 minutos; posteriormente las panículas, o partes de ellas, se colocaron en cajas Petri (9 cm de diámetro) con agar al 1.5% (v/v).

Se tomaron dos flores, una de la parte superior de la panícula y otra de la parte inferior, y se fijaron durante 24 horas en ácido acético glacial y etanol 95% en una proporción 1:3, más 0.5% de cloruro férrico; luego las anteras fijadas se colorearon con 2.0% de acetocarmín (2.0 g de carmín en 100 ml de ácido acético al 45%), con el objeto de determinar en el microscopio el estado de desarrollo del polen. Las anteras que contenían granos de polen en estado uninucleado medio a tardío, o binucleado temprano a medio, se sembraron en los medios líquidos E-10 y G-4, a una densidad de 6 anteras por ml del medio.<sup>1</sup>

Tanto las anteras que contenían polen uninucleado como las que tenían polen binucleado produjeron callos, pero la producción de callos fue menor en este último estado (Cuadro 24.1); las anteras de la variedad

Cuadro 24.1. Eficiencia en la producción de callos en la variedad Taipei 309 a partir de anteras con granos de polen uninucleados o binucleados, en dos medios de cultivo.

Estado del polen	Medio usado <sup>a</sup>	Anteras sembradas (no.)	Callos producidos (no.)
Uninucleado	E-10	700	6819
	G-4	975	6136
Binucleado	E-10	775	2639
	G-4	325	1106

a. Ver Apéndice F.

1. Ver Apéndice F.

Taipei 309 que contenían polen uninucleado produjeron dos o tres veces más callos que aquellas en las cuales el polen se encontraba en la etapa de desarrollo binucleado.

Cuando las cajas Petri se mantenían estacionarias, las anteras se dividían longitudinalmente y formaban los proembriones; los callos formados a partir de los proembriones individuales se sumergían en el medio de cultivo. Estos resultados concuerdan con los de Chen (1977), quien encontró en *Oryza sativa* var. Taiwan 5 un máximo de producción de callos y regeneración de plantas verdes cuando el polen se encontraba en la etapa uninucleada tardía.

### Tratamiento con frío

Se colocaron anteras en un medio líquido o semisólido y se sometieron a un tratamiento de frío, a 8 °C durante 0 a 8 días. Posteriormente se incubaron en cajas Petri bajo luz tenue a  $25 \pm 1$  °C.

La mayor inducción de callos se obtuvo de las anteras sometidas al tratamiento con frío durante 8 días (Cuadro 24.2), cuando se logró un aumento en la producción de callo de casi el 100% sobre el testigo. También se obtuvo una alta eficiencia con las anteras tratadas durante 14 días, pero en este caso aumentó el número de plantas albinas que regeneraron.

El aumento en la producción de callos mediante el tratamiento con frío de las anteras de arroz también ha sido demostrado por otros investigadores (Chaleff et al., 1975; Genovesi et al., 1979; y Chaleff et al., 1981).

Cuadro 24.2. Efecto del tratamiento con frío (8 °C) en las anteras de la variedad Taipei 309 sembradas en el medio semisólido J-19.

Duración del tratamiento (días)	Anteras sembradas (no.)	Anteras productoras de callo (no.)	Eficiencia (%)
0	377	20	5.3
2	345	18	5.2
4	346	14	4.0
8	348	36	10.3
12	325	16	4.9
14	337	30	8.9
16	325	17	5.2
18	329	25	7.6

Probablemente, el frío retrasa la senescencia de los tejidos somáticos de las anteras, lo que da como resultado un mayor porcentaje de granos viables de polen y desencadena la inducción de proembriones.

### Medios para la inducción de callos

En este estudio se usaron anteras de la variedad Taipei 309 que tenían polen en la etapa uninucleada tardía, empleando dos medios para la inducción de callos: a) el medio J-19 que contiene los macronutrientes, los micronutrientes y las vitaminas del medio B-5 (Gamborg et al., 1968), 160 mg/litro de mioinositol, 1 mg/litro de ANA, 1 mg/litro de KIN, y 20 g/litro de sacarosa, con pH ajustado a 5.6; b) el medio E-24 que tiene los macronutrientes, los micronutrientes y las vitaminas del medio B-5, con 160 mg/litro de mioinositol, 1 mg/litro de 2,4-D, 0.5 mg/litro de AIA, 0.5 mg/litro de BAP, 20 g/litro de sacarosa, 5 g/litro de glucosa, y el pH ajustado a 5.6.

Los medios se usaron tanto en forma líquida como semisólida, y para solidificarlos se les añadió 0.8% de agar; luego se esterizaron en el autoclave a 1.2 kg/cm<sup>2</sup>, durante 5 minutos. La densidad del cultivo fue de 6 anteras por mililitro.

La producción de callos resultó más eficiente en los medios líquidos que en los semisólidos, tanto en el caso del E-24 como en el del J-19 (Cuadro 24.3); el aumento porcentual en el medio E-24 fue de 24 veces más en el medio líquido respecto al semisólido, y de 15 veces más en el J-19. Aunque la producción de callos de las anteras sembradas en los medios semisólidos fue alta (Chen, 1977; Chaleff et al., 1981), el número de granos de polen activados para seguir la vía de la androgénesis fue mínimo, debido tal vez a la competencia entre los granos de polen.

Cuadro 24.3. Producción de callos de anteras de Taipei 309 en medio semisólido y en medio líquido.

Medio de cultivo	Anteras sembradas (no.)	Anteras productoras de callo		Producción de callo (no.)
		(no.)	(%)	
<b>J-19</b>				
líquido	507	—	—	1644
semilíquido	515	127	24.7	—
<b>E-24</b>				
líquido	177	—	—	1201
semisólido	384	87	22.7	—

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 nutrimentos (Wernicke y Kohlenback, 1976). Por otra parte, el agar comercial contiene contaminantes que pueden impedir el desarrollo del polen (Chaleff et al., 1981).

## **Medios para la regeneración de plantas**

Se escogieron aleatoriamente callos de 1 mm de diámetro de las variedades Taipei 309 y Giza 170 y se colocaron individualmente sobre papel filtro Whatman no. 1 dispuesto en forma de M (en puente de papel); luego se insertaron en tubos de ensayo que contenían medio líquido de Murashige y Skoog (1962) con 30 g/litro de sacarosa, 1 mg/litro de ANA y 1 mg/litro de KIN; el pH era 5.8 (medio N-19).<sup>2</sup> Los callos sembrados se colocaron durante 4 semanas a 800 lux, 8 horas/día.

La regeneración de plantas se observó en el sistema del puente de papel, o cuando los callos se transfirieron al mismo medio (N-19) solidificado con 0.8% (v/v) de agar durante 4 semanas. En la variedad Taipei 309, los callos derivados de las anteras que se habían cultivado en el medio líquido E-24, produjeron plantas verdes al sembrarlos en medio N-19 en un 46.7% de los casos; los callos de anteras cultivadas en medio líquido J-19 regeneraron plantas en un 31.0%.

La mayor eficiencia de regeneración de plantas de los callos inducidos con el medio E-24 se puede deber a la presencia de 2,4-D, el cual acelera la producción de brotes en el arroz al aumentar la síntesis de citocininas (Inoue et al., 1979; Yao et al., 1981). Esta condición puede producir una relación óptima auxina-citocinina, relación que es necesaria para la inducción de los brotes. Podría suceder que, en granos de polen seleccionados por su capacidad para producir callos altamente embriogénicos, el 2,4-D desencadenara esa producción. Esto apoya la observación de que en el arroz los callos inducidos de anteras que se han cultivado en un medio con 2,4-D, y posteriormente se han sembrado en un medio sin reguladores del crecimiento, tienen la capacidad para regenerar plantas (Woo y Su, 1975).

---

2. Ver Apéndice F.

En otro experimento de regeneración de plantas se cultivaron en el medio líquido E-24 los callos derivados de anteras de las variedades Taipei 309 y Giza 170; después se subcultivaron en el medio semisólido N-19. Se observó que la respuesta de los genotipos es diferente; el número de plantas regeneradas con la variedad Giza 170 fue casi el doble que con la variedad Taipei 309 (Cuadro 24.4). Un estudio de Guha-Mukherjee (1973) hizo hincapié en las diferencias que existen entre los genotipos de arroz con respecto a su capacidad para producir callos o plantas; al utilizar el cultivo de anteras se regeneraron 1000 plantas verdes de la variedad Taipei 309 y 600 de la variedad Giza 170; las plantas se originaron de partes individuales del callo. En la mayoría de los casos, un callo produce más de un brote, lo que aumenta el número total de plantas verdes producidas.

Cuadro 24.4. Producción de callos y regeneración de plantas verdes de las variedades de arroz Taipei 309 y Giza 170.

Variedad	Anteras sembradas (no.)	Callos producidos (no.)	Callos sembrados para regeneración (no.)	Callos con puntos verdes		Plantas verdes producidas	
				(no.)	(%) <sup>a</sup>	(no.)	(%) <sup>a</sup>
Taipei 309	415	729	31	11	36	38	122
Giza 170	316	874	38	26	68	70	184

a. Con relación al número de callos sembrados para la regeneración de plantas (columna 4).

## Obtención de Diploides Homocigóticos

### Determinación de niveles de ploidía

De las plantas regeneradas en el experimento descrito anteriormente se tomaron muestras al azar y se recolectaron panículas jóvenes (cuando la distancia de la aurícula estaba entre 0 y 1 cm); las panículas se fijaron, entre las 10 a.m. y las 12 p.m., en una mezcla (3:1) de etanol:ácido acético, con 0.5% (v/v) de cloruro férrico, y se conservaron en etanol al 70%. El número cromosómico de las células madre del polen se determinó mediante el frotis fresco de anteras coloreadas con 2% de acetocarmin.

En la variedad Taipei 309, de 33 plantas regeneradas que se seleccionaron aleatoriamente 24 eran haploides, 8 diploides y 1 hipotetraploide; en la variedad Giza 170, una muestra de 24 plantas presentaba 18 haploides, 5 diploides y 1 triploide.

## Tratamiento con colchicina

Es deseable obtener plantas diploides homocigóticas. Las plantas haploides de arroz son completamente estériles, tienen espiguillas más pequeñas y hojas más estrechas, y producen más macollas que las plantas diploides.

Con el fin de obtener diploides homocigóticos a partir de las plantas haploides generadas en los trabajos anteriores, se cortaron tallos y raíces de 15 y 5 cm respectivamente, a partir de la corona. Luego se sumergieron en una solución de colchicina preparada así: se disolvió 0.1 g de colchicina en 2 ml de dimetilsulfóxido (DMSO), se añadieron 4 gotas de Tween-20, y se completó el volumen hasta 100 ml, con agua destilada.

Este tratamiento produjo duplicación de cromosomas en el 35% de las plantas haploides. Actualmente las plantas regeneradas se están cultivando y seleccionando de acuerdo con las variaciones en las características agronómicas que puedan presentar en el campo.

## Referencias

- Blaydes, D. F. 1966. Interaction of kinetin and various inhibitors in the growth of soybean tissue. *Physiol. Plant.* 19:748-753.
- Chaleff, R. S.; Hill, S. R. y Dunwell, J. M. 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* 13:484-489.
- Chu, C. 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, China. p. 43-50.
- Foroughi-Wehr, B.; Mix, G.; Gaul, H. y Wilson, H. M. 1976. Plant production from cultured anthers of *Hordeum vulgare* L. *Z. Pflanzenzücht* 77:198-204.
- Gamborg, O. L.; Miller, R. A. y Ojima, K. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Experimental Cell Research* 50:151-158.
- Genovesi, A. D. y Magill, C. W. 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. *Crop. Sci.* 19:662-664.



- Guha-Mukherjee, S. 1973. Genotypic differences in the in vitro formation of embryoids from rice pollen. *J. Exp. Bot.* 24:139-144.
- Hu, C.; Huang, S. C.; Ho, C. P.; Liang, H. C.; Huang, C. C. y Peng, L. P. 1978. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, China. p. 87-95.
- Inoue, M.; Maeda, E.; Yoshida, R. y Oritani, T. 1979. On the occurrence of a high content of cytokinins in rice callus tissues. *Plant and Cell Physiol.* 20:917-924.
- Irikura, Y. 1975. Induction of haploid plants by anther culture in tuberbearing species and interspecific hybrids of *Solanum*. *Potato Res.* 18:133-140.
- Keller, W. A. y Arms Strong, K. C. 1978. High frequency production of microspore-derived plants from *Brassica napus* anther cultures. *Z. Pflanzenzücht.* 80:100-108.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nakamura, A. y Itagaki, R. 1973. Anther culture in *Nicotiana* and the characteristics of the haploid plants. *Japan J. Breed.* 23:71-78.
- Niizeki, H. y Oono, K. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jap. Acad.* 44:554-557.
- Nitsch, C. 1974. Pollen culture: A new technique for mass production of haploid and monozygous plants. En: Kasha, K. J. (ed.). *Haploids in higher plants: Advances and potential*. University of Guelph, Guelph, Ontario, Canadá. p. 123-135.
- Sangwan, R. S. y Norreel, B. 1975. Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured in vitro. *Nature* 257:222-224.
- Stolarz, A. 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. *Physiol. Plant.* 51:201-206.
- Sun, C. S. 1978. Androgenesis of cereal crops. En: Proceedings of a symposium on plant tissue culture. Science Press, Pekín, China. p. 117-123.
- Sunderland, N. y Roberts, M. 1979. Cold-pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann. Bot.* 43:405-414.
- Wei, Z. M. 1982. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. *Theor. Appl. Genet.* 63:71-73.
- Wernicke, W. C. y Kohlenback, H. W. 1976. Investigations on liquid medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. *Z. Pflanzenphysiol.* 79:189-198.

- Woo, S. C. y Su, H. Y. 1975. Double haploid rice from indica and japonica hybrids through anther culture. *Bot. Bull. Academia Sinica* 16:19-24.
- Yao, D. Y. y Krikorian, A. D. 1981. Multiplication of rice (*Oryza sativa* L) from aseptically cultured nodes. *Ann. Bot.* 48:255-259.
- Zapata, F. J.; Torrizo, L. B.; Romero, R. O. y Alejar, M. S. 1982. Androgenesis in *Oryza sativa*. En: Fujiwara, A. (ed). *Proceedings of the Fifth International Congress on Plant Tissue and Cell Culture*. Tokio, Japón. p. 531-532.