UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

FACULTAD DE AGRONOMIA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

IRRADIACION DE SEMILLAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) CON RAYOS GAMMA (Co-60) Y SU EFECTO SOBRE LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS, UTILIZANDO DIFERENTES SOLIDIFICADORES EN EL MEDIO DE CULTIVO.

TESIS

PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA

DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

POR

RAUL ENRIQUE MACZ MARQUEZ

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

LICENCIADO

GUATEMALA NOVIEMBRE DE 1994

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DR. JAFETH ERNESTO CABRERA FRANCO

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO:	ING. AGR. EFRAIN MEDINA GUERRA
VOCAL PRIMERO	ING. AGR. MAYNOR ESTRADA ROSALES
VOCAL SEGUNDO	ING. AGR. WALDEMAR NUFIO REYES
VOCAL TERCERO	ING. AGR. CARLOS ROBERTO MOTTA
VOCAL CUARTO	PROF. GABRIEL AMADO ROSALES
VOCAL QUINTO	BR. AUGUSTO SAUL GUERRA
SECRETARIO	ING. AGR. MARCO R. ESTRADA MUY

Guatemala, Noviembre de 1,994

Honorable Junta Directiva
Honorable Tribunal Examinador
Facultad de Agronomía
Universidad de San Carlos de Guatemala

Señores Miembros:

De conformidad con las normas establecidas por la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a vuestra consideración, el trabajo de tesis titulado:

" IRRADIACION DE SEMILLAS DE ARROZ (Oryza sativa L.) CON RAYOS GAMMA (Co-60) Y SU EFECTO SOBRE LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS, UTILIZANDO DIFERENTES SOLIDIFICADORES EN EL MEDIO DE CULTIVO. "

Como requisito previo a optar el título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola en el grado académico de Licenciado.

Atentamente,

RAUL ENRIQUE MACZ MARQUEZ.

ACTO QUE DEDICO

A Dios.

A mi madre:

Herlinda Marquez

Este logro es suyo madre bendita,

gracias por su amor, comprensión

y cariño.

A mi padre:

Bernardo macz crismas (Q.E.P.D.)

Flores sobre su tumba, y que esta

sea una recompensa a su esfuerzo y amor

TESIS QUE DEDICO

A: Guatemala, como un pequeño aporte a la investigación cientifica, para el futuro de nuestro país.

Mis Hermanos, Haroldo, Jorge Bernardo, Jorge Gabriel, Roberto.

Mis Hermanas, Yoly, Tina, Mirian, Ericka, Ana, y en especial a mi hermana Carmen.

Mi Esposa, Claudia Renata Román.

Mis Sobrinos.

Mis Cuñados.

Mis Amigos, en especial a Herbert Mansilla, José Quiñones, Gustavo de León, Gustavo Gomez, Aracely Gonzalez, Marvin Maldonado.

Mis Compañeros de Trabajo, Luis Molina, Juan José Lopez, Antonieta ALfaro, Maritza García, Isidro Chen, Roberto Estrada, Luis Lopez.

La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

SINCEROS AGRADECIMIENTOS

A: MIS ASESORES ING. AGR. ROMEO MONTEPEQUE

ING. AGR. HECTOR RAMAZZINI

Por su valiosa asesoría, supervisión, revisión y toda la ayuda desinteresada que me brindaron en la elaboración de este trabajo.

SECCION DE AGROPECUARIA DE LA DIRECCION GENERAL DE ENERGIA NUCLEAR

COMPANERO SEBASTIAN HERNANDEZ

Por su valiosa colaboración

Los datos presentados en este trabajo fueron recabados con la utilización de recursos de la Sección de Agropecuaria de la Dirección General de Energía Nuclear, con fondos del proyecto de asistencia técnica GUA/5/008 y contrato de investigación 4675/RB/R3 del Organismo Internacional de Energía Atómica, en coordinación con la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

CONTENIDO

INDICE DE FIGURAS

INDICE DE CUADROS EN EL DOCUMENTO

INDICE DEL APENDICE

IRRADIACION DE SEMILLAS DE ARROZ (Oryza sativa L.) CON RAYOS GAMMA (Co-60) Y SU EFECTO SOBRE LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS, UTILIZANDO DIFERENTES SOLIDIFICADORES EN EL MEDIO DE CULTIVO.

RICE (Oryza sativa L.) SEEDS IRRADIATION WITH GAMMA RAYS (Co-60) AND ITS EFFECT ON ANTHER CULTURE, USING DIFFERENT GELLING AGENTS ON THE MEDIUM.

RESUMEN

En el presente informe se dan a conocer los resultados obtenidos de la investigación titulada IRRADIACION DE SEMILLAS DE ARROZ(Oryza sativa.L) CON RAYOS GAMMA (Co-60) Y SU EFECTO SOBRE LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS, UTILIZANDO DIFERENTES SOLIDIFICADORES EN EL MEDIO DE CULTIVO.

Los genotipos de arroz evaluados fueron seis (Precozicta,Crispo-38, polochic, Virginia, Pico Negro y Linea-50).El arroz fué sembrado en macetas plásticas bajo condiciones de invernadero, se utilizaron seis macetas por dosis de radiación, haciendo un total de dieciocho macetas por tratamiento. Las paniculas de arroz fueron recolectadas con anteras en estado uninucleado. Estas paniculas fueron pretratadas a 5 grados centigrados, durante 5 días, luego fueron extraidas sus anteras para ser sembradas en los medios de inducción de callos, (N6), complementado con acido Naftalenacetico 2 mg/l, y acido Diclorofenoxiacetico 2 mg/l, hasta la formación de microcallos. La unidad experimental

estuvo constituida por 750 anteras de arroz sembradas en 30 cajas petri, sembrando 25 anteras por caja petri. Los callos obtenidos fueron trasladados a un medio de regeneracion de plantas (N6), complementado con acido naftalenacetico 0.5 mg/l y Kinetina 1 mg/l. Los tratamientos resultantes fueron evaluados estadisticamente a través de u diseño de bloques completamente al azar con arreglo en parcelas divididas con tres repeticiones. A Los resultados obtenidos de la fase de inducción de callo se les realizó su análisis de varianza (ANDEVA),encontrandose diferencias significativas entre VARIEDADES,GELIFICANTES O SOLIDIFICADORES y en la interacción VARIEDADES X SOLIDIFICANTES, por lo que a cada uno de estos fué necesario hacerle su prueba de medias DUNCAN'S, llegando a la conclusión que la variedad Precozicta y Pico Negro respondieron mejor que las otras variedades, obteniendo una media de (2.829 y 1.732) Respectivamente. El solidificador Agarosa obtuvo la media mas alta (0.7190) en comparación con el solidificador Extracto de Arroz (0.202). Mientras que en la interacción VARIEDAD X SOLIDIFICADOR, La variedad Precozicta con el solidificador Agarosa, obtuvo la media más alta (2.070), seguida por la variedad Pico Negro con el solidificador Extracto de Arroz (1.540).

Se concluye que los tratamientos donde se utilizó la dosis de 15 Kilorad de radiación, tanto para el solidificador (agarosa como para el solidificador extracto de arroz), la variedad precozicta presento los porcentajes de formación de callo más altos (2.93 y 1.11) respectivamente.

1. INTRODUCCION

El arroz es uno de los componentes fundamentales de la dieta alimenticia guatemalteca. Con el desarrollo de la genética y su aplicación al fitomejoramiento se han obtenido variedades de mayor rendimiento y mejor calidad, más tolerantes a distintas plagas, enfermedades y adaptadas a diversas condiciones climáticas o de suelo (3).

El arroz es superior nutricionalmente a muchos otros alimentos ricos en carbohidratos. El contenido de proteína del grano, aunque sujeto a cambios varietales y ambientales, promedia cerca del 7% en el arroz molinado y 8% en el arroz integral (6).

La calidad de la proteína del arroz, es básicamente una función del contenido de proteína del grano, algunos aminoácidos esenciales, incluyendo la licina, el triptófano y la treomina, disminuyen un poco a medida que aumenta la proteína, pero la proporción de estos aminoácidos no decrece tan rápidamente como aumenta la proteína (6).

En la actualidad los métodos de mejoramiento utilizando el cultivo <u>in vitro</u>, dentro de ellos el cultivo de anteras, nos puede permitir obtener varidades de arroz en corto tiempo, para ello se hace necesario evaluar la respuesta de las diferentes variedades o líneas a la inducción de callo y regeneración de plantas, ya que el cultivo de anteras constituye una alternativa bastante útil, puesto que permite entre otras cosas la obtención de plantas haploides y de líneas diploides homocigotas a partir

del cultivo *in vitro* de anteras que contienen granos de polen inmaduros.

En este trabajo se evaluó la respuesta de seis genotipos de arroz, a la inducción de callo y regeneración de plantas utilizando diferentes dosis de radiación gamma (0, 15 y 30 Krd) como también diferentes solidificadores en el medio (agarosa y extracto de arroz) para ver la influencia que tienen en la consistencia del medio a partir del cultivo de anteras, siendo éste un trabajo básico para futuras investigaciones.

El propósito de evaluar dosis de radiación obedece a que en otros países, este mutagénico ha sido utilizado para incrementar la formación de callos y regeneración de plantas en las variedades de arroz de tipo indica. Segun lo comfirman los estudios realizados por los doctores Zapata(19) y Chung (4) los cuales concluyen que a través de la radiación se produce el rompimiento de enlaces en el caracter de culturabilidad entre los caracteres agronómicos inherentes al arroz indica, lo que permite expresar el caracter de culturabilidad, incrementando la regeneración de plantas verdes a partir del cultivo de anteras.

2. DEFINICION DEL PROBLEMA

La mayor parte de variedades de arroz que se cultivan en Guatemala, pertenecen al grupo de arroz índica, y son muy pocas las investigaciones que se han realizado utilizando la técnica de doble haploide. Técnica que en otros paises ha sido incorporada en programas de mejoramiento genético para la obtención de variedades de arroz en menor tiempo, Tomando en consideración que el porcentaje de regeneración de plantas es muy bajo a partir del cultivo de anteras de variedades de arroz del grupo índica. Por tal razón es indispensable realizar estudios en diferentes genotipos, solidificadores, dosis de radiación etc. Los cuales permitan optimizar el método para la producción de plantas doble haploide de arroz, y así establecer las bases para realizar un programa de mejoramiento genético de arroz índica, utilizando la técnica de cultivo de anteras para estimular la inducción de callo y regeneración de plants. Ya que en Guatemala se puede aprovechar la ventaja de lograr homocigosis rapida, combinado con inducción de mutaciones que ya se está trabajando conjuntamente entre el Instituto de Ciencia y Tecnología Agricolas (ICTA) y la Dirección General de Energía Nuclear (DGEN) para el mejoramiento genético del arroz.

3. MARCO TEORICO

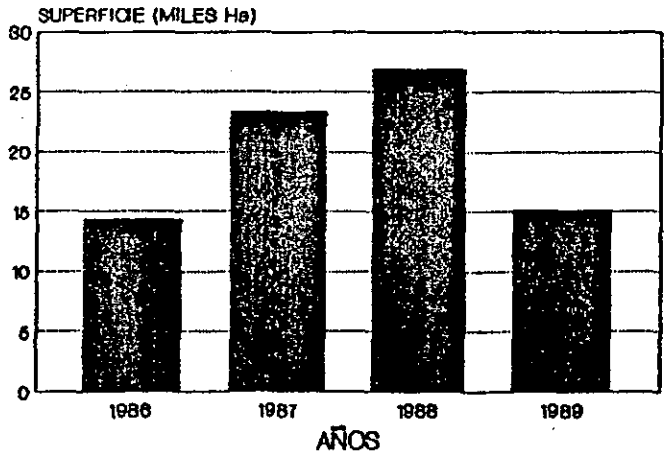
3.1 Marco Conceptual

3.1.1 Cultivo de Arroz (Oryza sativa L.)

En base a estadísticas agropecuarias de USPADA (8), la agricultura nacional guatemalteca gira en torno a tres grupos de cultivos:

- Consumo Interno
- Tradicionales de Exportación y
- No Tradiconales de Exportación

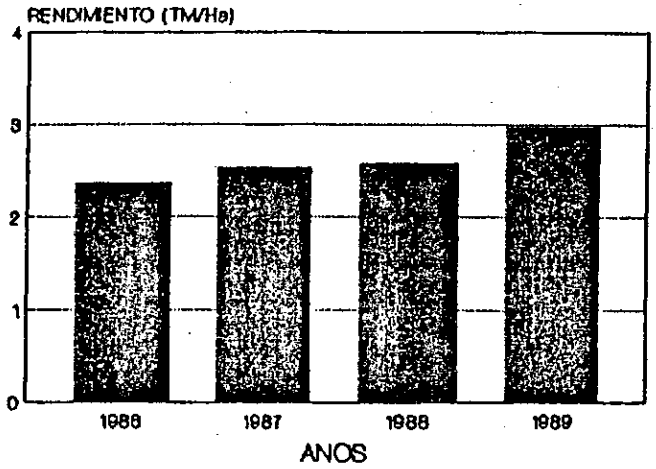
En lo que se refiere a consumo interno, el cultivo de arroz ocupa el 5to. lugar de exportación; cuya área fue en aumento de 14,300 a 26,800 hectáreas entre 1986 y 1988, bajando nuevamente a 15,100 hectáreas en 1989, su producción se ha mantenido constante durante este período en un valor aproximado de 35,000 toneladas métricas por año (figura 1).



FUENTE:Estadisticas Agropecuarias USPADA

Figura 1. Superficie cultivada de arroz en la Republica de Guatemala (1986-1989)

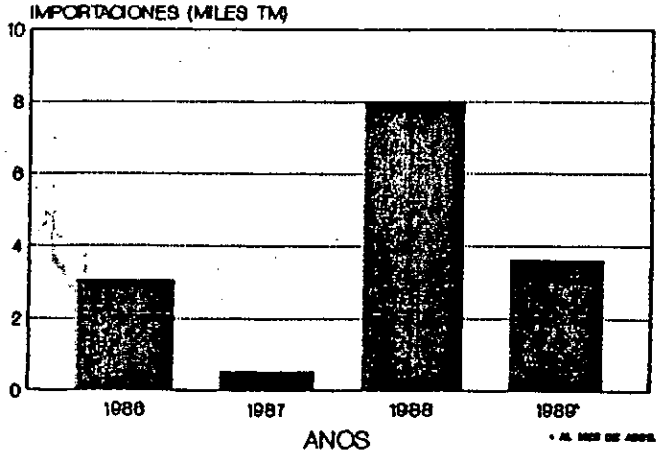
En lo que se refiere a rendimiento, el arroz es el cultivo que presenta los valores más altos y que han venido en aumento a partir de 1986 comenzando con 2,300 Kg/ha y llegando a 3,000 Kg/ha (granza) en 1989 (figura 2).



FUENTE:Estadisticas Agropecuarias USPADA

Figura 2. Rendimiento del cultivo de Arroz en Guatemala (1986-1989)

Mientras que en importaciones de cultivos tradicionales en 1988 el arroz ocupó el tercer lugar con un promedio anual de 8,000 toneladas metricas (figura 3)



FUENTE:Estadisticas Agropecuarias USPADA

Figura 3. Importaciones de Arroz en Guatemala (1986-1989)

3.1.2 Ayudas para el mejoramiento del arroz

Según el CIAT (2), el principal factor individual que facilita el mejoramiento del arroz es la extraordinaria diversidad varietal que se encuentra en Oryza sativa y sus especies cercanas. La amplia variabilidad es la piedra angular del éxito de los programas de mejoramiento varietal. El IRRI mantiene aproximadamente 50,000 introducciones varietales y continúa recolectando nuevas introducciones en áreas geográficas de interés especial.

Pocos programas pueden o deberían mantener incluso un pequeño porcentaje de las variedades recolectadas debido a las enormes dificultades que ésto presenta. Afortunadamente, los fitomejoradores de todo el mundo que necesitan semilla con características específicas pueden consultar el catálogo y solicitarlas al IRRI. Los investigadores de los programas nacionales de mejoramiento del IRRI y del CIAT han transferido muchos caracteres deseables a las variedades y líneas mejoradas (2)

El mejoramiento del arroz requiere años de trabajo constante duro y sucio con muchos fracasos y escasos éxitos. Quizás un cruce en 500 o más da origen a una nueva variedad y por cada variedad que llega a manos de los agricultores, decenas de miles de líneas se evalúan y descartan. No existe una forma fácil de mejorar la producción de arroz (2)

3.1.3 Mejora de Variedades

Según Eugladette (6), los objetivos de mejora de variedades del arroz pueden ser de tres formas:

3.1.3.1 Aumento de rendimiento

El rendimiento es el resultado del número de tallos con panícula, del porcentaje de esterilidad, del número de semillas por panícula y del peso medio de los granos.

Por otra parte el rendimiento está en función de la resistencia a las enfermedades, al vulco, al desgrane, a la sumersión y a la sequía (6).

3.1.3.2 Adaptación a las condiciones culturales

Una daptación más lograda de acuerdo con las condiciones del cultivo lleva consigo una serie de objetivos:

- adaptación a las condiciones del clima
- adaptación a las condiciones del suelo
- adaptación a las condiciones hídricas
- adaptación a las modalidades del cultivo (6).

3.1.3.3 Obtención de semillas o granos de calidades determinadas

A través de la selección se pueden obtener las variedades cuyos granos posean los más diversos caracteres:

- caracteres tecnológicos
- caracteres comerciales
- caracteres alimenticios (6).

La mejora varietal tiene por objetivo final la obtención

a partir de un material vegetal, local o importado de variedades, que posean un número determinado de características hereditarias correspondientes a las cualidades deseadas, susceptibles, sin embargo, de variaciones limitadas en función de las condiciones del medio y del cultivo. Esta mejora varietal puede obtenerse mediante cuatro sistemas clásicos:

- selección o elección de variedades de homogenidad suficiente o de líneas puras en el seno de una población.
- Introducción de variedades extranjeras, que deben aclimatarse y servir de genitoras.
- Hibridación o incorporación en la variedad a mejora de genes que provienen de otras variedades.
- Mutación natural o provocada, determinando la aparición o la transformación de los caracteres hereditarios por acción exterior (6).

3.1.4 Cultivo de Anteras

3.1.4.1 Antecedentes históricos del cultivo de anteras de arroz según Hurtado, D. Merino, M.E.(11) el cultivo de polen in vitro tuvo sus primeros ensayos hace unos 35 años aproximadamente inmediatamente despúes del inicio de la técnica de cultivos vegetales in vitro. Sin embargo estos trabajos solamente demuestran el desarrollo de haploides en tejido indeferenciado o callo, el cual nunca se diferenció en brotes o raíces. Fue hasta 1964 cuando Guha y Maheshwari reportaron que al cultivar

anteras de la angiosperma Datura innoxia se formaba un gran número de embriones haploides (11).

El CIAT (3) reporta, que la técnica de cultivo de anteras fue utilizada con éxito en arroz por primera vez por Niiziki y Oono en 1968 y desde entonces se ha usado extensamente en China en donde se han producido alrededor de 81 líneas mejoradas y unas 10 variedades comerciales. No obstante su aplicación en los programas de mejoramiento como una técnica rutinaria ha sido limitada debido fundamentalmente a la fuerte influencia del genotipo sobre la respuesta in vitro, encontrándose una mejor respuesta entre los pertenecientes al grupo japónica en comparación con los del grupo indica.

3.1.4.2 Inducción de Microcallos

En esta primera fase se siembran las anteras inmaduras en un medio de cultivo con altas concentraciones de auxinas (2,4-D y/o Acido Naftalenacético) con o sin citocininas, las que estimulan la formación del microcallo a partir de las microsporas. Después de dos días de cultivo ocurre la primera división mitótica de la microspora que da como resultado la formación de dos núcleos: el vegetativo de mayor tamaño y el generativo más pequeño, los cuales están separados por una membrana. El núcleo generativo se degenera rápidamente y generalmente desaparece antes de que el núcleo vegetativo se divida de nuevo. Alrededor del quinto día

de cultivo in vitro el núcleo vegetativo inicia la división mitótica. En las primeras divisiones generalmente se originan membranas celulares que permiten la formación de núcleos independientes, cuyo número puede variar de 2 a 8 por cada microspora (3).

A los 20 días de cultivo se forma una masa de tejido amorfo con más de 100 células por cada microspora involucrada en el proceso; éste es el denominado microcallo que alrededor de los 40 ó 50 días dependiendo del genotipo, alcanza un tamaño de 2mm, considerado como el más apropiado para iniciar el proceso de regeneración de plantas. Aunque aún no se sabe con exactitud como ocurre el doblamiento cromosómico del 50% de plantas regeneradas por cultivo de anteras, las observaciones citológicas del desarrollo de las microsporas en esta etapa, permiten suponer dos formas, mediante las cuales puede ocurrir la diploidización o poliploidización. En la primera llamada fusión nuclear, cuando el cultivo se inicia, a partir de microsporas en el estado uninucleado temprano o medio, no hay formación de membrana celular entre los núcleos en las primeras divisiones mitóticas del núcleo vegetativo, haciendo posible la fusión de dos o más núcleos, lo cual origina callos diploides o poliploides, o cuando el proceso de cultivo se ha producido a partir de microsporas en estado uninucleado tardío, el nucleo vegetativo se fusiona con el nucleo generativo y origina un callo diploide. En la segunda

forma llamada endoreduplicación, al presentarse la mitosis de las células haploides no hay separación de los cromosomas duplicados, lo cual conduce a la formación de un solo núcleo con un número doble de cromosomas (3)

3.1.4.3 Diferenciación Celular para generar Plantas

Una vez los microcallos han alcanzado el desarrollo adecuado o sea un tamaño de 2mm son transferidos a otro medio de cultivo que contiene concentraciones bajas de auxinas, pero altas de citoquininas (Kinetina o bencil aminopurina), las que estimulan la direnciación de la células del microcallo hasta generar plantas (3).

En los primeros estados de desarrollo, el microcallo es una masa de células sin diferenciación; posteriomente las células desarrollan vacuolas y se empieza a formar el tejido parenquimatoso. En este tejido se diferencian meristemas localizados algunos en la periferia, denominados meristemas periféricos, y otros están dispersos dentro de la masa parenquimatosa, denominados endomeristemas dispersos. Los meristemas periféricos originan los puntos de crecimiento o yemas de la plantula, mientras que de los endomeristemas se originan los primordios de las raices. En los primeros estados del proceso de morfogénesis, las yemas y las raices se desarrollan independientemente, sin ninguna conección de tejido vascular entre ellos.

Posteriormente se desarrolla el tejido vascular que conecta el vástago con la raiz, comformando asi la nueva plantula. Estas plantulas tienden a macollar dentro del medio de cultivo y desarrollan hojas típicas a los 30 o 40 días después de ocurrida la transferencia de los callos al medio de regeneración (3).

Según la FAO (7) La regeneración de plantas a partir de los callos se consigue a través de organogénesis,manipulando los reguladores de crecimiento exógenos. Con frecuencia las plantas regeneradas son anormales y abunda el albinismo. es usual el cambio de ploidia en las celulas de los callos y en las plantas regeneradas a partir de éstos. La adición de parafluorofenilanina al medio de cultivo parece estabilizar o seleccionar las células haploides en los callos.

3.1.4.4 Aplicación del Cultivo de Anteras en el Mejoramiento de Arroz

CHUNG, G. S (4) Indica que los mejoradores de arroz intentan desarrollar variedades de alto rendimiento con resistencia a enfermedades e insectos y con tolerancia al stress. De cualquier forma la acumulación de varias características deseables dentro de cualquier variedad es casi imposible de lograr en ciclos cortos de mejoramiento.

El cultivo de anteras ha hecho posible el desarrollo de características deseables dentro de periodos cortos y la

selección de nuevas lineas a partir de interespecies F1 o F2 por esta razón es ahora usada para mejoramiento de variedades comerciales de arroz (4).

Según HURTADO, D.(11) El propósito de cultivar anteras y polen es el de producir plantas haploides mediante la inducción de la embriogénesis a partir de microsporas de granos de polen inmaduros. Al contener la mitad del número cromosómico, las plantas haploides pueden emplearse en programas de fitomejoramiento para seleccionar características deseables, o bién para desarrollar líneas homocigótas para la producción de hibridos en especies incompatibles entre sí.

Progresos recientes en cultivo de anteras de arroz en la estación experimentalde cultivos Yeoxignam (yces), Korea ha aumentado la frecuencia de regeneración de plantas de 0.1% en 1982 a 5.6% en 1986, y ya existen dos lineas élite promisorias listas para pruebas de campo y determinar su adaptabilidad a las condiciones locales (4).

REIFFERS (17). Utilizando diferentes genotipos de arroz obtuvo un 29.0 % de inducción de callos con el cruce de arroz Guarani/Dourado Precoce, y un 98% de regeneración de plantas verdes con el cruce L8511/Cuibana.

CHUNG. G.S. (4) En un estudio utilizando 4 medios diferentes de inducción (MS, Miller, N6, N6-Y1), obtuvo

bun porcentaje de inducción de callos de 45.3 y un 12.3 % de regeneración de plantas verdes con el medio N6-Y1.

RAINA.S.K. (14). Utilizando los medios de inducción SK-1, MSN y cuatro hibridos de arroz obtuvo 10.7% de inducción de callo y 44.2% de regeneración con el medio SK-1 y el hibrido H-4, como también 14.0% de inducción de callo y 19.3 % de regeneración de plantas verdes con el medio MSN y el hibrido H-4, habiendo plantado un total de 5755 anteras.

Milyang 90, una variedad de arroz tipo japonica derivada del cultivo de anteras a mostrado resistencia a virus y posee buena calidad de grano. En la producción de estas características deseables, el mejoramiento de Milyang 90 con solamente 4 años, en este punto estuvo lista para pruebas de campo (4).

El mejoramiento de arroz a través del cultivo de anteras, necesita un estudio detallado posterior en el control artificial del nivel de ploidia y de plantas albinas In vitro como también el mejoramiento de la culturabilidad de las varieedades de arroz tipo índica (4).

3.1.4.5 La Androgénesis y los Factores que la Determinan

Según la FAO (7), la Androgénesis es un término que se refiere a la modificación del patrón normal de desarrollo del polen que da por resultado la formación directa de embriones.

Uno de los problemas que se presentan con mayor frecuencia en el cultivo de anteras es el bajo porcentaje de Androgénesis. Por esa razón conviene revisar algunos de los factores que influyen en el proceso (7).

La Androgénesis es un fenómeno que está intimamente relacionado a la constitución genética de las especies. Se ha observado por ejemplo, que los miembros de la familia Solanaceae y Gramineae tienen relativa facilidad para la Androgénesis In vitro. La capacidad androgenética difiere incluso entre especies o en variedades dentro de una misma especie (7).

3.1.4.6 Factores que Influyen en el Cultivo de Anteras de Arroz In Vitro:

CALDERON,DIAZ,J.H. (1). La frecuencia de regeneración de plantas provenientes de cultivo de anteras se ha incrementado. Los siguientes factores son importantes para lograr alta frecuencia de regeneración:

- El genotipo
- Las condiciones ambientales y el estado fisiológico de la planta donante.
- El estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo.
- El medio de cultivo.
- El tratamiento de las anteras antes del cultivo.
- La pared de la antera.

- Las condiciones físicas de incubación de las anteras.

3.1.4.6.1 El genotipo

EL genotipo es el factor más importante y el que más influye en el desarrollo de las microsporas In Vitro, tanto en la inducción de callos como en la regeneración de órganos y plantas, y posiblemente en el albinismo. Se han encontrado diferencias en la respuesta entre las especies, grupos y variedades de arroz, siendo el grupo Japónica el que mejor ha respondido al cultivo In Vitro. Aunque las variedades de Secano responden mejor al cultivo en comparación con las que crecen bajo riego, los híbridos generalmente superan a las variedades, presentándose una marcada heterosis en su respuesta al cultivo de anteras. Hay evidencias que la inducción de callo y la regeneración de plantas son caracteres bajo control genético simple; pero independientemente uno del otro, por lo tanto existe la posibilidad de mejorar genéticamente cada fase. La presencia de plantas albinas en poblaciones generadas a partir del cultivo de anteras <u>In Vitro</u> es de común ocurrencia especialmente en los cereales. En el arroz la aparición de plantas carentes de clorofila varía con el genotipo; en algunos casos puede obtenerse una alta rata de regeneración de plantas en el total de la población, pero el porcentaje de plantas albinas puede ser alto (50-90%). Aunque aún no se sabe con claridad

a que se debe la aparición de plantas albinas en las poblaciones obtenidas mediante el cultivo de anteras; existen evidencias de que el albinismo está relacionado con el deterioro del ADN de los plastidios y con las diferencias en el ARN de los ribosomas de los plastidios, teniendo en cuenta este factor es importante aclarar que en el cultivo de anteras de arroz In Vitro no hay una correlación entre la producción de callos y regeneración de plantas verdes; por lo tanto cuando se está evaluando germoplasma por sus respuestas al cultivo de Anteras In Vitro, se deben tener en cuenta por separado la fase de inducción de callos y de regeneración de plantas basándose en el número de anteras que han sido sembradas (3).

CHUNG,G.S (4) reporta que el éxito del cultivo de anteras de arroz es afectado por el genotipo de los materiales inoculados. La frecuencia de inducción de callo y regeneración de plantas en híbridos F1 varió de acuerdo a los padres de los cruces. La culturabilidad de los híbridos F1 fué muy baja cuando los cruces fueron hechos entre variedades de arroz tipo Indica y Tongil, si uno de los padres tenia buena culturabilidad, los híbridos F1 mostraron comparativamente un alto nivel de respuesta, el autor consideró la habilidad de formación de callo en cultivo de anteras de arroz como un caracter

heredable. El éxito del cultivo de anteras de arroz puede incrementarse grandemente si la selección hecha es de genotipos con una buena respuesta.

3.1.4.6.2 Condiciones Ambientales y el Estado Fisiológico de la Planta Donante.

Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes, tales como el fotoperíodo, la intensidad de la luz, la temperatura y la nutrición mineral influyen en el desarrollo de las microsporas en el cultivo In Vitro (3).

En observaciones realizadas a los granos de polen maduros contenidos en las anteras de arroz, se han identificado dos tipos de granos de polen con diferencias morfológicas. Este factor diferencial denominado dimorfismo del polen, consiste en que algunos granos presentan el estado morfológico normal, pero otros considerados anormales, son de menor tamaño, con tinción débil del citoplasma y generalmente presenta divisiones anormales similares al proceso de división que se presenta cuando se cultivan los granos de polen en un medio de cultivo In Vitro. A los granos de polen anormales se les ha denominado granos-S o granos-P y se cree que son los responsables de la proliferación celular que da como resultado la formación de callos cuando se someten las anteras al cultivo In Vitro. Su presencia dentro de la población de polen está predeterminado por las

condiciones ambientales bajo las que se desarrolla el estado fisiológico de las plantas donantes (3).

El estado de desarrollo de la planta donante en el momento en que se cortan las panículas influye también en los resultados obtenidos en el cultivo de anteras. Las anteras de las primeras inflorescencias tienen una capacidad de respuesta mayor, que las que provienen de la etapa final de la floración. En algunos casos las anteras de plantas donantes que crecen bajo condiciones de deficiencia de nitrógeno responden bien al cultivo In Vitro. En general, la variación en la respuesta al cultivo In Vitro de las anteras de plantas que crecen bajo diferentes condiciones ambientales, puede ser debido a la diferencia en el contenido de hormonas endógenas (3).

3.1.4.6.3 El estado de desarrollo del polen al iniciarse el cultivo

El estado de desarrolo del polen en el momento en que se separan las anteras para someterlas al cultivo In Vitro, es un factor clave para asegurar una respuesta exitosa. En estudios comparativos y en la práctica se ha determinado que la etapa de desarrollo del polen comprendido entre el estado unicucleado tardío o microspora tardía y el binucleado temprano o polen temprano, es la óptima para asegurar una respuesta exitosa. Si la siembra de las anteras en el medio nutritivo se realiza cuando el estado de desarrollo

del polen está en una etapa anterior o posterior a las mencionadas, la producción de callos decrece notablemente (3).

La frecuencia de inducción de callo es alta cuando son inoculadas las anteras que contienen polen en estado uninucleado (4).

Existen muchos métodos por los cuales determinar el estado de desarrollo del polen bajo un microscopio:

División del Nucleo, Posición del Poro del Polen en relación al nucleo y al diámetro de la microspora o diferentes estados de desarrollo. De cualquier manera el estado de desarrollo del polen determinado por análisis microscópico, difiere de acuerdo al grupo varietal, condiciones culturales y a la posición de la espiguilla dentro de la panícula (4).

Desde el punto de vista práctico, el estado óptimo de inoculación de anteras es determinado generalmente por la distancia entre las dos aurículas superiores y el grado de desarrollo de la antera en la espiguilla. El grado de desarrollo de la antera en la espiguilla es el mejor método para determinar el tiempo apropiado para la inoculación de la antera. A pesar de que Nagdongbyeo (una variedad Japónica de Arroz) tuvo un periodo de inoculación de anteras ligeramente mayor que Milyang 23 (tipo Tongil), los mejores resultados

fueron obtenidos cuando el desarrollo de la antera alcanzó hasta 1/2 - 1/3 del largo de la espiguilla (4). De cualquier forma si las panículas fueron pretratadas a baja temperatura antes de la inoculación, el período óptimo fue cuando las anteras alcanzaron 1/3 de la longitud de la espiguilla. Cuando las anteras fueron inoculadas en el estado uninucleado tardío, la frecuencia de regeneración de plantas verdes decreció y la de plantas albinas aumentó alrededor del 90% del total de callos fueron inducidas 20-40 días después de la inoculación de la antera, mientras que unos pocos callos fueron inducidos después de 50 días. La edad del callo, el número de días desde la inducción del callo hasta el trasplante, afectó la tasa de regeneración de plantas. La frecuencia de regeneración de plantas verdes, fue alta cuando el callo tenía de 11-20 días, pero la frecuencia de plantas albinas aumentó cuando el callo tuvo más de 30 días. La edad del callo más efectiva para la regeneración de plantas verdes, fue alrededor de 20 días después de la inducción del callo, cuando el callo tenía de 2-3 mm de diámetro (4).

3.1.4.6.4 El medio de cultivo

Un factor determinante para el cultivo de polen o anteras es el medio nutritivo sobre el cual sean capaces de crecer; la composición hormonal del medio también es determinante para la iniciación del cultivo

(11). Nitsh (1970) citado por HURTADO (11) reportó que el agua destilada, suplementada con sacarosa y hierro quelatado, como medio de cultivo, eran suficientes para obtener embrioides de microsporas dentro de las anteras.

Sharp y colaboradores (1972) citados por HURTADO (11). estimularon la formación de colonias de callo mediante la técnica del cultivo de nodriza. Ellos colocaron anteras de Lycopersicum esculentum en un medio de agar y las cubrieron con un pequeño disco de papel filtro; sobre ellas se pipeteó una gota de polen a partir de un cultivo en suspensión. El cultivo se mantuvo con luz y a una temperatura de 25°C, apareciendo colonias de células parenquimatosas un mes después.

En cultivo de anteras de arroz, los primeros estudios que se hicieron, fueron en medios básicos MS (Murashigs-Skoog) y Miller, pero recientemente ha sido adoptado ampliamente el medio básico N6 con contenido de amcnio modificado.De cualquier forma hay cierta dificultad en el uso del medio basico N6 para todos los genotipos, especialmente cuando el arroz es de tipo Indica. Es sabido que el medio usado para inducción de callo influencia la tasa de regeneración de plantas después del trasplante del callo (4). En una evaluación de medios básicos para cultivo de anteras de arroz, el medio básico N6-Y1 dió mejores resultados que MS, Miller o N6. El contenido de

nitrógeno total del medio básico N6-Y1, fue el mismo que el N6, pero en el medio N6-Y1, tomó la forma de 28 m $MKNO_3$, 1.75 m $M(NH_4)_2SO_4$, y 1.75 m ML-Glutamine, mientras que el nitrógeno en N6 estuvo presente como 28 m $MKNO_3$, 3.5 m $M(NH_4)_2SO_4$ (4).

El tipo de agente gelificante para el medio de cultivo empleado en la etapa de regeneración de plantas, también influye en la respuesta al cultivo de anteras, obteniéndose mejores resultados cuando se utiliza agarosa y gel-rite en comparación con el agar. Otros componentes del medio como la sucrosa y los reguladores del crecimiento juegan un papel importante en la androgénesis o desarrollo de la microspora. También se debe tener en cuenta los requerimientos osmóticos de la microspora, con el fin de mantener una constante división celular (3).

Reguladores de crecimiento exógenos también son requeridos para la inducción de callo y regeneración de plantas en cultivo de anteras de arroz, una combinación de 2 mg/l de ANA (Acido Naftalenacetico) y 1 mg/l de Kinetina mostraron mejores resultados que los otros reguladores del crecimiento usados, solo o en combinación para inducción de callo. Cuando las anteras de arroz, fueron pretratadas a 10°C durante 15 días, una combinación de ANA, Kinetina y AAB (Acido Abscisico) dió una mejor respuesta, en ambos términos,

inducción de callo y regeneración de plantas verdes, que el ANA solo o una combinación de ANA y Kinetina. La frecuencia de inducción de callo en los medios líquidos fue mucho mayor que en los medios sólidos, pero la frecuencia de regeneración de plantas en medios líquidos fue mucho menor comparado con los medios sólidos. Las bajas tasas de regeneración pueden deberse a la insuficiencia del callo precipitado al fondo del medio líquido. Para aumentar la reacción puede ser agregado extracto de papa o un o un puente de papel usado para cultivo líquido (4).

En base a la FAO (7), la sacarosa juega un papel esencial en la inducción de la androgénesis. Además de servir como fuente de carbono también participa como osmoregulador. La concentración de sacarosa en el medio de cultivo fluctúa entre 2-6% y en ocasiones puede llegar al 12%. La glucosa tiene efecto positivo en algunos casos. El nitrógeno ejerce cierta influencia en la androgénesis. El nitrato o el amonio en ocasiones no puede subsistir a algunos aminoácidos que parecen ejercer un papel específico durante las diferentes etapas de desarrollo de los embriones. La glutamina es probablemente benéfica para conseguir la diferenciación in vitro en la mayoría de las especies.

Las vitaminas aparentemente no son esenciales para inducir la formación de embriones a partir de polen. Sin embargo, se recomienda la adición de ellas para

promover su desarrollo en las etapas posteriores. Entre los micronutrientes el hierro tiene una influencia esencial en el desarrollo de los embriones. Bajas concentraciones o su ausencia en el medio inhiben su crecimiento, principalmente en la etapa globular. Los quelatos de hierro como el Fe-EDTA (ácido etilendiamino-tetra-acético) son más eficientes que el nitrato férrico en la promoción de la androgénesis (7).

Sin duda alguna los reguladores de crecimiento son los componentes clave para la inducción de la androgénesis en la mayoría de las especies. A pesar de que las plantas del género Nicotiana y otras solanáceas son autosuficientes en hormonas durante la embriogénesis, lo más comun es que se requieran combinaciones específicas de auxinas y citocininas. Altas concentraciones de auxinas tienden a inducir la formación de callosidades. En ocasiones la adición de antiauxinas como el ácido triyodobenzoico, aumentan la embriogénesis (7).

Existen articulos acerca de la estimulación de la androgénesis por la presencia de carbón activado en el medio. Aparentemente el carbón activado actúa removiendo inhibidores de crecimiento o el exceso de auxinas en el medio de cultivo. Las concentraciones que se adicionan varían entre 0.5 - 2%.

Cuadro 1. Medios más usados para la inducción y regeneración de plantas en cultivo de tejidos.

	Medios para Inducción		Medios para Regeneración
	N_6 mg/1	Papa II mg/1	Murashige & Skoog mg/1
NH_4NO_3			1.650
$(NH_4)_2SO_4$	463	100	
KNO_3	2.830	1.000	1.900
KH_2PO_4	400	200	170
$MgSO_47H_2O$	185	126	370
$CaCl_22H_2O$	166		440
$Ca(No_3)_24H_2O$		100	
KCl		36	
H_3BO_3	1,6		6,2
$MnSO_44H_2O$	4,4		22,3
$ZnSO_47H_2O$	1,5		8,6
$Na_2MoO_42H_2O$			0,25
$CuSO_45H_2O$			0,025
$CoCl_26H_2O$			0,025
KI	0,83		0,83
Na_2EDTA	37,3		37,3
$FeSO_47H_2O$	27,8		27,8
M-Inomitol			100
Tiamina-HCl	1	1	0,1
Acido nicotinico	0,5		0,5
Piridoxina	0,5		0,5
Glicina	2		2
ANA	2	4	1
Kinetina		1	4
2,4-D	2.0		
Sacarosa	60.000	50.000	30.000
Extracto de papa		100.000	
Gel-rite			1.500

Cuadro 2. Composición del medio N_6-Y1 para cultivo de anteras de arroz.

Componentes	Contenido (mg/1)
Macronutrientes	
$(NH_4)_2SO_4$	231.5
KNO_3	2,830
KH_2PO_4	400
$CaCl_2 2H_2O$	166
$MgSO_4 7H_2O$	185
Micronutrientes	
$MnSO_4 4H_2O$	4.4
$ZnSO_4 7H_2O$	1.5
H_3BO_3	1.6
KI	0.8
$FeSO_4 7H_2O$	27.85
Na_2EDTA	37.25
Suplementos Orgánicos	
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	1.0
L-Glutamine	265

3.1.4.6.5 El tratamiento de las anteras antes del cultivo

Por muchos años se mantuvo la práctica rutinaria de aislar las flores de la planta donante, separar sus

anteras e inmediatamente colocarlas bajo condiciones definitivas de incubación. Sin embargo, en los últimos 15 años esta práctica se ha modificado al descubrir que al someter las anteras a un tratamiento de bajas temperaturas antes o después de sembrarlas en el medio de cultivo, se incrementa la producción de callos significativamente. En la actualidad ésta es una práctica esencial dentro de la técnica utilizada para el cultivo de anteras (3).

El pretratamiento frío se ha convertido en un paso esencial en el cultivo de anteras de arroz, desde que fue descrito la primera vez por Chaleff, etc, en 1975. Investigadores han reportado varios tiempos óptimos y temperaturas necesarias para el pretratamiento frío. Cuando las panículas de Milyang 23 (variedad de arroz tipo tongil) fueron pretratados a 6 o 12°C durante 5 a 25 días, el pretratamiento de 12°C por más de 20 días incrementó la frecuencia de plantas albinas (4).

Cuando son cultivadas muchas anteras al mismo tiempo en un programa de mejoramiento el pretratamiento frío puede tener un beneficio de importancia práctica, en términos de ahorro de tiempo y trabajo (4). Las investigaciones en la fisiología de las anteras han revelado que los efectos del tratamiento con frío y en ausencia de luz, consisten en reducir la actividad biológica del arquesporio que alberga a los granos de polen, manteniendo su viabilidad, y evitando la

dehiscencia prematura de las anteras en el cultivo (3).

Aunque existen otros tratamientos físicos como las irradiaciones con Rayos Gamma a las anteras o/y a las semillas, y químicos como la utilización de colchicina y ethrel en el medio de cultivo, el tratamiento con bajas temperaturas sigue siendo el más utilizado y el de mejores resultados (3).

3.1.4.6.6 Temperatura

En algunas gramíneas el pretratamiento puede darse entre 13-15°C durante 5-14 días. Ocasionalmente el pretratamiento a algunas especies es a temperaturas más altas (25-35°C; 24 horas). A veces la alternancia de bajas y altas temperaturas puede dar buenos resultados (7).

La temperatura de incubación durante el cultivo de anteras es otro factor que se debe considerar. El aumento gradual de la temperatura de 14 a 18 y posteriormente a 25°C en intervalos de 5-7 días parece favorecer a la androgénesis. En general la temperatura de incubación es de 22-28°C (7).

3.1.4.6.7 La pared de la antera

En experimentos realizados cultivando granos de polen in vitro, los resultados han sido favorables sólo cuando éstos han permanecido unidos a las anteras en el medio de cultivo por lo menos unos días antes de

ser aislados. Esta es una evidencia de la importancia que tienen las substancias fisiológicamente activas contenidas en el tapete o pared celular de la antera en la formación de callo y la posterior regeneración de plantas; por ésto es importante mantener una densidad de siembra óptima en el medio de cultivo (3).

3.1.4.6.8 Las condiciones físicas de incubación de las anteras

La temperatura adecuada para los procesos de formación de callos y de regeneración de plantas está entre los 24 y 26°C con temperaturas por encima de 28°C las anteras se degeneran rápidamente, disminuyen la formación de callos y aumenta la presencia de plantas albinas (3).

La cantidad e intensidad de la luz no afecta drásticamente los resultados del cultivo de anteras; sin embargo, mantener el cultivo en la oscuridad durante la etapa de formación de callos favorece su rápido crecimiento una vez que los callos son transferidos al medio de regeneración, la luz es necesaria para el proceso de fotosíntesis en el desarrollo de las pequeñas plantas (3).

3.1.5 Empleo de la radiación gamma

MONTEPEQUE,R. (12)."La Radiación Gamma es de la misma naturaleza que la luz y los Rayos X, está constituida por fotones de muy corta longitud de onda, por lo que es

altamente penetrante."

"En la producción industrial de Rayos Gamma, se emplea normalmente los núclidos Cobalto-60, fuente de radiación gamma y Cesio 137, fuente de radiación gamma que es la que se ha utilizado en experiencias anteriores, tiene una energía de un millón de electrones voltio ($1^{0}33$ Mev) y una longitud de onda de 10^{10} cm. Mazon M, M y Fernández G, J. citados por Montepeque (12) indican que el Rad, es una unidad utilizada para medir la cantidad de radiación absorbida por cualquier tipo de material y representa la absorción de 100 ergios de energía radiante por gramo de material irradiado.

Montepeque, R. (13) en un estudio hecho en arroz (Oriza sativa L.) utilizando la variedades ICTA-Virginia y Precozicta con el objetivo de obtener genotipos de ciclo precoz, resistentes o tolerantes a Pyricularia orizae encontró que en la variedad ICTA-Virginia, con una irradiación de 290 GY, se obtuvieron mutantes morfológicos, clorofilicos, con tolerancia a P. orizae y de maduración de 15 días más precoz que la variedad original, y en la variedad Precozicta, con una irradiación de 310 GY, se obtuvieron mutantes morfológicos con tolerancia a P. orizae y de maduración 20 y 10 días más precoz que la variedad original.

3.1.5.1 Objetos y métodos de tratamiento

Todas las partes de la planta pueden ser irradiadas por

un método u otro, pero algunos son mas faciles de tratar que otras. Ademas de las comunmente tratadas semillas y polen, plantas, anteras, tuberculos, cornos, bulbos, estolones y células, tejidos u órganos en cultivo artificial, pueden ser irradiadas.

Existen grandes diferencias en la radiosensibilidad de las diferentes partes de la palnta; la reacción de un tipo dado de célula a la radiación, depende de las condiciones fisiológicas en el momento de la irradiación así como de las condiciones pre y post irradiación. Para producir igual cantidad de daño cromosómico en puntas de raiz de cebolla, irradiando diferentes órganos, deben suministrarse dosis en una relación 1:8:80 a la raiz en crecimiento, el bulbo dornante y la semilla, respectivamente. La decisión debe ser tomada por el investigador en lo concerniente a la parte de la planta más apropiada o estado, y requiere un profundo conocimiento del organismo y objetos del experimento (14)

SEMILLAS:

Las semillas son un material favorecido para la irradiación en muchos experimentos de inducción de mutaciones y mejoramiento práctico. Nilan et al (1961) puntualizó las ventajas de utilizar semillas de cebada,las cuales pueden aplicarse a la mayoría de las especies. Las semillas pueden ser irradiadas en muchos ambientes físicos normalmente tolerables solo en moléculas no vivientes. Pueden secarse, humedecerse,

calentarse y congelarse. pueden mantenerse por largos periodos de tiempo bajo un vacio casi libre de oxígeno así como bajo altas presiones de oxígeno u otros gases. Cuando estan secas,las semillas son casi inertes biológicamente y estas condiciones ambientales severas no causan daños biológicos significativos. Esto es favorable, debido a que estas condiciones rígidas son necesarias para el control apropiado de factores que modifican el daño inducido por la irradiación en la semilla.

Las semillas dornantes secas son también faciles de manejar y pueden ser embarcadas largas distancias. De cualquier manera, se requiere mayores dosis de radiación para producir suficientes efectos genéticos que cuando se irradia otra parte de la planta.Esto puede ser significativo cuando la disposición de recursos limita las tasas de dosis. Por otro lado, humedecer las semillas antes de la irradiación reduce el nivel de dosis requerido pero introduce algunos factores que lo complican. No es fácil reproducir las condiciones de tratamiento con semillas humedecidas o germinadas (14)

3.1.5.2 Inducción de mutaciones

La planta de arroz puede ser objeto de mutaciones naturales, que son más frecuentes de lo que generalmente se cree. Las mutaciones artificiales pueden ser obtenidas de diversas maneras:

- Empleo de substancias mutagénicas, tales como colquicina, o substancias radiomiméticas (sulfato neutro de etilo, metano sulfonato de etilo).

- Utilizando la radiación con la ayuda de los rayos X y B, de los neutrones térmicos y rápidos, etc.

Las sustancias o los agentes mutagénicos, pueden ser aplicados en la floración (acción de la iluminación, por ejemplo) o sobre las semillas.

Entre Las sustancias mutagénicas utilizadas para la irradiación se pueden encontrar los rayos gamma de la bomba de cobalto del P56, etc.(6).

Así se obtienen diversas mutaciones de;

- El enanismo de las plantas
- La longitud del grano
- El grosor de la cariópside
- La longitud del ciclo vegetativo
- La acción clorofílica
- El albinismo, etc.(6).

Entre las propiedades importantes que pueden lograrse se cuentan las siguientes:

- Aumento de la resistencia al encamado: El encamado es un problema grave, que afecta a los cereales y especialmente a la cebada y al trigo duro. Las propiedades deseadas consisten en una reducción de la altura de la planta y un tallo más firme, así

como un rendimiento si no superior, al menos igual, cuando simultáneamente se aumenta la fertilidad del suelo (15).

- Maduración más temprana o más tardía: la maduración de cultivos importantes tales como el trigo panificable, el arroz y la cebada puede adelantarse en cinco o diez días más temprano, con la ventaja de que dejan así sitio en el campo para otros cultivos o de que tienen más probabilidades de escapar a los peligros de la sequía, las heladas o las plagas. Se ha conseguido mejorar la adaptación de algunos cultivos recientemente introducidos, tales como el arroz, el algodón, la pimienta y las semillas de ricino o determinadas características de su medio ambiente, a saber, la duración de la luz diurna y el régimen de temperaturas (15).

- Mejora las características de las semillas: Las que desea el consumidor son la mejora del valor nutritivo (contenido en proteína o en grasas) la facilidad de cocción o de malteado a la reducción del tiempo necesario para cocinarlas.

- Aumento de la resistencia a enfernedades: Este aspecto es muy importante, ya que muchas cosechas quedan destruidas por las enfermedades, y las posibilidades de protección por medios químicos pueden estar sujetas a restricciones, debido a su

costo o al interés por salvaguardar el medio ambiente (15)

- Mejora de las características agronómicas: Estas pueden consistir, por ejemplo, en una capacidad mayor para soportar los rigores del invierno, mayor tolerancia al calor, y mejor adaptabilidad a condiciones de suelo adversas (15).

- Mejora del rendimiento: Hasta ahora, se ha podido aumentar el rendimiento de 64 variedades de cultivos en proporciones de entre 3 y el 10%. En uno de los casos, el aumento puede ser de hasta el 45% (15).

Se pueden relatar muchos casos de mutaciones coronadas por el éxito. Un ejemplo impresionante lo constituye la menta. La única fuente de esencia de menta en los Estados Unidos era la variedad Mitcham, antes de que empezara a marchitarse debido a la enfermedad causada por el hongo Verticilium. Con la fumigación del suelo y la quema de cultivos sólo se consiguió reducir algo la incidencia de la enfermedad. Los intentos de producir por cruce variedades resistentes a la enfermedad fracasaron debido a que en las variedades resistentes al hongo se producía una alteración inaceptable del sabor de la esencia. Pero por irradiación se obtuvo una mutante resistente a la infección que conservaba el sabor original de la esencia de menta. Actualmente este mutante es de uso general; y las economías conseguidas

mediante su introducción se elevar a millones de dólares anuales (15).

3.1.6 Regeneración de plantas inducidas

ZAPATA,F.J.(19) Estudios de reproducción para el desarrollo de características agronómicas en arroces Basmati han sido realizados por mucho tiempo pero sin éxito considerable, la irradiación fue utilizada con la esperanza de producir alteraciones genéticas en la célula, que no sólo desarrollara la inducción de callos y promoviera la regeneración de plantas, si no que eventualmente disminuyera la variación positiva en la planta regenerada. Semillas de Basmati 370 fueron sujetas a dosificaciones de irradiación de 15, 20 y 25 Krad en una proporción de dosis de aplicación de 1.2 Krad/min de cobalto-60 células gamma y anteras que fueron recolectadas de plantas de semillas irradiadas.

Ambos, el porcentaje de producción de callos y la regeneración de plantas, disminuyó por la aplicación de irradiación, el estress; el más inhibidor estuvo a 20 Krd. Sin embargo, solo en está dosificación de irradiación hubo regeneración de plantas (14). (cuadro 3).

CUADRO No 3 EFECTO DE LA IRRADIACION SOBRE LA REGENERACION DE PLANTAS DE BASMATI 37.

Irradiación dosis (Krd)	callos plantados (No)	callos con plantas verdes (%)
0	10	0
15	61	0
20	23	26.1
25	84	0

(ZAPATA,F.J. 1987).

3.2 Marco Referencial

3.2.1 Area Experimental

3.2.1.1 Localización

La investigación se realizó en el invernadero con temperatura adecuada para el desarrollo del cultivo, (28-30 C) y laboratorio de cultivo de tejidos del departamento de Agropecuaria de la Dirección General de Energía Nuclear, Ministerio de Energía y Minas, ubicado en la zona 12 de la Ciudad de Guatemala.

La zona de vida de dicha área, según De la Cruz (5) se encuentra en la faja termométrica altitudinal subtropical. Los suelos pertenecen a la serie Guatemala, para los cuales Simmons (18), reporta una textura y consistencia franco arcillosa friable, formado de cenizas volcánicas.

La Dirección se encuentra a 14°34'51" L. N. y 90°3'16"

L.O y una elevación de 1476 msnm, tiene una precipitación media anual de 1247 msnm, con temperatura media anual de 18 °C (9).

La investigación consistió de dos fases, una de invernadero y otra de laboratorio.

El invernadero utilizado: tiene techo de vidrio de dos aguas y armazon de hierro, cuenta con cajas de madera para las siembras,dichas cajas están forradas con plastico negro,para no dejar filtrar el agua, la capacidad de cada caja es para 36 macetas plasticas de un kilo de suelo. Se cuenta con ventiladores laterales mecanicos y con un sistema de microaspersión.

El laboratorio de cultivo de tejidos cuenta con un cuarto de transferencia o siembra,equipado con dos camaras de flujo laminar de aire, una sala de preparación de medios con equipo,cristaleria y reactivos. Un cuarto de crecimiento con tres incubadoras con control de luz y temperatura, ademas se cuenta con un sistema de aire acondicionado y un microscopio con objetivo de inmersión de 100X para poder observar las etapas de desarrollo de las panículas en estado uninucleado.

3.2.2 Material Experimental

En el presente estudio se utilizaron 6 genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) procedentes de semilla certificada,producidas por el Instituto de Ciencia y

Tecnología Agricolas (ICTA), estas son:

- ICTA VIRGINIA

Es una variedad con pedigree P 918-25-1-4-2-3-1B y cruzamiento CICA 4X (Fa665-23-3-Xtetep).

Produce de 10-15 espigas de longitud de 20.6-21.2 cms,su grano es largo y pubescente, la altura de planta es de 107cms, con 135 dias a madurez fisiológica, muy suceptible a Pyricularia (principal enfermedad del arroz).

- PRECOZICTA

variedad de arroz con pedrigee P 790-B4-4-1T y cruzamiento IR 930-2X IR665-31-2-4.

- ICTA POLOCHIC

variedad de arroz con pedigree P 1429-8-9M-2-1M-5 y cruze P 1223/ P 1225.

Rendimiento entre 70 y 80 quintales de arroz granza/Mz.

Cosecha: 125 y 135 dias después de la siembra, presenta tolerancia a piricularia o tizón de la hoja, el grano tiene buena calidad molinera y un rendimiento de grano entero, de hasta 60 libras por cada quintal en granza en el beneficio. La época de siembra es en los meses de mayo y junio, los municipios productores de arroz son Esquipulas e Ipala, a una altura de 800 a 1000 mts sobre el nivel del mar.

- PICO NEGRO

Material de arroz criollo cultivado por agricultores de la costa atlántica de Guatemala.

- CRISPO-38

Nueva variedad de arroz para uso industrial liberada en Guatemala.

Caracteristicas:

Vigor intermedio, amacollamiento muy bueno, altura 80-98 cm, ciclo precoz, rendimiento 3.5-7.4 toneladas por hectarea, alta tolerancia a piricularia, escaldado y helmintosporiosis, manchado de glumas.

- LINEA-50

Linea avanzada generada por el programa de arroz del Instituto de Ciencia y Tecnología Agricolas (10).

4. OBJETIVOS

4.1 Evaluar la respuesta de los genotipos de arroz (Precozicta, Polochic, Pico Negro, Virginia, Linea 50 y Crispo 38) a la inducción de callos y regeneración de plantas en la técnica de cultivo de anteras.

4.2 Evaluar el efecto de la radiación gamma (Co-60) como un medio determinante de la variabilidad, en la inducción de callos y regeneración de plantas.

4.3 Comparar el efecto del agar y el extracto de arroz como solidificantes en el medio de inducción, en el cultivo de anteras.

5. HIPOTESIS

5.1 Los materiales de arroz a evaluar, tienen la capacidad de producir callo y regeneración de planta a partir del cultivo de anteras.

5.2 El pretratamiento de la semilla con radiación gamma (Co-60) contribuye a la formación de callo y regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras.

5.3 La consistencia del medio y el tipo de solidificador influyen directamente en la formación de callos.

6. METODOLOGIA

6.1 Desarrollo de la Investigación

6.1.1 Etapa de Invernadero

Esta actividad se realizó en el invernadero de la Dirección General de Energía Nuclear, el material de arroz que se utilizó es el siguiente: Precozicta, Polochic, Línea-50, Crispo-38, Virginia y Pico Negro, las cuales fueron obtenidas del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA).

La siembra se realizó en septiembre, octubre y noviembre del año 1992 y febrero, marzo, abril, mayo, junio, julio, agosto de 1993. Durante esta fase, se sembraron las semillas de arroz irradiadas con las siguientes dosis (0, 15 y 30 Krd), la siembra se realizó en macetas plásticas, teniendo 6 macetas para cada dosis de radiación, en las cuales se sembró un promedio de 100 semillas.

Después de haber germinado se procedió al raleo, dejando únicamente 2 plantas/maceta. A los 20 días de germinadas las plantas se hizo su respectiva fertilización, la siembra se hizo escalonada a intervalos de 20-25 días entre variedades.

6.1.2 Etapa de Laboratorio (cultivo de tejidos)

Durante la fase de laboratorio, se prepararon hormonas de crecimiento,vitaminas,soluciones de micro y macro nutrientes para hacer los medios de inducción y regeneración, y así poder hacer las siembras respectivas

de las anteras en estado uninucleado.

Para la incubación de los tejidos se utilizó una camara de crecimiento con control de luz y temperatura, en la cual se incubaron las anteras en cajas petri conteniendo medios de inducción hasta la formación de callo, asi mismo los callos en tubos de ensayo conteniendo medios de regeneración fueron incubados hasta la regeneración de plantas.

6.1.2.1 Inducción de Callo

6.1.2.1.1 Determinación del estado uninucleado de las anteras

Para conocer el estado de desarrollo de las microsporas, se observó constantemente el desarrollo de las variedades utilizadas.

Para observar el estado uninucleado de las microsporas, se procedió a la fijación, tinción y observación en el microscopio de las mismas. La metodología usada para este caso fué la empleada por CALDERON DIAZ (1) y que se describe a continuación.

- Fijación

Se fijaron las anteras en una solución compuesta por tres partes de Etanol al 95% (alcohol etílico), una parte de ácido acetico glacial y 0.1% de cloruro férrico, posteriormente se calentó la inflorescencia en esta solución a 70°C por 45 minutos, o se dejaron en la solución fijadora durante 24 horas a temperatura ambiente con la finalidad de favorecer una mejor acción de la

solución de tinción.

- Tinción

Las anteras fueron maceradas y teñidas con una solución al 0.5% de acetocarmín, una vez teñidas las anteras se observaron los estados de desarrollo bajo un microscopio con un lente 40X-100X.

6.1.2.1.2 Extracción de Anteras

Las anteras fueron colectadas en el invernadero, por las mañanas antes de las diez horas, y se sometieron a tratamiento frío, durante 5 días a 5°C, luego fueron esterilizadas por 20 minutos, utilizando una solución de hipoclorito de sodio al 0.5% y luego lavadas 3 veces con agua estéril. Así mismo se utilizó alcohol etílico al 70% para desinfectar el área de trabajo en la cámara de flujo laminar. Las espigas estériles fueron colocadas en cajas petri estériles y las anteras fueron removidas con pinzas finas, posteriormente, las anteras fueron transferidas a cajas petri, conteniendo medios de inducción,dichas cajas fueron selladas con parafil y luego incubadas a una temperatura de 27°C en completa obscuridad ya que bajo estas condiciones ocurre la multiplicación de las microsporas que conducen a la formación de microcallos. Esto empezó a aparecer alrededor de los 20 días de cultivo proliferando entre los 35 y 40 días, alcanzando el tamaño apropiado para ser transferido al medio de regeneración a los 40 días.

6.1.2.2 Medio de Cultivo

Se utilizó como medio basal el N6 la composición del mismo, se muestra en el cuadro 4.

Cuadro 4 Formulación del medio basal N6 para inducción de callo utilizando como solidificante: Agarosa

	VOLUMEN FINAL DEL MEDIO 1000 MLS
SUCROSA	60.0 GRS.
AGAROSA	4.0 GRS.
STOCK A	20.00 MLS.
STOCK B	10.00 MLS.
STOCK C	10.00 MLS.
STOCK D	10.00 MLS.
STOCK E	10.00 MLS.
2,4-D	10.00 MLS. **
ANA	10.00 MLS. **

COSNTITUYENTE DE CADA STOCK		(g/l de stock)
A	KNO	141.50
B	MgSO	18.5
	MnSO .4H O	0.44
	ZnSO .7H O	0.15
	(NH) SO	46.3
C	KH PO	40.00
	KI	0.08
	H BO	0.16
D	CaCl .7H O	16.60
E	FeSO .7H O	2.78
	Na EDTA	3.73
**	2-4D	100 mg/500 ml
**	ANA	100 mg/500 ml

Para la inducción de callo se utilizaron 15 ml de medio liquido, los cuales fueron colocados en cajas petri de vidrio de 120 ml de capacidad, dichas cajas se esterilizaron en el autoclave a 121 °C y 15 libras de presión por pulgada cuadrada durante 15 minutos.

Cuadro 5. Formulación del medio basal N6 para inducción de callo utilizando como solidificante: Extracto de Arroz

	VOLUMEN FINAL DEL MEDIO 1000 MLS
SUCROSA	60.0 GRS
ESTRACTO DE ARROZ	70.0 GRS
STOCK A	20.0 MLS
STOCK B	10.0 MLS
STOCK C	10.0 MLS
STOCK D	10.0 MLS
STOCK E	10.0 MLS
2,4-D	10.0 MLS **
ANA	10.0 MLS **

CONSTITUYENTES DE CADA STOCK		(g/l de stock)
A	KNO_3	141.50
B	$MgSO_4$	18.5
	$MnSO_4.4H_{20}$	0.44
	$ZnSO_4.7H_{20}$	0.15
	$(NH_4)2SO_4$	46.3
C	$KH_{2PO}{}^4$	40.0
	KI	0.08
	$H^{3BO}{}_3$	0.16
D	$CaCL_{2.2H}{}^{20}$	16.6
E	$FeSO^4.7H_{20}$	2.78
	Na_{2Edta}	3.73
**	2-4D	100 mg/500 ml
**	ANA	100 mg/500 ml

6.1.3 Regeneración de Plantas

Los callos provenientes de los medios de inducción fueron trasladados a tubos de ensayo que contenían el medio basal N6 con 3% de sucrosa.

Durante la incubación los frascos se mantuvieron a una temperatura de 27 °C, con una iluminación de 2500 LUX que se logra con lámparas fluorescentes tipo luz día con alto % de color azul, y expuesta a un fotoperíodo de 16 horas. Al transcurrir 6 semanas se determinó el número de plantas generadas (cuadro 6).

En la figura No. 4 se observa en una forma general la metodología que se utilizó desde la siembra de variedades de arroz, hasta la obtención de plantas a través del cultivo de anteras.

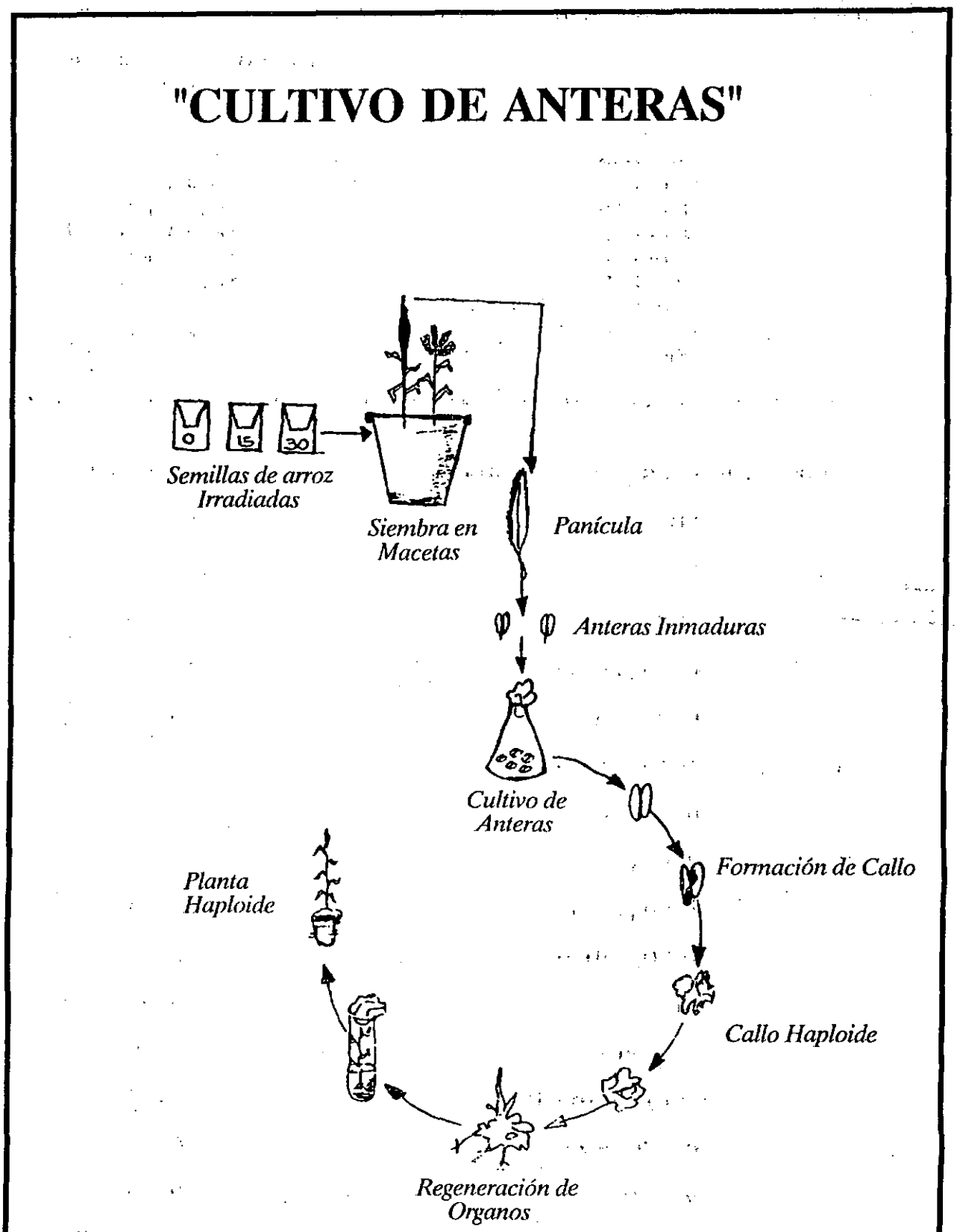


FIGURA No. 4: FLUJOGRAMA INDICANDO LOS PROCEDIMIENTOS, UTILIZADOS DESDE LA SIEMBRA DE VARIEDADES DE ARROZ, HASTA LA OBTENCION DE PLANTAS A TRAVES DE CULTIVO DE ANTERAS.

Cuadro 6. Formulación del medio basal N_6 para regeneración

	VOLUMEN FINAL DEL MEDIO 1000 ML
Sucrosa	30.00 grs
Stock A	20.00 mls
Stock B	10.00 mls
Stock C	10.00 mls
Stock D	10.00 mls
Stock E	10.00 mls
Stock F	10.00 mls
Kinetina	5.00 mls **
ANA	2.50 mls **

Para la solidificación del medio se utiliza: agarosa 4.0 Gr.

CONSTITUYENTES DE CADA STOCK		GR/L STOCK
A	KH_2PO_4	20.0
	KNO_3	141.5
	$(NH_4)_2SO_4$	23.15
B	$MgSO_4.7H_2O$	18.5
C	$CaCl_2.2H_2O$	16.6
D	$FeSO_4.7H_2O$	2.78
	Ma_2.EDTA	3.72
E	H_3BO_3	0.16
	$MnSO_4.H_2O$	0.44
	$ZnSO_4.7H_2O$	0.15
	KI	0.081
F	Thiamina HCl	0.10
	Pyridoxina HCl	0.05
	Acido Nicotinico	0.05
	Glicina	0.20
	Kinetina	100 mg/500 ml
	ANA	100 mg/500 ml

6.2 Evaluación de la investigación

6.2.1 Inducción de callo

Para la evaluación de los tratamientos se utilizó un diseño experimental de bloques completamente al azar.

Se utilizaron tres repeticiones, la unidad experimental estuvo constituida por 750 anteras de arroz sembradas en 30 cajas petri, con un promedio de 25 anteras por caja, a cada caja se les colocó el solidificador respectivo (agarosa o estracto de arroz), a los cuales se les aplicó 15 ml del medio de cultivo N_6.

6.3 Modelo estadistico

El modelo estadistico utilizado en la fase de inducción de callo, consistió en un diseño de bloques al azar con arreglo en parcelas divididas, donde la parcela grande estuvo representada por el factorial variedades de arroz y dosis de radiación, y la parcela pequeña estuvo representada por el solidificador o gelificante. El modelo estadistico es el siguiente.

$$Y_{ijkl} = M + A_i + V_j + R_k + (VR)_{jk} + E(a) + S_l + VS + RS + (VRS) + E(b)$$

donde:

M = media general de los tratamientos

A_i = efecto de la iésima repetición

V_j = efecto de la j-ésima variedad

R_k = efecto de k-ésima dosis de radiación

$(VR)_{jk}$ = interacción entre las variedades y las dosis de radiación

E(a) = efecto del error a

S_l = efecto del solidificador o gelificante

VS = interacción entre las variedades y el solidificador o gelificante

RS = interacción entre la radiación y el solidificador

(VRS) = interacción entre la variedad, radiación y solidificador

E(b) = efecto del error b

j = 1,2,3 ... 6 = variedades

k = 1,2,3 = dosis de radiación

l = 1,2 = solidificadores

6.4 Variables a evaluar

Para el medio de inducción de callo se determinó el número de anteras que formaron callo, el cual se realizó a los 60 días después de la siembra.

6.4.1 Número de anteras que forman callo:

$$\% \text{ de callos} = \frac{\text{No. de anteras que forman callo}}{\text{total de anteras sembradas}} * 100$$

6.4.2 Regeneración de Plantas

En la fase de regeneración de plantas únicamente se tomaron en cuenta los tratamientos que formaron callo, estos datos se tomaron 6 semanas después de transferidos los callos al medio de regeneración mediante la fórmula siguiente:

$$P.C.R.P.V. = \frac{\text{No. callos que formaron plantas verdes}}{\text{No. total de callos inoculados}} * 100$$

P.C.R.P.V.= % de callos que regeneraron plantas verdes

6.5 Análisis Estadístico

Los valores que se obtuvieron en la inducción de callos como en la regeneración de plantas de las variedades de arroz, Crispo-38, Virginia, Línea-50, Pico Negro, Polochic y Precozicta, fueron sometidos a un análisis de varianza (ANDEVA), como a su respectiva prueba de medias de Duncan.

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1 Inducción a la formación de callo

Todos los materiales de arroz, respondieron a la inducción de callo aunque en los materiales Crispo-38, Polochic y Línea 50 los resultados fueron muy bajos.

Un detalle que vale la pena resaltar, es el incremento del porcentaje de formación de callo con el tratamiento con 15 Kilorad de radiación en casi todos los materiales de arroz como también la disminución del porcentaje de formación de callo con el tratamiento de 30 kilorad, ésto nos puede indicar que el efecto de la irradiación tiende a aumentar el porcentaje de la formación de callos utilizando dosis bajas de radiación, efecto que se puede observar en el cuadro 7, y figuras 5 y 6. Resultados que coinsiden con los del Dr Zapata (cuadro No.3)

Podemos observar que la variedad con mayor porcentaje de formación de callo fue Precozicta con 15 Kilorad de radiación, en la cual se formaron 66 callos equivalente a 2.93% , seguido por la variedad Pico Negro sin irradiación (0 Krd) con 43 callos formados equivalente a 1.91% de formación. Esto es con respecto al solidificador agarosa, mientras que con el solidificador extracto de arroz también la variedad Precozicta con 15 kilorad de radiación obtuvo el mayor número de callos (25 callos) equivalente a 1.11% de formación, seguida por la misma variedad Precozicta pero sin irradiación (0 Krd) con 20 callos formados equivalente a 0.88% de formación. Las demás variedades respondieron pero en muy bajo porcentaje (cuadro 7), figuras 5 y 6.

CUADRO No. 7 RESULTADOS OBTENIDOS DEL % DE FORMACION DE CALLO POR VARIEDAD DE ARROZ, DOSIS DE RADIACION Y TIPO DE SOLIDIFICADOR.

	AGAROSA			EXTRACTO DE ARROZ		
VARIEDAD DE ARROZ	0 Krd	15 Krd	30 Krd	0 Krd	15 Krd	30 Krd
PRECOZICTA	37* 1.64**	66.00 2.93	33.00 1.46	20.00 0.88	25.00 1.11	6.00 0.26
VIRGINIA	0.00 0.00	19.00 0.84	4.00 0.18	0.00 0.00	3.00 0.13	1.00 0.04
PICO NEGRO	43.00 1.91	31.00 1.37	30.00 1.33	7.00 0.31	0.00 0.00	6.00 0.26
CRISPO-38	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	13.00 0.58	0.00 0.00
POLOCHIC	0.00 0.00	14.00 0.62	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00	0.00 0.00
LINEA-50	3.00 0.13	5.00 0.22	2.00 0.08	0.00 0.00	0.00 0.00	1.00 0.04

* = Número real de callos obtenidos en el tratamiento.

** = Porcentaje de formación de callo promedio.

FIGURA No. 5 RESPUESTA A LA FORMACION DE CALLO DE LAS SEIS VARIEDADES DE ARROZ, TRES DOSIS DE RADIACION, UTILIZANDO EL SOLIDIFICADOR AGAROSA.

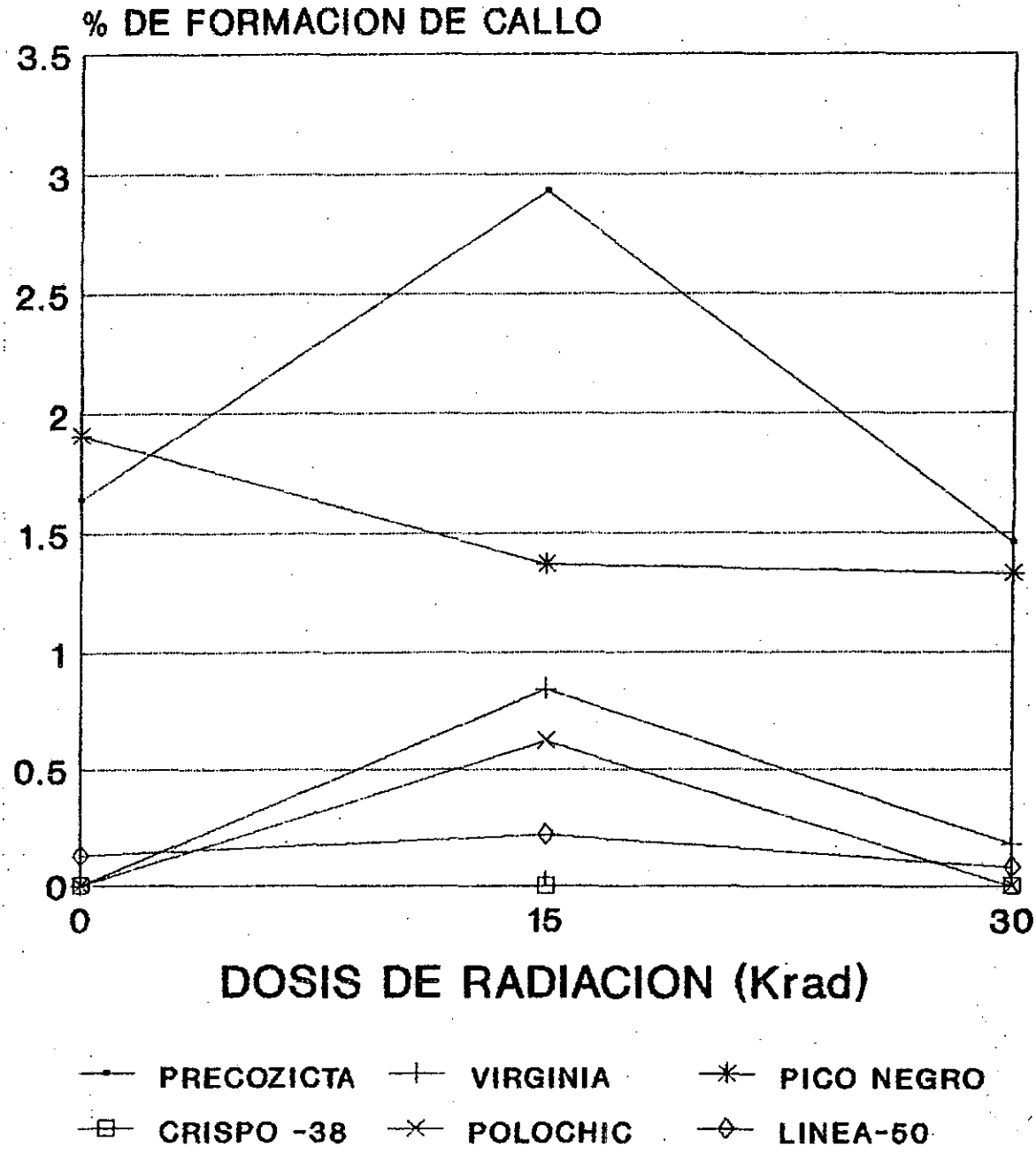
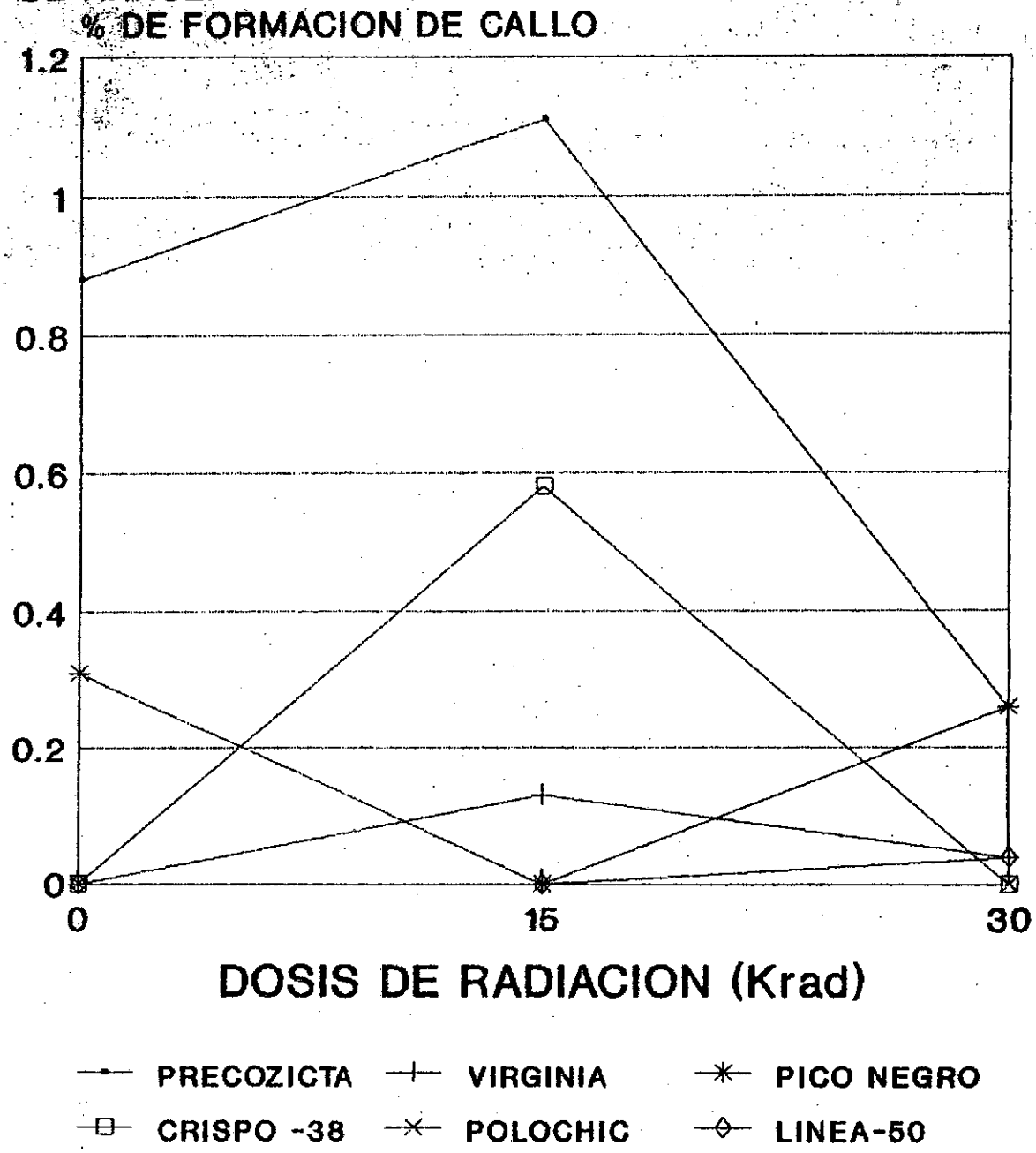


FIGURA No. 6 RESPUESTA A LA FORMACION DE CALLO DE LAS SEIS VARIEDADES DE ARROZ, TRES DOSIS DE RADIACION, UTILIZANDO EL SOLIDIFICADOR EXTRACTO DE ARROZ.



En base a al análisis de varianza (ANDEVA) en el cuadro No. 8 podemos observar que hay diferencia significativa en los factores VARIEDAD, SOLIDIFICADOR O GELIFICANTE, y en la interracción VARIEDAD X SOLIDIFICADOR O GELIFICANTE; por lo que a cada uno de ellos fue necesario hacerle su prueba de medias Duncan's.

CUADRO No. 8 RESULTADOS DEL ANALISIS DE VARIANZA (ANDEVA), PRACTICADO AL PORCENTAJE DE FORMACION DE CALLOS.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.	Pr
REP	2	9.97	4.99	2.47	0.0993
VAR	5	55.66	11.13	5.52	0.0008*
RAD	2	4.30	2.15	1.07	0.3554
VAR*RAD	10	7.45	0.74	0.37	0.9513
ERROR (A)	34	68.53	2.01		
GEL.	1	7.20	7.20	10.83	0.0022**
VAR*GEL.	5	9.61	1.92	2.89	0.0270*
RAD*GEL.	2	0.43	0.22	0.33	0.7226
VAR*RAD*GEL.	10	1.66	0.17	0.25	0.9880
ERROR (B)	36	23.93	0.66		
TOTAL	107	115.81			

C.V = 165.68

El coeficiente de variación (C.V) es muy elevado (165.68) pero esto fenómeno se justifica por el alto número de unidades con cero por ciento de formación de callos que normalmente se obtiene en éste tipo de trabajos y que crean mucha variabilidad en los resultados.

Cuadro 9. Resultados de la Prueba de Medias Duncan's practicado a las modalidades del factor inducción de callo para las diferentes variedades:

VARIEDAD	MEDIA	AGRUPAMIENTO DUNCAN'S
Precozicta	2.829	A
Pico Negro	1.732	AB
Virginia	0.400	BC
Polochic	0.207	C
Crispo-38	0.192	C
Línea 50	0.163	C

Tratamientos con la misma letra son estadísticamente iguales.

Tal y como se mencionó anteriormente en cuadro 7 y figuras 5 y 6 las variedes con más altos porcentajes de formación fueron precozicta y Pico Negro, nuevamente se comprueba por medio de la prueba de Duncan que la variedad Precozicta obtuvo la media más alta 2.829% de formación seguida por Pico Negro con 1.732% de formación aunque no existe diferencia significativa entre una y otra pero resultaron mejor que las variedades restantes.

Cuadro 10 Resultados de la prueba de medias Duncan's practicado a las modalidades del factor Solidificador o Gelificante

SOLIDIFICADOR	MEDIA	AGRUPAMIENTO
Agarosa	0.719	A
Extracto de Arroz	0.202	B

Tal y como podemos observar en el cuadro 10, con el solidificador agarosa se obtuvo la mayor media en cuanto a porcentaje de formación de callo con 0.719% en todo el experimento, no habiendo diferencia significativa entre un solidificador y el otro.

Cuadro 11. Resultado de la prueba de medias Duncan's practicado a la interacción Variedad X Solidificador o Gelificante en cuanto a porcentaje de formación de callos.

VARIEDAD X SOLIDIFICADOR	MEDIA	AGRUPAMIENTO
Precozicta X Agarosa	2.070	A
Pico Negro X Extracto de Arroz	1.540	A B
Precozicta X Extracto de Arroz	0.754	A B C

Como podemos observar en este cuadro 11, no hubo diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, variando las medias de 1-2 % de inducción de callo,obteniendose la media más alta (2.070%) para la variedad precozicta con el solidificador agarosa, seguida de Pico Negro con Extracto de Arroz (1.540%), no hubo necesidad de incluir los demas tratamientos por ser sus medias demasiado bajas.

7.2 Regeneración de plantas a partir de callos

Para este tipo de análisis, se utilizó un diseño de bloques completamente al azar con diferentes repeticiones, ya que no se contó con suficiente cantidad de callos, por lo tanto unicamente se tomaron en cuenta aquellos tratamientos que formaron callos. Observando el cuadro No.12 podemos

ver que la variedad Precozicta tanto para un solidificador (Agarosa) como para el otro (Extracto de Arroz), obtuvo el mayor porcentaje de callos que regeneraron plantas verdes. El mayor porcentaje de callos que formaron plantas verdes se obtuvo con la dosis de 15 kilorad (12.00%) con el solidificador Extracto de Arroz, seguido por la misma variedad Precozicta con 30 kilorad de radiación (11.42%) con el solidificador Agarosa. La variedad Virginia con 15 kilorad de radiación obtuvo 100% de regeneración de plantas verdes con el solidificador Extracto de Arroz, pero este resultado se dió unicamente en una de sus repeticiones, mientras que en las repeticiones restantes dió cero porciento (0%) de regeneración de plantas verdes, por lo que no se le puede considerar como una variedad que regenere siempre un alto porcentaje de plantas verdes, como sucede con la variedad Precozicta (ver cuadro No.12). Los demás materiales de arroz no respondieron a la regeneración de plantas (Pico Negro,Polochic,Linea-50), mientras que la variedad Crispo-38 respondió en una de sus repeticiones con 7.69% de regeneración de plantas verdes.

CUADRO No 12 RESULTADOS DE REGENERACION DE PLANTAS DE LOS GENOTIPOS Y DOSIS DE RADIACION QUE FORMARON CALLO A PARTIR DE ANTERAS.

	AGAROSA			EXTRACTO DE ARROZ		
VARIEDAD DE ARROZ	0 Krd	15 Krd	30 Krd	0 Krd	15 Krd	30 Krd
PRECOZICTA	37* 4** 10.81***	66.00 6 00 9.09	35.00 4.00 11.42	20.00 2.00 10.00	25.00 3.00 12.00	6.00 --- ---
VIRGINIA	--- --- ---	19.00 1.00 5.26	4.00 --- ---	--- --- ---	3.00 3.00 100.00	1.00 --- ---
PICO NEGRO	43.00 --- ---	31.00 --- ---	30.00 --- ---	7.00 --- ---	--- --- ---	6.00 --- ---
CRISPO-38	--- --- ---	--- --- ---	--- --- ---	--- --- ---	13.00 1.00 7.69	--- --- ---
POLOCHIC	--- --- ---	14.00 --- ---	--- --- ---	--- --- ---	--- --- ---	--- --- ---
LINEA-50	3.00 --- ---	5.00 --- ---	2.00 --- ---	--- --- ---	--- --- ---	1.00 --- ---

* = No. de callos inoculados.

** = Número de callos que formaron plantas verdes.

*** = % de callos que regeneraron plantas verdes.

--- = No hubo formación de callo.

Cuadro No 13. Resultados del análisis de varianza (ANDEVA) para la variable número de callos que formaron plantas verdes. *

	G.L	S.C.	C.M.	F.	Pr
TRATAMIENTOS	20	3.23	0.161	1.00	0.51
ERROR	15	2.43	0.162		
TOTAL	35	5.66			

C.V= 32.762344

En el análisis de varianza practicado al porcentaje de callos que regeneraron plantas verdes, no hubo diferencia significativa entre los tratamientos.

Cuadro No 14. Resultados de la prueba de medias Duncan's para la variable número de callos que formaron plantas verdes. *

No. DE TRATAMIENTO	MEDIA	AGRUPAMIENTO
15	2.000	A
14	2.000	A
11	1.732	A
3	1.549	A
1	1.520	A
7	1.488	A
16	1.207	A
4	1.138	A
2	1.000	A
10	1.000	A
5	1.000	A
12	1.000	A
9	1.000	A
6	1.000	A
13	1.000	A
8	1.000	A
17	1.000	A
18	1.000	A
19	1.000	A
20	1.000	A
21	1.000	A

* Los datos de la variable fueron trasnformados por ($\sqrt{X+1}$).

Los resultados de la prueba de medias de Duncan's nos muestran que no hubo diferencia significativa entre los tratamientos, comportandose las medias con valores que van de 1.000 a 2.000%.

Los mejores tratamientos poseen las medias más altas y son las siguientes:El tratamiento 15 que corresponde a la variedad Virginia con 15 kilorad de radiación utilizando el solidificador extracto de Arroz pero unicamente en una de sus repeticiones,seguido por el tratamiento 14 que corresponde a la variedad Precozicta con 15 kilorad de radiación,utilizando el solidificador Agarosa, ambos con 2.00% de regeneración de plantas, el tercer tratamiento con una media de 1.732% de regeneración de plantas le corresponde a la variedad Precozicta sin iirradiación (0 krd) utilizando el solidificador Agarosa.

Como podemos ver,en el cuadro No.14 la tendencia no es continua, para una determinada variedad, como para un determinado solidificador, unicamente podemos apreciar que con la dosis de 15 kilorad se obtuvieron las medias más altas.

8. CONCLUSIONES

1. Todos los Genotipos de arroz respondieron a la inducción de callo, encontrandose las medias más altas con las variedades Precozicta(2.829) y Pico Negro (1.732), seguidas por la variedad Virginia con (0.400), y por ultimo las variedades Polochic(0.207), Crispo-38 (0.192) y Linea-50 (0.163).

2 En cuanto a Radiación, a pesar que la dosis de 15 kilorad obtuvo los porcentajes de formación de callo más altos, no hubo diferencia significativa entre dosis de radiación.

3. Respecto a solidificadores o gelificantes se encontró diferencias significativas mediante la prueba de medias Duncan's entre el solidificador Agarosa y el solidificador Extracto de arroz, obteniendose la media más alta con el solidificador Agarosa (0.719), mientras que con el solidificador Extracto de arroz, se obtuvo una media de (0.202)

4. En la interacción variedad por solidificador, la variedad Precozicta con el solidificador Agarosa obtuvo la media más alta (2.070) en cuanto a formación de callo, seguida por la variedad Pico Negro con el solidificador Extracto de Arroz, no encontrandose diferencias significativas entre un tratamiento y el otro.

5. La respuesta a la regeneración de plantas de las variedades de arroz estudiadas, no clarifica un patrón de respuesta en cuanto a la radiación con cobalto-60, ni en cuanto al tipo de solidificador, ya que hubo poca regeneración de plantas verdes y esa poca regeneración de plantas no obedece a un patrón definido (variedad, solidificador,dosis de radiación).

9.RECOMENDACIONES

1. Evaluar la respuesta al cultivo de anteras en más genotipos de arroz que se esten mejorando geneticamente en Guatemala, para que el mejorador pueda hacer uso de la técnica.

2. Evaluar dosis de radiación Gamma (Co-60) diferentes a las dosis evaluadas en la presente investigación, debido a que no se encontró diferencia significativa entre dosis.

3. La consistencia del medio y el tipo de solidificador influyen directamente en la formación de callo, por ello se recomienda utilizar como solidificador Agarosa, ya que este resultó ser el más efectivo, como también que se evaluen más solidificadores que puedan bajar el costo de uso de la técnica.

4. Se recomienda considerar esta investigación como un trabajo preliminar o básico para futuras investigaciones, utilizando la técnica del cultivo de anteras de arroz pra las variedades mencionadas (Precozictá, Pico Negro, Virginia).

5. Para futuras investigaciones se recomienda que la respuesta a la regeneración de plantas se base en un mayor numero de callos inoculados.

9. BIBLIOGRAFIA

1. CALDERON DIAZ, J. H. 1990. Evaluación de la respuesta de cinco variedades de trigo (Triticum aestivum L.) a la inducción de callo y regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo a partir del cultivo de anteras. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 54 p.

2. CENTRO INTERNACIONAL DE AGRICULTURA TROPICAL (Colombia). 1980. Mejoramiento de arroz. Cali Colombia. 663 p.

3. --------. 1989. Cultivo de anteras en el mejoramiento del arroz. Cali, Colombia. 57 p.

4. CHUNG, G.S. 1988. Rice (Oryza sativa L.) anther culture. Yeongnam crop experiment station, rural development. Milyang, korea. Administration. p 94-107.

5. CRUZ S., J.R. DE LA. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.

6. EUGLADETTE, D. 1969. Techniques agricoles et productions tropicales. Barcelona, Blume. p. 121-149

7. FAO (Italia). 1990. Fundamentos teorico-practicos del cultivo de anteras vegetales. Roma. Estudio FAO. Producción y protección vegetal No. 105. p 43-47.

8. GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. 1988. Estadistica de productos agricolas. 1986-1989. Guatemala. 47 p.

9. --------. INSTITUTO NACIONAL DE SISMOLOGIA, VULCANOLOGIA, METEOROLOGIA e HIDROLOGIA. 1988. Atlas climatológico de la Republica de Guatemala. Guatemala. 21 p.

10. --------. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRGICOLAS 1990 Recomendaciones tecnicas agropecuarias; región III. Guatemala. 37 p.

11. HURTADO M., D.V.; MERINO M.,M.E 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México, Trillas. p. 101-109.

12. MONTEPEQUE ROLDAN, R. 1984 Estudio preliminar del efecto de la radiación Gamma de cobalto-60 sobre la conservación de tuberculos de papa (Solanum tuberosum L.) para consumo durante el periodo de almacenamiento. Tesis de Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 57 p.

13. --------. et al. 1991. Contribución al mejoramiento del arroz (Oryza Sativa L.). a través de inducción artificial de mutaciones con rayos gamma. In Plant, Mutation Breeding for Crop Improvement, Proceedings of a Symposium (1990, Viena 18-22). Viena, IAEA; FAO. p 335-340.

14. ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA (Viena). 1977. Manual on mutation breeding. 2 ed. Viena, FAO/IAEA, division of Atomic Energy in food and Agriculture. Technical Reports series No 119. p 35-37.

15. --------. 1984. Los isotopos en la vida cotidiana. Viena. 43 p.

16. RAINA,S.K. et al. 1989. Improved medium for efficient anther culture of some indica rice hybrids. Germplasm Improvement, Breeding Methods (Filipinas). 14(3):4.

17. REIFFERS, R. et al. 1989. Production of doubled haploid rice plants through anther culture. International Rice Research Newsletter. (Filipinas). 14(3):7. 1989.

18. SIMMONS, C.S.; TARANO, J.M.; PINTO, J.H. 1959 Clasificación de reconocimiento de los suelos de la Republica de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulzona. Guatemala, Ed. José de Pineda Ibarra. 1000 p.

19. ZAPATA , F.J; E.S. Ella, 1987. specific gravity the grain-a factor to consider In Rice somatic cell culture. s.n t. p 66-70.

Vo. Bo. Quiroa de la Baca

APENDICE No.1 RESULTADOS DE LA REPETICION I PARA INDUCCION DE CALLO COMO PARA GENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ.

VARIEDADES DE ARROZ	DOSIS DE RADIA-CION (Krd)	SOLIDIFICADORES					
		AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ	AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ	AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ
		#CALLOS FORMADOS		#PLANTA VERDES		ALBINAS	
PRECOZICTA	0	2	-	2	-	-	-
PRECOZICTA	15	14	-	20	-	37	-
PRECOZICTA	30	2	-	7	-	-	-
VIRGINIA	0	-	-	-	-	-	-
VIRGINIA	15	12	-	4	-	20	-
VIRGINIA	30	4	-	-	-	11	-
PICO NEGRO	0	-	-	-	-	-	-
PICO NEGRO	15	-	-	-	-	-	-
PICO NEGRO	30	-	-	-	-	-	-
KRISPO-38	0	-	-	-	-	-	-
KRISPO-38	15	-	-	-	-	-	-
KRISPO-38	30	-	-	-	-	-	-
POLOCHIC	0	-	-	-	-	-	-
POLOCHIC	15	10	-	-	-	-	-
POLOCHIC	30	-	-	-	-	-	-
LINEA-50	0	2	-	-	-	-	-
LINEA-50	15	2	-	-	-	-	-
LINEA-50	30	2	-	-	-	-	-

APENDICE No.2 RESULTADOS DE LA REPETICION II PARA INDUCCION DE CALLO COMO PARA GENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ.

VARIEDADES DE ARROZ	DOSIS DE RADIA-CION (Krd)	SOLIDIFICADORES					
		AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ	AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ	AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ
		#CALLOS FORMADOS		#PLANTA VERDES		ALBINAS	
PRECOZICTA	0	12	20	6	27	1	-
PRECOZICTA	15	31	25	-	12	-	-
PRECOZICTA	30	9	-	-	-	-	-
VIRGINIA	0	-	-	-	-	-	-
VIRGINIA	15	6	3	-	30	-	-
VIRGINIA	30	-	-	-	-	-	-
PICO NEGRO	0	36	3	-	-	-	2
PICO NEGRO	15	31	-	-	-	-	-
PICO NEGRO	30	-	-	-	-	-	-
KRISPO-38	0	-	-	-	-	-	-
KRISPO-38	15	-	10	-	5	-	3
KRISPO-38	30	-	-	-	-	-	-
POLOCHIC	0	-	-	-	-	-	-
POLOCHIC	15	3	-	-	-	-	-
POLOCHIC	30	-	-	-	-	-	-
LINEA-50	0	-	-	-	-	-	-
LINEA-50	15	3	-	-	-	-	-
LINEA-50	30	-	-	-	-	-	-

APENDICE No.3 RESULTADOS DE LA REPETICION III PARA INDUCCION DE CALLO COMO PARA GENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS DE ARROZ.

VARIEDADES DE ARROZ	DOSIS DE RADIA-CION (Krd)	SOLIDIFICADORES					
		AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ	AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ	AGAROSA	EXTRACTO DE ARROZ
		#CALLOS FORMADOS		#PLANTA VERDES		ALBINAS	
PRECOZICTA	0	25	-	4	-	5	-
PRECOZICTA	15	21	-	-	-	-	4
PRECOZICTA	30	24	6	17	-	3	-
VIRGINIA	0	-	-	-	-	-	-
VIRGINIA	15	1	-	-	-	-	-
VIRGINIA	30	-	1	-	-	-	-
PICO NEGRO	0	7	4	-	-	-	-
PICO NEGRO	15	-	-	-	-	-	-
PICO NEGRO	30	30	6	-	-	-	-
KRISPO-38	0	-	-	-	-	-	-
KRISPO-38	15	-	3	-	-	-	-
KRISPO-38	30	-	-	-	-	-	-
POLOCHIC	0	-	-	-	-	-	-
POLOCHIC	15	1	-	-	-	-	-
POLOCHIC	30	-	-	-	-	-	-
LINEA-50	0	1	-	-	-	-	-
LINEA-50	15	-	-	-	-	-	-
LINEA-50	30	-	1	-	-	-	-

APENDICE No. 4 RESULTADOS TOTALES DE LAS TRES REPETICIONES DE SIEMBRA DE ANTERAS DE ARROZ Y REGENERACION DE PLANTAS.

0 Krd

VARIEDAD DE ARROZ	AGAROSA				EXTRACTO DE ARROZ			
	ANTERAS SEMBRADAS	CALLOS FORMADOS	PLANTAS VERDES	PLANTAS ALBINAS	ANTERAS SEMBRADAS	CALLOS FORMADOS	PLANTAS VERDES	PLANTAS ALBINAS
PRECOZICTA	2,250	39	12	6	2,250	20	27	18
VIRGINIA	2,250	0	0	0	2,250	0	0	0
PICO NEGRO	2,250	43	0	2	2,250	7	0	2
CRISPO-38	2,250	0	0	0	2,250	0	0	0
POLOCHIC	2,250	0	0	0	2,250	0	0	0
LINEA-50	2,250	3	0	0	2,250	0	0	0

15 Krd

PRECOZICTA	2,250	66	20	37	2,250	25	12	6
VIRGINIA	2,250	19	4	20	2,250	3	30	0
PICO NEGRO	2,250	31	0	0	2,250	0	0	0
CRISPO-38	2,250	0	0	0	2,250	13	5	3
POLOCHIC	2,250	14	0	0	2,250	2	0	0
LINEA-50	2,250	5	0	0	2,250	0	0	0

30 Krd

PRECOZICTA	2,250	35	24	3	2,250	6	0	0
VIRGINIA	2,250	4	0	11	2,250	1	0	0
PICO NEGRO	2,250	30	0	0	2,250	6	0	0
CRISPO-38	2,250	0	0	0	2,250	0	0	0
POLOCHIC	2,250	0	0	0	2,250	0	0	0
LINEA-50	2,250	0	0	0	2,250	1	0	0

APENDICE No.5 CRONOGRAMA DE ACTIVIDADES

ACTIVIDADES	AÑO.	1,992			1,993								1,994		
	MES.	SEP.	OCT.	NOV.	FEB.	MAR.	ABR.	MAY.	JUN.	JUL.	AGO.	NOV.	FEB.	MAR.	ABR.
	SEMANAS.	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234	1234
1. OBTENCION DE SEMILLA.		▮													
2. IRRADIACION DE SEMILLA.		▮													
3. SIEMBRAS DE SEMILLA IRRADIADA.		▮	▮	▮	▮		▮		▮	▮	▮	▮			
4. DETERMINACION DEL ESTADO UNINUCLEADO DE MICROSPORA.				▮	▮	▮	▮		▮		▮	▮			
5. PREPARACION DE MEDIOS DE INDUCCION DE CALLO				▮	▮		▮		▮		▮	▮			
6. SIEMBRA DE ANTERAS				▮	▮		▮		▮		▮	▮			
7. LECTURAS, RESULTADOS INDUCCION DE CALLO.					▮	▮	▮			▮	▮	▮			
8. PREPARACION DE MEDIOS DE REGENERACION.					▮	▮				▮		▮			
9. TRANSFERENCIA DE CALLOS.					▮	▮	▮			▮		▮	▮		
10. LECTURA DE RESULTADOS REGENERACION.							▮	▮				▮		▮	▮
11. ANALISIS DE LA INFORMACION.														▮	▮

1234 = ORDEN DE SEMANAS.
▮ = UNA SEMANA.

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
FACULTAD DE AGRONOMIA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

Ref. Sem.048-94

LA TESIS TITULADA: "IRRADIACION DE SEMILLAS DE ARROZ (Oryza sativa L.) CON RAYOS GAMMA (Co-60) Y SU EFECTO SOBRE LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS EN CULTIVO DE ANTERAS, UTILIZANDO DIFERENTES SOLIDIFICADORES EN EL MEDIO DE CULTIVO".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: RAUL ENRIQUE MACZ MARQUEZ

CARNET No: 8318546

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Aníbal Martínez
Dr. Luis Mejía
Ing. Agr. Francisco Vásquez
Ing. Agr. Eduardo Pretzanzin

Los Asesores y las Autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Ing. Agr. Romeo Montepeque
A S E S O R

Ing. Agr. Héctor Ramazzini
A S E S O R

Ing. Agr. Rolando Lara Alecio
DIRECTOR DEL IIA.

FACULTAD DE AGRONOMIA USAC
DIRECCION
Instituto de Investigaciones Agronómicas

I M P R I M A S E

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS
DECANO
FACULTAD DE AGRONOMIA

Ing. Agr. Efraín Medina Guerra
D E C A N O

APARTADO POSTAL 1545 • 01901 GUATEMALA, C. A.
TELEFONO: 769794 • FAX (5022) 769675

c.c.Control Académico
Archivo
/prr.