

Resumen P. Clove
Abstract

César P. Martínez, Zaida Lentini y Patricia Reyes *

Progr. Arroz
CIAT
AN - - - -

Key words

1. INTRODUCCION

La producción actual de arroz cáscara a nivel mundial (530 millones de toneladas métricas) debe aumentarse en un 70% si se quiere suplir su demanda en el año 2025. Sin embargo, este aumento debe lograrse virtualmente casi sobre la misma superficie en que se cultiva el grano en la actualidad. Por consiguiente, deben emplearse nuevas estrategias y técnicas para superar dicho reto. El desarrollo de la biotecnología ha puesto al servicio del hombre nuevas herramientas, que pueden ayudar a encontrar soluciones viables: el cultivo de anteras (CA) es una de tales herramientas.

Niizeki y Oono en 1968 fueron los primeros en regenerar plantas a través del CA en arroz y desde entonces, esta técnica se ha utilizado con éxito en el mejoramiento de este cultivo generando más de 80 variedades en Asia y Estados Unidos (Liang and Huang, 1991). No obstante, su aplicación en los programas de mejoramiento como una herramienta rutinaria ha estado limitada en especial por la gran influencia

* Fitomejorador, Especialista en Cultivo de Tejidos y Asistente de Investigación respectivamente del Programa Arroz del CIAT, Cali, Colombia. Trabajo presentado en el IV Congreso Nacional de la Sociedad Colombiana de Cultivos. Chinchiná, Caldas. Mayo 8-10. 1995.

del genotipo sobre la respuesta *in vitro*, obteniéndose una mayor respuesta en el arroz tipo japónica (Chen and Lin, 1981; Lentini *et al.* (1995). El CA puede definirse como una manipulación *in vitro* de los granos de polen inmaduros formados en la antera con el fin de inducir el desarrollo esporofítico. En el caso del arroz, este proceso ocurre a través de la formación de un tejido no diferenciado llamado callo que culmina en la formación de embriones y/o plantas, fenómeno conocido como androgénesis. La técnica de CA en arroz ha alcanzado niveles en donde se producen un gran número de plantas doble haploides (DH) a partir de cultivares o híbridos; en sólo una generación se obtienen líneas homocigotas, lo cual requiere alrededor de seis generaciones por el método convencional de mejoramiento.

El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) desde 1985 viene investigando cómo incorporar el CA al programa de mejoramiento de arroz. Uno de los primeros logros fue el desarrollo de una metodología que permite el cultivo de 8000 a 10000 anteras/persona/día, que genera de 30 a 200 plantas doble haploides, dependiendo del genotipo. El objetivo de este artículo es presentar un análisis de las implicaciones genéticas y prácticas del uso del CA.

2. DESARROLLO DEL PROTOCOLO

El principal enfoque de la investigación realizada en CA fue el desarrollo de una metodología eficiente, confiable y económica, con el fin de generar un número

suficiente de DH, requisito indispensable en un programa de fitomejoramiento. Se dió prioridad a la determinación de los posibles factores que afectan la respuesta de genotipos utilizados en los programas de fitomejoramiento de arroz en América Latina, y de forma específica la respuesta de cultivares recalcitrantes del tipo índica

Los estudios preliminares (Pulver, 1986; CIAT, 1991) probaron varias maneras de sembrar las anteras, evaluaron varios medios de inducción y regeneración y estimaron el efecto de exponer previamente las anteras a distintas temperaturas (8-40 °C). Esta metodología inicial fué recopilada en un manual (Núñez *et al.* 1989), que se modificó en fecha reciente (Lentini *et al.* 1995) en especial en lo referente a los medios de cultivo utilizados (Cuadro 1). El protocolo seguido se puede resumir así (Figura 1):

Los cultivares o las plantas F₁ ó F₂ que se van a pasar por CA se siembran en el campo; la selección de las panículas que proveerán las anteras se hace en la etapa de embuchamiento en el momento en que la distancia entre las aurículas de las dos primeras hojas es de 4 a 8 cm. Esta distancia está asociada con la presencia de flores de color amarillo verdoso y consistencia frágil; además, está muy correlacionada con los estados uninucleado medio y/o tardío, en los cuales la respuesta es óptima. Las panículas se colocan en bolsas plásticas y se llevan al laboratorio en donde se incuban a 8-10°C durante 7-8 días. En seguida se sacan de la vaina de la hoja y se escoge el tercio medio, que se sumerge en etanol del 70% durante un minuto; luego se colocan durante 3 minutos en una solución de hipoclorito de sodio al 10%. Después se lavan en agua destilada y se colocan en una caja petri en donde se cortan las flores por la

base; luego se toman con una pinza por el otro extremo y se golpean contra el borde del frasco que contiene el medio de cultivo (N₆m o NL) para la inducción de callos. Se siembran 250 anteras por 10ml del medio de inducción; los frascos se guardan en un lugar oscuro a una temperatura entre 24 y 27°C durante 4-6 semanas. Estas condiciones conducen a la formación de los microcallos, los cuales se transfieren al medio de regeneración Murashige Skoog (MS) y se mantienen a 24 - 26°C y 16 horas de luz. Según el genotipo, entre los 30-40 días aparecen las plantas ya formadas, que se sacan de los frascos y se llevan al invernadero para un período de endurecimiento o adaptación; de allí se llevan al campo en donde se cosechan en forma separada. Cada planta (R₁) obtenida representa un genotipo diferente, que se somete después a las pruebas de evaluación y selección propias de un programa de mejoramiento. Las modificaciones hechas en el protocolo han incrementado en cerca de 16 veces la respuesta de cultivares índicas. En general se siembran 7000 anteras por cruzamiento de los cuales entre el 14 y el 27% producen callos (900 - 2000); de éstos se obtienen entre 70 a 200 plantas; sólo una parte de ellas (50 - 60%) son DH, que son fáciles de identificar por su morfología y fertilidad alta.

3. COMPORTAMIENTO DE LAS LINEAS DERIVADAS DEL CULTIVO DE ANTERAS

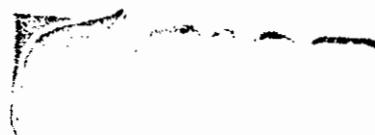
Se realizaron varios estudios para determinar si los doble haploides son comparables desde el punto de vista agronómico con las líneas obtenidas a través del mejoramiento convencional. Los criterios usados para esas comparaciones fueron rendimiento,

altura, ciclo vegetativo, vigor y calidad de grano.

- a. Comparación del potencial de rendimiento de doble haploides derivados a partir de ocho cultivares de arroz

Se compararon entre sí 85 DHs obtenidos a partir de ocho cultivares y con sus correspondientes padres (cultivares no pasados por CA) por su potencial de rendimiento usando un diseño de bloques al azar con tres repeticiones. El ensayo se realizó bajo riego y transplante en CIAT, Palmira, (Cuadro 2). Como se esperaba, hubo diferencias significativas ($p = .05$) entre los rendimientos promedios de las líneas DHs derivadas de diferentes variedades de arroz; la más alta producción fué para los DH derivados de Cica 8 y Oryzica 1, variedades altamente productivas en las condiciones tropicales irrigadas. Excepto en el caso de TOX 1871-38, no hubo diferencias significativas entre el rendimiento promedio de una variedad dada y el rendimiento promedio de los DHs derivados de esa misma variedad. Sin embargo, el rendimiento promedio de algunos DH de TOX 1011-4-1, TOX 1871-38 y TOX 1010-49 fué significativamente más alto ($LSD = 963.3 \text{ kg/ha}$; $p = .05$) que el rendimiento promedio de sus respectivos padres. Estos cultivares son líneas mejoradas introducidas al CIAT del Programa de Mejoramiento Secano del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA); en general, la purificación intensiva de esos materiales no se efectúa en IITA, mientras que el método del pedigrí practicado en CIAT permite un alto grado de purificación. Quizás la técnica del CA permitió expresar variabilidad

dentro de "Líneas Heterogéneas", ó reveló alguna segregación residual, por lo cual produjo DH que difieren en su potencial de rendimiento de las líneas parentales. Esto también puede explicar por qué la producción media de TOX 1871-38 fué significativamente diferente de la producción media de los DHs derivados de éste. Estos resultados sugieren que la heterogeneidad y quizás la segregación residual, pueden ser convenientemente exhibidas via CA en materiales mejorados que no han sufrido un alto grado de purificación.



b. Evaluación del potencial de rendimiento de doble haploides obtenidos de líneas R_2 .

DOCUMENTACIÓN

Se cosecharon panículas de plantas F_2 y F_3 de siete cruces diferentes y se pasaron por CA; se produjeron 19 doble haploides (líneas R_2) y se obtuvo un segundo grupo de 59 líneas doble haploides a partir de ellos (Cuadro 3). Se usó un diseño de bloques al azar para comparar el potencial de rendimiento de las líneas R_2 y las 59 líneas doble haploides obtenidas a partir de éstos; el experimento se estableció bajo condiciones de riego y transplante con tres replicaciones en CIAT, Palmira. El análisis estadístico mostró diferencias significativas al nivel del 5% ($LSD = 700.3$ kg/ha) entre el rendimiento promedio de los cruces, pero no entre el rendimiento promedio del segundo grupo de líneas doble haploides y los doble haploides originales (R_2). La mayoría de los doble haploides fueron muy similares a sus padres (líneas R_2) en términos de características de las plantas tales como altura y tipo de planta, floración,

tipo de grano y vigor, pero algunos doble haploides fueron más altos que sus respectivos padres. Estos datos sugieren que dos pases consecutivos a través del CA no tienen efectos deletéreos o negativos en las progenies obtenidas.

c. Comparación de doble haploides y líneas pedigree F_3 y F_4 .

El objetivo fué comparar el potencial de rendimiento de líneas de arroz provenientes de los mismos cruces y desarrolladas por el método pedigree y CA. A partir de 11 líneas F_3 se obtuvieron 37 líneas F_4 y 42 doble haploides. Estos materiales correspondían a siete cruces diferentes y se compararon bajo condiciones de riego y transplante en un diseño de bloques al azar, con tres repeticiones. Parte del análisis estadístico se presenta en el Cuadro 4 y los datos de rendimiento en el Cuadro 5. Hubo diferencias significativas en la producción media en el caso de padres, líneas y cruces. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la producción media entre generaciones (DH, F_3 y F_4) y en la interacción cruces por generación; pero sí diferencias significativas entre líneas hermanas. El Cuadro 6 muestra diferencias significativas entre DHs obtenidos de la línea F_3 CT6741-1-1 y entre las líneas pedigree F_4 derivadas de la línea F_3 CT6742-12-1; se presentaron también diferencias significativas entre DHs obtenidos de la línea F_3 CT6746-4-1 (datos no incluidos). Esto indica que la variabilidad genética para potencial de rendimiento se mantuvo tanto en el caso de CA como en el método pedigree. Basados en el desempeño agronómico, y en rendimiento se puede concluir que tanto a través del CA como del

método pedigrí se pueden producir líneas homocigotas deseables.

Los datos de estos 3 ensayos indican que no existen efectos negativos asociados con los DH obtenidos a través del CA. Resultados similares fueron encontrados por Raina (1989) en arroz, y por Reimbergs *et al.* (1978), Morden *et al.* (1989), Collins *et al.* (1974), Meredith *et al.* (1970), y Feaster y Turcotte (1973), en el caso de cebada, tabaco y algodón, respectivamente.

4. APLICACION DEL CULTIVO DE ANTERAS

Esta herramienta de trabajo se utiliza en distintas formas en el programa de arroz del CIAT, en especial para: desarrollar germoplasma con características específicas para determinados ecosistemas como líneas tolerantes al frío, precoces y de buena calidad para Chile; facilitar la introgresión de caracteres deseables entre acervos genéticos de origen distinto, como es el arroz de riego y seco; obviar en parte, el problema de esterilidad que se presenta en ciertos tipos de cruzamientos amplios; reducir el tiempo requerido para la obtención de líneas homocigotas estables; obtener líneas para el mapeo de genes a través de las técnicas de PCR y RFLP; inducir variación somaclonal. A continuación se presentarán algunos ejemplos ilustrativos.

- a. Se realizaron cruzamientos triples (Cuadro 7) entre cultivares chilenos Diamante, Oro y Quillas (tolerantes a bajas temperaturas) y Lemont (excelente calidad de grano pero susceptible al frío). Estos cruzamientos se procesaron

por CA y también por el sistema de pedigrí. Se observó una esterilidad muy alta en las generaciones F_1 y F_2 y al final se obtuvieron 270 líneas F_5 ; la esterilidad no fué problema en el caso del CA y se obtuvieron 941 DHs, los cuales, después de evaluaciones por calidad, precocidad, y tipo de planta, se redujeron a 190 líneas R_3 . La principal diferencia entre los dos métodos (pedigrí y CA) fué el tiempo; se necesitaron 4 generaciones (24 meses) para generar las 270 líneas F_5 , en tanto que los 190 DHs se identificaron en 9 meses. Todo este material se envió a Chile y luego de 3 años de evaluaciones en campos experimentales y de agricultores se identificaron 55 líneas DH como promisorias para las condiciones de Chile. El Cuadro 8 presenta datos sobre tolerancia al frío en el estado reproductivo; la esterilidad en los testigos tolerantes (Oro, Quilla y Diamante) varió entre 17 y 33%, en tanto que en los testigos susceptibles (Lemont y Bluebelle) fué del 75 al 91%. Los datos indican que ambos métodos (pedigrí y CA) fueron efectivos en la generación de germoplasma mejorado tolerante al frío. La evaluación del potencial de rendimiento se presenta en el Cuadro 9; el análisis estadístico indicó diferencias significativas entre cultivares; la línea CT6743-47-6-CA-4 rindió significativamente más que Oro (la variedad mas cultivada en Chile) pero igual que Diamante y Perla; en tanto que la línea CT6743- F_2 -CA-20 rindió lo mismo que Oro y Diamante. Los datos indican que líneas obtenidas a través del CA rinden tanto como variedades comerciales obtenidas mediante otros métodos. Los mejores DHs seleccionados en Chile se enviaron a otros países como

Argentina, Brasil, Uruguay, Cuba y Francia, en donde se están utilizando como progenitores en sus programas de mejoramiento. En el caso de Francia, la línea doble haploide CT6749-36-CA-2 fué liberado por el CIRAD-CA en septiembre de 1995 como variedad comercial con el nombre de INCA. Bajo las condiciones de riego en Camargo, Francia, INCA rinde en promedio 7 tn/ha y superó al testigo comercial Thaibonnet en calidad industrial, tolerancia al frío y adaptación a condiciones adversas en la siembra.

- b. Casi siempre el porcentaje de esterilidad es muy alto en cruzamientos amplios como en cruzamientos entre cultivares índica y japónica o entre cultivares de riego y seco; con el CA ha sido posible obviar en parte este problema (Cuadro 10). En este caso, mediante el CA fué posible recuperar un número adecuado de líneas fértiles, lo cual no se logró en el método pedigrí debido a la alta esterilidad de las generaciones F_1 y F_2 .
- c. El Cultivo de Anteras ha demostrado ser una técnica muy útil para acelerar y facilitar la introgresión de características deseables de un acervo genético a otro, (Cuadro 11). La línea CT9586-14-CA-7 presenta el tipo de planta riego y calidad de grano característicos de Oryzica 1 combinado con el tipo de raíces gruesas y profundas propias de los cultivares de seco.
- d. El CA también se utiliza para producir DHs los cuales facilitan el mapeo de genes que controlan características de importancia como resistencia al virus de

la Hoja Blanca (RHBV) y a la Piricularia. Utilizando marcadores moleculares (RFLP) y DH derivados del cruzamiento Fanny x Ceysvoni fué posible identificar y localizar en el cromosoma 12 de Fanny un gen de resistencia a RHBV. Mediante la técnica de RAPDs y DHs obtenidos del cruce IRAT13 x Fanny, fué posible localizar en el cromosoma 4 de IRAT13 un gene de resistencia al linaje SRL-1 de piricularia.

5. RESUMEN

Se pueden producir líneas homocigotas estables en arroz a partir de plantas heterocigotas por medio del doblamiento cromosomático del polen (haploide) y regeneración de plantas a través de un ciclo de cultivo de anteras. Sin embargo, la implementación de esta técnica como una herramienta rutinaria en programas de mejoramiento ha sido lenta, en especial porque la respuesta depende del genotipo utilizado. El arroz tipo japónica responde mucho mejor que las índicas; la gran mayoría de las variedades comerciales sembradas en América Latina son índicas. La metodología desarrollada en CIAT permite el procesamiento masivo de 8.000-10.000 anteras/persona/día, lo cual permite generar de 30 a 200 plantas, dependiendo del genotipo.

Se realizaron varios estudios para determinar si existen efectos negativos asociados con el cultivo de anteras. Los resultados obtenidos indican que:

1) Pases consecutivos de un material a través de cultivo de anteras no tiene efecto

deletereo o negativo en las líneas obtenidas.

2) Cualquier segregación residual o heterogeneidad que exista escondida en el material procesado por CA queda expuesta en forma clara y dará lugar a líneas homocigotas uniformes.

3) En comparación con el método del pedigrí no hay reducción en la variabilidad genética en cuanto a rendimiento y otras características agronómicas. Por el contrario, en el caso de piricularia a través del cultivo de anteras se facilita la selección de líneas resistentes a piricularia.

Las plantas homocigotas producidas por CA se utilizan de varias maneras:

1) Desarrollar líneas con características específicas para determinados ecosistemas.

Por ejemplo, Chile requiere variedades tolerantes a bajas temperaturas, precoces y de buena calidad molinera y culinaria. Se han enviado y evaluado más de 2000 líneas DH en Chile; varias de ellas se muestran muy promisorias en fincas de agricultores.

2) Desarrollar líneas que presentan el tipo de planta y calidad de grano de riego con raíces tipo secoño, a partir de cruzamientos entre variedades de riego y secoño.

3) A través del CA ha sido posible obviar, en parte, el problema de la esterilidad que se presenta en ciertos cruzamientos. Por ejemplo, se han obtenido DH fértiles a partir de cruzamientos con alto grado de esterilidad entre cultivares de riego y secoño.

4) Incrementar la recombinación entre materiales genéticamente distantes, por ejemplo entre índicas y japónicas.

5) Obtener líneas para estudios de mapeo de genes a través de RFLP y PCR.

6) Inducir o recuperar variación somaclonal.



Plantas de arroz en el momento de la selección de las panículas.



Distancia entre las aurículas de las dos últimas hojas.



Corte del tercio medio de la panícula.



Corte de las flores por su base.



Siembra de anteras en el medio de cultivo para la inducción del microcallo.



Las anteras después de incubadas en la oscuridad a una temperatura de 25-27°C producen microcallos.

Figura 1. Procedimiento general para el cultivo de anteras en arroz.



Observación más detallada de la producción de los microcallos.



Plantas en el medio de regeneración incubadas a 24-26°C con lámparas fluorescentes.



Plantas a los 30-45 días listas para ser llevadas al invernadero.



Plantas regeneradas en bandejas con suelo fangueado.



Plantas R1, transplantadas en el campo.



Líneas homocigotas R2 en el campo.

Figura 1. Continuación

Cuadro 1. Composición de los medios N₆, N₆m, NL y MS usados en CIAT.

| Compuesto (mg/l) | N ₆ | N ₆ m | NL | MS |
|---|----------------|------------------|-------|-------|
| NH ₄ NO ₃ | | | | 1650 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 463 | 231.5 | 231.5 | |
| KNO ₃ | 2830 | 2830 | 3134 | 1900 |
| KH ₂ PO ₄ | 400 | 540 | 540 | 170 |
| MgSO ₄ ·7H ₂ O | 185 | 3.7 | 185 | 370 |
| CaCl ₂ ·2H ₂ O | 166 | 166 | 150 | 440 |
| H ₃ BO ₃ | 1.6 | 1.6 | 6 | 6.2 |
| MnSO ₄ ·4H ₂ O | 4.4 | 4.4 | 22.3 | 22.3 |
| ZnSO ₄ ·7H ₂ O | 1.5 | 1.5 | 10 | 8.6 |
| Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O | | | 0.25 | 0.25 |
| CoCl ₂ ·6H ₂ O | | | 0.025 | 0.025 |
| CuSO ₄ ·5H ₂ O | | | 0.025 | 0.025 |
| KI | 0.83 | 0.83 | 1 | 0.83 |
| Na ₂ EDTA | 37.3 | 37.3 | 37.3 | 37.3 |
| FeSO ₄ ·7H ₂ O | 27.8 | 27.8 | 27.8 | 27.8 |
| M-inositol | | | | 100 |
| Tiamina-HCl | 1 | 1 | 2.5 | 0.1 |
| Acido nicotínico | 0.5 | 0.5 | 2.5 | 0.5 |
| Piridoxina-HCl | 0.5 | 0.5 | 2.5 | 0.5 |
| Glicina | 2 | 2 | 2.5 | 2 |
| 2,4-D | | 2 | 2 | |
| Picloramo | | 0.07 | 0.07 | |
| ANA | | | | 1 |
| Kinetina | | 0.5 | 0.5 | 4 |
| AgNO ₃ | | | 10 | |
| Sucrosa (g/l) | 50 | 50 | | 30 |
| Maltosa (g/l) | | | 50 | |
| Phytigel | | | | 1.8 |

Cuadro 2. Rendimiento (kg/ha) de doble haploides obtenidos de 8 cultivares de arroz^{1/}

| Cultivar | No. DHs evaluados | Rendimiento (kg/ha) DHs | | Rendimiento cultivares |
|----------------|-------------------|-------------------------|----------|------------------------|
| | | Rendimiento mayor | Promedio | |
| Colombia 1 | 6 | 5825 | 5240 | 5429 |
| IAC 165 | 5 | 6118 | 5710 | 5877 |
| TOX 1011-4-1 | 4 | 6068 | 5312 | 4714 |
| TOX 1871-38 | 12 | 4583 | 3918** | 3166 |
| TOX 1785-19-18 | 10 | 6897 | 6173 | 6272 |
| TOX 1010-49 | 30 | 6492 | 5894 | 5331 |
| CICA 8 | 13 | 8058 | 7186 | 7527 |
| Oryzica 1 | 5 | 7772 | 7456 | 8151 |

LSD = 963.3 (para comparaciones entre cualquier cultivar y su correspondiente DH)

** = Diferente al 5% del promedio del cultivar

MSE = 601.92

^{1/} Fuente: CIAT, 1991. 1986-1989 Report Rice Program

Cuadro 3. Rendimiento (kg/ha) de doble haploides obtenidos a partir de otros doble haploides (R2).^{1/}

| Cruce (No.) | Líneas R2 (No.) | Doble Haploides Obtenidos (No.) | Rendimiento (kg/ha) | |
|----------------|-----------------------|------------------------------------|---------------------|-----------------|
| | | | Líneas R2 | Doble haploides |
| CT 6741 | 3 | 7 | 5341 | 5298 |
| CT 6742 | 1 | 5 | 4757 | 4780 |
| CT 6744 | 2 | 3 | 4778 | 4769 |
| CT 6745 | 1 | 1 | 3892 | 3838 |
| CT 6746 | 7 | 16 | 4976 | 4949 |
| CT 6747 | 2 | 23 | 5391 | 5287 |
| CT 6749 | 3 | 4 | 4940 | 4839 |
| Total | 19 | 59 | 4955 | 5071 |

1/ Fuente: CIAT, 1991. 1986-1989 Report. Rice Program

MSE = 437.6; LSD 0.05 = 700.3 Kg/Ha

Cuadro 4. ANOVA para la comparación entre doble haploides y las líneas F³ y F⁴.^{1/}

| Fuente | D.F | F. Valor | Probabilidad |
|--|-----|----------|--------------|
| Reps | 2 | 2.05 | .1310 |
| Lineas | 93 | 2.97 | .0001** |
| Padres vs. cruces | 1 | 37.95 | .0001** |
| Entre padres | 3 | 4.73 | .0033** |
| Entre líneas | 89 | 2.51 | .0001** |
| Entre Cruces | 6 | 11.42 | .0001** |
| Entre generaciones (F ₃ , F ₄ , DH) | 2 | 2.39 | .0949NS |
| Cruces x Generacion | 12 | 1.49 | .1311NS |
| Entre líneas hermanas | 69 | 1.92 | .0003** |
| Error* | 186 | | |

^{1/} Fuente: CIAT 1991. 1986-1989 Report. Rice Program.

*MSE = 620.19; NS = No significativo

** = Altamente significativo al nivel del 0,01%

Cuadro 5. Comparación del rendimiento (kg/ha) de doble haploides y líneas F₃ y F₄. ^{1/}

| Generación | No.líneas | Rendimiento (kg/ha) | |
|----------------|-----------|---------------------|------------------------|
| | | Rango | Promedio ^{2/} |
| F ₃ | 11 | 6476-5214 | 5815 |
| F ₄ | 37 | 6966-4660 | 5866 |
| DH | 42 | 7068-3634 | 5692 |

^{1/} Fuente: CIAT 1991. 1986-1989 Rice Program Report

^{2/}MSE = 620.2; C.V. = 10.8%

Cuadro 6. Rendimiento promedio (kg/ha) de doble haploides y líneas F₄ provenientes de la misma línea F₃. ^{1/}

| DH | Rendimiento ^{2/} | F ₄ Lineas | Rend. ^{2/} |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|---------------------|
| CT 6741-1-1-CA-3 | 5965 a | CT 6741-1-1-2 | 5883 a |
| CT 6741-1-1-CA-7 | 5708 a | CT 6741-1-1-3 | 5835 a |
| CT 6741-1-1-CA-2 | 5180 ab | CT 6741-1-1-6 | 5613 a |
| CT 6741-1-1-CA-4 | 5096 ab | CT 6741-1-1-4 | 5459 a |
| CT 6741-1-1-CA-8 | 5069 ab | CT 6741-1-1-1 | 5245 a |
| CT 6741-1-1-CA-5 | 4931 ab | CT 6741-1-1-5 | 4660 a |
| CT 6741-1-1-CA-6 | 4699 ab | LSD = 1458 | |
| CT 6741-1-1-CA-1 | 3635 b | | |
| LSD = 1552 | | | |
| CT 6742-12-1-CA-5 | 6233 a | CT 6742-12-1-1 | 6565 a |
| CT 6742-12-1-CA-4 | 6172 a | CT 6742-12-1-5 | 6449 ab |
| CT 6742-12-1-CA-6 | 5883 a | CT 6742-12-1-2 | 5942 ab |
| CT 6742-12-1-CA-2 | 5549 a | CT 6742-12-1-3 | 5631 ab |
| CT 6742-12-1-CA-3 | 5346 a | CT 6742-12-1-4 | 5151 b |
| CT 6742-12-1-CA-1 | 5335 a | | |
| CT 6742-12-1-CA-7 | 4990 a | LSD = 1395 | |
| LSD = 1509 | | | |

^{1/} Fuente: CIAT 1991. 1986-1989 Rice Program Report.

^{2/} Promedios con la misma letra no difieren al nivel del 5%.

Cuadro 7. Eficiencia en la regeneración y producción de doble haploides con base en 10 cruces triples hechos para Chile. ^{1/}

| Cruce | Padres | Anteras sembradas (No.) | Callos producidos (No.) | Inducción (%) | Producción plantas verdes | | Doble Haploides (No.) | Eficiencia en regeneración Doble haploides | |
|--------|---------------------------|-------------------------|-------------------------|---------------|---------------------------|-------------|-----------------------|--|-------------|
| | | | | | Callos (%) | Anteras (%) | | Callos (%) | Anteras (%) |
| CT6741 | Diamante/Lemont//Q 65101 | 11000 | 4436 | 40.3 | 7.0 | 2.8 | 211 | 4.8 | 1.9 |
| CT6742 | Q 64117/Lemont//Q 65101 | 2900 | 1944 | 67.0 | 5.5 | 3.7 | 69 | 3.5 | 2.4 |
| CT6743 | Q 65101/Lemont//Q 65101 | 3000 | 491 | 16.3 | 10.7 | 1.7 | 28 | 5.7 | 0.9 |
| CT6744 | Q 66304/Lemont//Q 65101 | 3700 | 2001 | 54.1 | 4.7 | 2.6 | 79 | 3.9 | 2.1 |
| CT6745 | Q 67103/Lemont//Q 65101 | 1700 | 464 | 27.3 | 9.2 | 2.5 | 22 | 4.7 | 1.3 |
| CT6746 | Diamante/Lemont//Diamante | 3100 | 1641 | 52.9 | 14.9 | 7.9 | 169 | 10.3 | 5.5 |
| CT6747 | Q 64117/Lemont//Diamante | 2900 | 753 | 26.0 | 8.9 | 2.3 | 50 | 6.6 | 1.7 |
| CT6748 | Q 65101/Lemont//Diamante | 2500 | 1109 | 44.3 | 16.1 | 7.2 | 145 | 13.1 | 5.8 |
| CT6749 | Q 66304/Lemont//Diamante | 7100 | 1046 | 14.7 | 11.7 | 1.7 | 116 | 11.1 | 1.6 |
| CT6750 | Q 67103/Lemont//Diamante | 1200 | 496 | 41.3 | 11.3 | 4.7 | 52 | 10.5 | 4.3 |
| Total | | 39100 | 14381 | 36.8 | 8.9 | 3.3 | 941 | 6.5 | 2.4 |

^{1/} Fuente: Pulver, 1986

Cuadro 8. Evaluación de la tolerancia al frío en la fase reproductiva, Estación Experimental Quilamapu. Chillán. Chile 1988. ^{1/}

| Pedigrí | Esterilidad (%) ^{2/} | Peso 100 granos (g) | Altura (cm) |
|----------------------|----------------------------------|---------------------------|----------------|
| Bluebelle (testigo) | 90.7 a | 1.75 | 84 |
| Lemont (testigo) | 74.9 a | 1.92 | 58 |
| Perla (testigo) | 32.6 b | 3.12 | 101 |
| CT6749-36-3-4-M-1-M | 30.8 b | 2.65 | 76 |
| CT6742-10-CA-8 | 30.6 b | 2.95 | 83 |
| CT6743 F2-CA-4 | 30.0 b | 2.58 | 78 |
| CT6749-36-3-4-M-2-M | 24.5 b | 2.58 | 78 |
| CT6743-44-8-CA-4 | 25.3 b | 2.19 | 88 |
| CT6741-9-CA-26 | 23.9 b | 2.38 | 74 |
| Diamante (testigo) | 21.6 b | 3.14 | 98 |
| CT6743-F2-CA-7 | 21.0 b | 2.50 | 68 |
| CT6742-10-10-4-6-5-M | 19.5 b | 2.82 | 84 |
| CT6743-F2-CA-9 | 19.2 b | 2.32 | 68 |
| CT6747-F2-CA-16 | 18.9 b | 3.41 | 79 |
| CT6747-F2-CA-10 | 18.2 b | 2.80 | 82 |
| Quella (testigo) | 17.3 b | 2.62 | 104 |
| Oro (testigo) | 17.1 b | 3.01 | 100 |

^{1/} Fuente: Programa Arroz. INIA. Chile

^{2/} Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 9. Potencial de rendimiento de doble haploides en fincas de agricultores en tres sitios en Chile, 1988. ^{1/}

| Pedigrí | Sitios | | | |
|------------------|--------|--------|-------|------------------------|
| | Niquen | Parral | Talca | Promedio ^{2/} |
| CT6743-47-6-CA-4 | 9995 | 9753 | 8104 | 9432 a |
| Perla | 9051 | 9932 | 7914 | 9097 ab |
| Diamante | 8762 | 9369 | 7179 | 8594 abc |
| Oro | 8787 | 9182 | 6459 | 8353 bcd |
| CT6743-F2-CA-20 | 8429 | 7865 | 8373 | 8203 bcd |
| Quella | 8719 | 8218 | 5364 | 7692 cd |
| CT6746-5-CA-6 | 7989 | 7614 | 6210 | 7404 de |
| CT6743-44-8-CA-1 | 7100 | 6968 | 7726 | 7207 de |
| CT6742-12-1-CA-2 | 6742 | 7220 | 4270 | 6303 d f |
| CT6742-12-1-CA-3 | 6550 | 6451 | 4851 | 6088 f |

^{1/} Fuente: Programa Arroz INIA. Chile.

^{2/} Promedios con la misma letra no son significativamente diferentes.

Cuadro 10. Selección de líneas fértiles a partir de cruzamientos muy estériles.

| Cruce No. | Padres | Métodos | |
|-----------|---|---------|--------------------|
| | | Pedigrí | Cultivo de Anteras |
| CT9985 | CT6241-2-2-1-3//CT7079-6-4/CT6945-4-2-2 | 0 | 42 |
| CT10015 | CT6241-2-2-1-3//CT6515-18-1-3/CT8088-14-16 | 0 | 78 |
| CT10053 | P5589-1-1-3P//CT6516-23-10-1/CT8088-14-16 | 4 | 136 |
| CT10058 | P5589-1-1-3P//CT6241-17-1-5/TOX 1859-102-6M | 0 | 63 |

Cuadro 11. Características agronómicas de doble haploides seleccionados de un cruzamiento entre Oryzica 1 (riego) y CT6241-17-1-5-1 (secano).

| Genotipo | Maduración (días) | Altura (cm) | Amilosa (%) | Rendimiento kg/ha | Tipo de plantas/raíces |
|---------------------------|------------------------------|------------------------|------------------------|------------------------------|--------------------------------|
| Padres | | | | | |
| Oryzica 1 | 130 | 85 | 30 | 7612 | Irrigado, raíces superficiales |
| CT6241-17-1-5-1 | 115 | 80 | 21 | 7712 | Secano, raíces profundas |
| F2-doble haploides | | | | | |
| CT9586-283-CA1 | 115 | 80 | 22 | 6960 | Irrigado, raíces gruesas |
| CT9586-14-CA7 | 130 | 90 | 31 | 7630 | Irrigado, raíces profundas |
| CT9586-428-CA3 | 135 | 75 | 30 | 2323 | Irrigado, raíces superficiales |

BIBLIOGRAFIA

1. Chen, C.C., and C.M. Lin. 1981. Genotypic differences in plant production in anther culture of rice. p. 199-203. *In*: W.C.Chang (ed.). Proc. Symp. Plant Cell Tissue Culture. Acad. Sin. Taipei.
2. CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical). 1991. 1986-1989 Report. Rice Progam. Cali, Colombia. 404p.
3. Collins, G.B., P.D. Legg, and M.J. Kasperbauer. 1974. Use of anther derived haploids in Nicotiana. I. Isolations of breeding lines differing in total alkaloid content. *Crop Sci.* 6:36-40.
4. Feaster, C.V., and E.I. Turcotte. 1973. Yield stability in doubled haploids of American Pima cotton. *Crop Sci.* 13:232-233.
5. Lentini, Z., P. Reyes, C.P. Martínez, and W. Roca. 1995. Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science* (In press).
6. Liang, S., and S. Huang. 1991. Huayu 15, a high-yielding rice variety bred by anther culture. p. 230-247. *In*: Y.P.S. Bajaj (ed.). *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Vol. 14. Springer Verlag. New York.
7. Meredith, W.R. Jr., R.P. Bridge, and J.F. Chism. 1970. Relative performance of F1 and F2 hybrids from doubled haploids and their parent varieties in upland cotton, *Gossypium hirsutum* L. *Crop Sci.* 10:295-298.
8. Morden, L.P., B.G. Rosnagel, and K.N. Kao. 1989. Performance of anther-cultured derived breeding lines of barley versus lines developed by pedigree, single seed descend and the *Hordeum bulbosum* techniques-field comparisons. *Can. J. Plant Sci.* 69:546.
9. Niizeki, H. and K. Oono. 1968. Induction of haploid rice plant from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.* 44:554-557.
10. Núñez, V.M., W.M. Roca, and C.P. Martínez. 1989. El uso de anteras en el mejoramiento del arroz. CIAT, Cali. Serie 04SR=07-02.

11. Pulver, E. 1986. Use of anther culture in rice breeding. Proc. Ann. Meeting Rockefeller Foundation Program's Genetic Engineering of Rice. IRRI. Manila, Philippines. Oct. 14-16, 1986. 46p.
12. Raina, S.K. 1989. Tissue culture in rice improvement: status and potential. Adv. Agron. 42:339-398.
13. Reinbergs, E., L.S. P.Song, T.M. Choo, and K.J. Kasha. 1978. Yield stability of doubled haploid lines of barley. Can J. Plant Sci. 58:929-933.

tipo de grano y vigor, pero algunos doble haploides fueron más altos que sus respectivos padres. Estos datos sugieren que dos pases consecutivos a través del CA no tienen efectos deletéreos o negativos en las progenies obtenidas.

c. Comparación de doble haploides y líneas pedigrí F_3 y F_4 .

El objetivo fué comparar el potencial de rendimiento de líneas de arroz provenientes de los mismos cruces y desarrolladas por el método pedigrí y CA. A partir de 11 líneas F_3 se obtuvieron 37 líneas F_4 y 42 doble haploides. Estos materiales correspondían a siete cruces diferentes y se compararon bajo condiciones de riego y transplante en un diseño de bloques al azar, con tres repeticiones. Parte del análisis estadístico se presenta en el Cuadro 4 y los datos de rendimiento en el Cuadro 5. Hubo diferencias significativas en la producción media en el caso de padres, líneas y cruces. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la producción media entre generaciones (DH, F_3 y F_4) y en la interacción cruces por generación; pero sí diferencias significativas entre líneas hermanas. El Cuadro 6 muestra diferencias significativas entre DHs obtenidos de la línea F_3 CT6741-1-1 y entre las líneas pedigrí F_4 derivadas de la línea F_3 CT6742-12-1; se presentaron también diferencias significativas entre DHs obtenidos de la línea F_3 CT6746-4-1 (datos no incluídos). Esto indica que la variabilidad genética para potencial de rendimiento se mantuvo tanto en el caso de CA como en el método pedigrí. Basados en el desempeño agronómico, y en rendimiento se puede concluir que tanto a través del CA como del

tipo de grano y vigor, pero algunos doble haploides fueron más altos que sus respectivos padres. Estos datos sugieren que dos pases consecutivos a través del CA no tienen efectos deletéreos o negativos en las progenies obtenidas.

c. Comparación de doble haploides y líneas pedigrí F_3 y F_4 .

El objetivo fué comparar el potencial de rendimiento de líneas de arroz provenientes de los mismos cruces y desarrolladas por el método pedigrí y CA. A partir de 11 líneas F_3 se obtuvieron 37 líneas F_4 y 42 doble haploides. Estos materiales correspondían a siete cruces diferentes y se compararon bajo condiciones de riego y transplante en un diseño de bloques al azar, con tres repeticiones. Parte del análisis estadístico se presenta en el Cuadro 4 y los datos de rendimiento en el Cuadro 5. Hubo diferencias significativas en la producción media en el caso de padres, líneas y cruces. Sin embargo, no hubo diferencias significativas en la producción media entre generaciones (DH, F_3 y F_4) y en la interacción cruces por generación; pero sí diferencias significativas entre líneas hermanas. El Cuadro 6 muestra diferencias significativas entre DHs obtenidos de la línea F_3 CT6741-1-1 y entre las líneas pedigrí F_4 derivadas de la línea F_3 CT6742-12-1; se presentaron también diferencias significativas entre DHs obtenidos de la línea F_3 CT6746-4-1 (datos no incluídos). Esto indica que la variabilidad genética para potencial de rendimiento se mantuvo tanto en el caso de CA como en el método pedigrí. Basados en el desempeño agronómico, y en rendimiento se puede concluir que tanto a través del CA como del