

Cultivo in vitro de anteras en arroz (*Oryza sativa* L.): una revisión general

In vitro anther culture in rice (*Oryza sativa* L.): an overview

Gerardo Mállap-Detquizán¹ , Jegnes Benjamín Meléndez-Mori¹ , Eyner Huaman-Huaman¹  y Manuel Oliva¹ 

RESUMEN

El arroz es el segundo cereal más importante en el mundo. El continuo crecimiento poblacional ha generado una mayor demanda de los productos consumibles de primera necesidad, siendo un reto para los científicos e investigadores mejorar los cultivos. En ese contexto, el objetivo de esta revisión fue resumir y exponer la evidencia de estudios sobre el cultivo de anteras de arroz donde se incluye detalladamente las distintas etapas de desarrollo y crecimiento a nivel in vitro y obtención de plantas verdes. Para ello, se realizó la búsqueda de artículos científicos en base de datos Scopus, ScienceDirect, SpringerLink, SciELO y Web of Science, utilizando palabras clave como “anther culture”, “rice hybrids”, “doubled haploids”, “haploids”, “embryogenesis”, entre otros. Los resultados de esta revisión muestran que los estudios sobre cultivo in vitro de anteras generalmente se publica en inglés, siendo India y China los principales países que desarrollan estudios sobre el tema. En general, se puede decir que, el uso de herramientas biotecnológicas a través del cultivo in vitro de anteras ha permitido obtener variedades con mejores características agronómicas.

Palabras clave: Haploides, inducción, medio de cultivo, microsporas, regeneración.

ABSTRACT

Rice is the second most important cereal in the world. The continuous population growth has generated an increased demand for the consumable staple, being a challenge for scientists and researchers to improve crops. In this context, the objective of this review was to summarize and expose the evidence of studies on the cultivation of rice anthers where the different stages of development and growth at the in vitro level and obtaining green plants are included in detail. For this purpose, scientific articles were searched in Scopus, ScienceDirect, SpringerLink, SciELO and Web of Science databases, using keywords such as "anther culture", "rice hybrids", "doubled haploids", "haploids", "embryogenesis", among others. The results of this review show that studies on in vitro anther culture are generally published in English, with India and China being the main countries developing studies on the subject. In general, it can be said that the use of biotechnological tools through in vitro anther culture has made it possible to obtain varieties with better agronomic characteristics.

Keywords: Haploids, induction, culture medium, microspores, regeneration.

DOI: <https://doi.org/10.37787/pakamuros-unj.v10i2.285>

Recibido: 09/12/2021. Aceptado: 21/04/2022

* Autor para correspondencia

¹Instituto de Investigación para el Desarrollo Sustentable de Ceja de Selva (INDES-CES), Universidad Nacional Toribio Rodríguez de Mendoza (UNTRM), Chachapoyas 01001, Perú. Email: gerardo.mallap@gmail.com ; jbenjamin@indes-ces.edu.pe ; eyner.huaman@untrm.edu.pe ; oliva@indes-ces.edu.pe

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es el segundo cereal más consumido en el mundo, por lo cual es un reto alcanzar mayor producción para resolver el problema de la alimentación de una población en constante crecimiento (Ignacimuthu & Arockiasamy, 2006). Por ello, el desarrollo nuevos estudios encaminados al mejoramiento y sostenibilidad del cultivo son de importancia.

El uso de la biotecnología, como el cultivo in vitro de anteras (IAC), ha permitido desarrollar nuevas variedades mejoradas de arroz (Mayakaduwa & Silva, 2021). El IAC es utilizado hace varias décadas, siendo Niizeki & Oono (1968) quienes por primera vez emplearon esta técnica para mejorar el cultivo de arroz mediante la inducción de la regeneración de plantas completas. A través de IAC, en un año es posible obtener plantas haploides y doble haploides (DH) (Forster et al., 2007; Herath & Bandara, 2011; Suvorova, 2016), mientras que con métodos convencionales se debe esperar más de cinco generaciones para obtener nuevas líneas mejoradas (Naik et al., 2017). Por lo tanto, es una técnica que ha permitido acortar el ciclo de reproducción y aumentar la diversidad genética (Dwivedi et al., 2015). Hoy en día, el IAC es utilizado para la mejora de cereales y diferentes cultivos, siendo uno de los métodos más empleados para el mejoramiento genético y la producción de líneas homocigotas y puras (Germanà, 2011a; Mayakaduwa & Silva, 2021).

Sin embargo, en el proceso del IAC se presentan una serie de complicaciones, como la necrosis prematura de la antera, deficiente inducción de callos y bajo porcentaje de regeneración de embriones y plantas (Gioi & Tuan, 2002). Estas limitaciones se deben a factores tanto endógenos como exógenos que inhiben la respuesta embriogénica de las anteras (Germanà, 2011a; Wang et al., 2000), a ejemplo, el pretratamiento de los botones florales y el genotipo (Zuraida et al., 2011), composición del medio de cultivo, fuente de carbono, fitohormonas, estado de microesporas/anteras, periodo de inoculación, ambiente del cultivo, entre otros (Germanà, 2011a). Existen estudios orientados al mejoramiento del cultivo del arroz utilizando el IAC, y en los cuales han logrado obtener líneas puras con mejores características que los progenitores.

En ese contexto, el objetivo de esta revisión es resumir y exponer la evidencia de estudios sobre el cultivo de anteras de arroz donde se incluye detalladamente las distintas etapas (pretratamiento, inducción, regeneración, enraizamiento, obtención de plantas verdes, así como los mejores resultados alcanzados).

MATERIALES Y MÉTODOS

Se procedió a revisión de artículos científicos en el área biotecnología y mejoramiento genético, utilizando bases de datos como Scopus, ScienceDirect, SpringerLink, SciELO y Web of Science. La búsqueda se realizó utilizando palabras claves como “anther culture”, “cold-pretreatment”, “rice hybrids”, “doubled haploids”, “haploids”, “embryogenesis”, “microspores”, “plant regeneration”.

Para recopilar la información se analizaron investigaciones realizadas en países como Austria, España, India, Pakistán, China, México, Cuba y EE.UU, y se seleccionaron artículos publicados entre el 2000 y 2021 (con algunas excepciones) que incluían estudios sobre la inducción, regeneración y obtención de plantas haploides y DH. Por otro lado, la literatura que no contaba con experimentos específicos, validaciones e indexación en revistas científicas, no se incluyeron. La búsqueda de documentos incluyó el idioma inglés y español.

RESULTADOS

La mayoría de estudios referentes al IAC se publicaron en inglés (87.5%) y los dos países que presentan mayor número de investigaciones son India y China, que en conjunto representan más del 45.8% de todas las publicaciones divulgadas desde 2000 hasta el 2021.

En la Tabla 1 se observa que el tratamiento en frío de los botones florales varía entre 4 °C a 10 °C, con periodos que van desde 01 hasta 21 días. El principal medio de cultivo utilizado es N6, seguido de MS. Los medios de cultivo generalmente son suplementados con distintos reguladores de crecimiento y en distintas dosis, siendo el 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) la hormona de mayor uso durante el cultivo de anteras de arroz.

Las condiciones de cultivo varían entre 23 ± 2 y 28 ± 2 °C, con fotoperiodo de 16 h luz en la etapa de regeneración y, oscuridad total en la etapa de inducción. En la Tabla 1 se observa que los resultados presentan variaciones importantes, los cuales pueden estar influenciadas por la composición del medio de cultivo y el genotipo introducido.

Tabla 1. Micropropagación de *Oryza sativa* a partir del cultivo de anteras

Especie/cultivar	Tratamiento en frío (°C/días)	Medio de mejor rendimiento (mg/L)	Condiciones de cultivo	Mejor resultado	Referencia
<i>O. sativa</i> L. "Cultivar Japonica Taipei-309".	8 °C durante 8 días	Inducción I: N6 + 2,4-D 2	25 ± 2 °C en oscuridad por 7 semanas	MR; 20,01% IC	(Afza <i>et al.</i> , 2000)
		Regeneración II: MS + BA 1 + NAA 0.5	12 h luz - 66 mmol m ⁻² s ⁻¹ 3 semanas	MR; 18% Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. "LP-10, Amistad 82 y Híbrido A82/C4 153".	--	Inducción I: N6-1	Oscuridad 30 - 60 días	MR; 5,37 - 1,27 - 1, 94% IC	(Cristo y Gonzáles, 2000)
		Regeneración II: MS + ANA 1 + Kin 4 + AIA 2	--	MR; 0,42 - 0,19 - 0,12% Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. "Arroz basmati indica".	10 °C durante 10 días	Inducción I: RZM + 2,4-D 0.5 + NAA 2 + Kin 0.5	26 ± 2 °C en oscuridad por 6 semanas	MR; 2,6 - 78%, 31 - 78% IC	(Bishnoi <i>et al.</i> , 2000)
		Regeneración II: MS modificado + Kin 1 + BAP 1 + NAA 0.5	26 ± 2 °C en oscuridad 2 semanas - Luz 50 µE m ⁻² s ⁻¹ 12h PP luz 2 semanas	MR; 0 - 51% Regeneración P.	
		Enraizamiento III: MS (1/2) + NAA 0.25 + Triazol 2.5	--	--	
<i>O. sativa</i> L. "Cultivar. Taipei-309".	8 °C durante 8 - 10 días	Inducción I: N6 + 2,4-D 2 + ABA 5-10	25 ± 2 °C en oscuridad por 5 - 8 días	MR; 28,3 - 32,8% IC	(Guzmán y Zapata Arias, 2000)
		Inducción II: N6	25 ± 2 °C en oscuridad por 2 - 3 semanas		
		Regeneración III: MS + ABA 10 + BAP 2 + NAA 1 + Kin 2 (MS4) agarosa 0.455	25 ± 2 °C luz diurna, 12 h - luz de 66 µE m ⁻² s ⁻¹ ; 2 -3 semanas	MR; 24,2 al 42% (sin retoques) y del 30 al 70% (con retoques). Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. "Plantas F1, Cruce IR64, /IR68530, IR64/, IR69146-25, IR64/ IR69146-15 e IR64/, /IR70441/	8 °C durante 8 días	Inducción I: N6 + 2,4-D 0,5 + NAA 2	25 °C en oscuridad	MR; 3,53% en promedio como Max de 4,48% en el cruce IR64 / IR68530.	(Gioi y Tuan, 2002)
		Regeneración II: N6 + NAA 0.5 + BAP 2	25 °C y 16/24 h de brillo al día.	MR; 1,12% Regeneración P.	
		Enraizamiento III: MS	25 °C y 16/24 h de brillo al día.	--	

<i>O. sativa</i> L. Cultivares "japónica, índica y híbridos F1"	4 °C durante 8, 14 y 21 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 11,31 µM + IAA 5.71 µM+ sacarosa 30 g/l	25 ± 2 °C en oscuridad 7-12 meses	MR; 5,33% - 10,00% IC	(Trejo-Tapia <i>et al.</i> , 2002a)
		Inducción II: N6 + ANA 10.74 µM + maltosa 30 g/l		MR; 13,33% IC	
		Regeneración II: MS + Kin 9.29 µM + IAA 5.51 µM	25 ± 2 °C en oscuridad 8 días, 16 h luz fluorescente 40 µmol m ⁻² s ⁻¹	--	
<i>O. sativa</i> L. "Cultivar Japónica H2005"	4 °C durante 7 días	Inducción I: MS + 2,4-D 1.5 + Kin 1	25 ± 2 °C en oscuridad por 7 semanas 25 ± 2 °C, y 16 h de luz e intensidad luminosa de 3000, durante 15 días luxes. Al	MR; 13.88 ± 0.85 IC	(Trejo-Tapia <i>et al.</i> , 2002b)
		Regeneración II: MS + 2,4-D 0.2 + Kin 0.5		MR; 44.4 ± 5.3 Regeneración P. y presencia de raíz con 33.3 ± 5.2 %	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "V: BR-5, BR-31, BR 34, BR-37 y BR- 38".	6-10 °C durante 1 - 6 días	Inducción I: Z2 + NAA 2.5 + kin 0.5 + 2,4-D 0.5	25 ± 1 °C en oscuridad	MR; 53,23% F.C y 93,39 embriones en la variedad BR-38	(Asaduzzaman <i>et al.</i> , 2003)
		Regeneración II: MS + BAP 2 + Kin 0.5 + NAA 1		25 ± 1 °C en luz durante 15 - 30 días	
<i>O. sativa</i> L.	6 °C durante 7 días	Inducción I: Z2 modificado + 2, 4-D 0.5 + NAA 2.5 + Kin 0.5	26 ± 1 °C en oscuridad, durante 4 a 6 semanas	MR; 8,06% IC	(Shahnewas, <i>et al.</i> , 2004)
		Regeneración II: MS modificado Kin 0.5 + BAP 2 + NAA 1		12 h, con luz fluorescente.	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "índica"	8 °C durante 8 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 0.5 - 0.1 + NAA 2 + IBA	25 ± 2 °C en oscuridad	MR; 3,38% - 5,08% IC	(Roy, 2005)
		Regeneración II: MS + BAP 1 + Kin 1 + NAA 0.5		16/8 h de luz (~ 130 µE m ⁻² s ⁻¹) / oscuridad a 25 ± 2 °C.	
<i>O. sativa</i> L. Variedad "domsiah , entre otras"	6 °C durante 1-6 días	Inducción I: N6 modificado (medio Fj) + NAA 3 + Kin 0.5 + 2, 4-D 0.5	25 ± 1 °C en la oscuridad	MR; 34.16 ± 1.52% F.C y 82.01 ± 2.4% Embriones	(Talebi <i>et al.</i> , 2007)
		Regeneración I: MS modificado (medio Sk 11) + NAA 3 + Kin 0.5 + 2, 4D 0.5		25 ± 2 °C, y 16 h de luz	
<i>O. sativa</i> L.	--	Inducción I: N6 modificado (medio SK-3) + NAA 2 + L-prolina 200 + L- glutamina 250 + azúcar (maltosa 60 g.L)	25 ± 2 °C, en la oscuridad durante 3 a 6 semanas	MR; 90,50% IC	(Khatun <i>et al.</i> , 2010)
		Regeneración I: MS modificado + NAA 3 + Kn 0.5 + NAA 1		16/8 luz / oscuridad	

<i>O. sativa</i> L. Cultivares "índica, japónica y híbridos interespecíficos"	8 °C durante 14 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 2 + Kin 0.5	28 ± 2 °C en oscuridad por 6 semanas	MR; 34,3; 69,8 y 78,3% IC	(Herath y Bandara, 2011)
		Regeneración II: MS + Kin 2 + NAA 0.5	16 h luz (50 µE m ⁻² s ⁻¹) por 6 semanas	MR; 29,3; 63,3 y 69,7% Regeneración P.	
		Enraizamiento III: MS (1/2)	16 h luz (50 µE m ⁻² s ⁻¹)	--	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "índica"	7 °C durante 7-10 días	Inducción I: SK3 + 2, 4-D 2 + NAA 1 + Kin 1 + prolina 100	26 ± 1 °C en oscuridad, por 40 días	MR; 11% IC	(Wang et al., 2011)
		Regeneración II: MS + BAP 0.5 + Kin 1 + IAA 0.25 + NAA 0.5	25 °C, 16 h/8 h día/noche	MR; 0 a 54,17%, 3 subcultivos max de 30,5 %	
		Enraizamiento III: MS (1/2) + NAA 0.5 + IAA 0.5	25 °C, 16 h/8 h día/noche	MR; 87% Enraizamiento	
<i>O. sativa</i> L.		Inducción I: NL + 2, 4-D 2 + Kin 0.5	25 ± 2 °C en oscuridad, durante 30 a 60 días	MR; 0 y 55.3 % como máx IC	(Pérez et al., 2012)
		Regeneración II: MS + NAA 1+ AIA 2 + Kin 4	26 ± 2 °C, 16 h luz, durante 30 a 40 días	MR; 22,6% Regeneración	
<i>O. sativa</i> L. Cultivar "japónica".	7 °C durante 7-12 días	Inducción I: N6 modificado + 2, 4-D 2 + Kin 1 + MES 500 + Caseína 1g + prolina 250	24 °C en oscuridad, durante 6 a 8 semanas, durante 53 días	MR; 37.5% IC	(Serrat et al., 2013)
		Regeneración II: N6 + NAA 1 + Kin 2 + MES 500 + Caseína 1g + prolina 250	25 °C y 50-70 µmol m ⁻² s ⁻¹ de luz fluorescente, fotoperiodo día / noche de 16/8 h, durante 30 días	MR; 85,71% Regeneración P	
<i>O. sativa</i> L.	5 °C durante 8 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 1 + NAA 2 + Kin 0.5	23 ± 2 °C en oscuridad, durante 7 a 8 semanas	MR; 0,66% y 6,66% IC	(Lal et al., 2014)
		Regeneración II: MS + BAP 0.5 + Kin 0.5 + CsH ₅ N ₅ 80	23 ± 2 °C, 16 h luz. A una intensidad 3000 Lux.	MR; 0,33% Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "índica - BS6444G"	10 °C durante 7 - 8 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 2 + BAP 0.5	25 ± 2 °C en oscuridad, durante 3 a 10 semanas	MR; 22.67% IC	(Naik et al., 2017)
		Regeneración II: MS + NAA 0.5 + Kin 0.5 + BAP 1.5	25 ± 2 °C, 16 h luz de 42 µmol m ⁻² s ⁻¹	MR; 68.20% Regeneración P.	
		Enraizamiento III: MS + NAA 2 + Kin 0.5	25 ± 2 °C, 16 h luz de 42 µmol m ⁻² s ⁻¹	MR; 100% Enraizamiento	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares	10 °C durante 9 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 2 + Kin 1 + Cochicina 300	24 °C en oscuridad, durante 2 días	MR; 4.10 - 7.66% IC	(Hooghvorst et al., 2018)

"japónica mediterráneo".		Inducción II: N6 + 2, 4-D 2 + Kin 1	24 °C en oscuridad, durante 8 semanas		
		Regeneración III: N6 + NAA 1 + 1 + Kin 2	25 °C, 16/8 h luz fluorescente de 50-70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	MR; 77% y el 75% Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "japónica".	5 °C durante 9 días	Inducción I: N6 modificado + 2, 4-D 2 + Kin 1 + MES 500	24 °C en oscuridad, durante 6 a 8 semanas	MR; 45,8 y 51,7 IC	(López-Cristoffanini <i>et al.</i> , 2018)
		Regeneración II: N6 + NAA 1 + Kin 2 + MES 500	25 °C y 50-70 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de luz fluorescente, fotoperiodo día / noche de 16/8 h	MR; 89.6 \pm 5.9% Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "índica MR219".	4 °C durante 7 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 1 + NAA 3	25 °C en oscuridad durante 6 a 8 meses	MR; 8,45% IC	(Rahman <i>et al.</i> , 2020)
		Inducción I: N6 + 2, 4-D 1 + BAP 1		MR; 80,83% IC	
		Regeneración II: MS + Kin 3 + NAA 0.5	25 \pm 2 °C, 16 h luz de 42 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	MR; 25.83 Regeneración P.	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "japónica, índica e híbridos de cruce índica y japónica"	8 °C durante 7 a 8 días	Inducción I: N6 modificado A1 + 2,4-D 1 + NAA 1 + Zet 0.10	25 \pm 2 °C en oscuridad	MR; 62% - 72.11% IC	(Ali <i>et al.</i> , 2021)
		Regeneración II: MS + BAP 1 + Kin 1 + NAA 1 + myo-inositol 100	25 °C, una humedad relativa del 60 al 85% y un fotoperiodo de 16 h en tubos fluorescentes blancos fríos	MR; 36%, 118% y 277%	
		Enraizamiento III: MS	--	--	
<i>O. sativa</i> L. Cultivares "japónica mediterráneo".	10 °C durante 9 días	Inducción I: N6 + 2, 4-D 1 + Kin 1 + Cochicina 3g + Caseína 1 + Prolina 250 + MES 0.5	24 °C en oscuridad, durante 24 h	--	(Hooghvorst <i>et al.</i> , 2021)
		Inducción II: N6 + 2, 4-D 1 + Kin 1 + Caseína 1 + Prolina 250 + MES 0.5	25 \pm 2 °C en oscuridad, durante 3 a 6 semanas	--	
		Regeneración III: N6 + NAA 1 + Kin 2 + Caseína 1 + Prolina 250 + MES 0.5	25 °C, 16/8 h luz - oscuridad	--	
		Crecimiento IV: MS	25 °C, 16/8 h luz - oscuridad	--	
<i>O. sativa</i> L.	8 °C durante 10 días	Inducción I: NBM + 2, 4-D 2 + NAA 2 + KT 1 + Pro 0.5 + Gln 0.5 + CH 0.5	24 - 28 °C en oscuridad, durante 2 a 3 meses	--	(Huang <i>et al.</i> , 2021)
		Regeneración II: --	28 °C luz de 10-12 h/d, intensidad de 1000-1500 lx	--	

DISCUSIÓN

La inducción de callos embriogénicos durante el IAC está influenciada por factores como el medio de cultivo, los reguladores del crecimiento, el pretratamiento en frío, el genotipo, el estado de las microsporas y las condiciones de cultivo (Germanà, 2011b).

Se ha descrito que el tratamiento en frío de las panículas puede retrasar la senescencia, prolongar la viabilidad de las microsporas y prevenir su aborto, manteniendo así el mayor número de microsporas viables que están destinadas a formar embriones (Zapata-Arias, 2003). El tratamiento en frío ha sido usado en diversas variedades e híbridos de arroz (Tabla 1), pero la respuesta puede variar por el genotipo, el estado de la microspora y otros factores que intervienen en el desarrollo y crecimiento de las plantas. Para el cultivo de anteras de arroz, el estado ideal de las microsporas es uninucleado temprano, medio o tardío (Bishnoi et al., 2000).

La desinfección de las panículas antes y después del pretratamiento se describe como un aspecto importante para establecer un cultivo aséptico. El tratamiento más utilizado es la inmersión de las macollas en etanol al 70% (v/v) durante 1 min y enjuague con agua estéril (Lentini, 1997; López-Cristoffanini et al., 2018; Serrat et al., 2013). Herath & Bandara (2011) realizaron el tratamiento mediante inmersión en etanol al 70% (v/v) durante 20 s, seguido de solución de lejía comercial al 30% (v/v) (Chlorox®) durante 20 min. Por su parte, Hooghvorst et al. (2018) remojaron las panículas en etanol al 70% durante 1 minuto, enjuagaron y empaparon en una solución de hipoclorito de sodio al 10% con Tween 20 (30 gotas L⁻¹) y ácido clorhídrico al 35% (50 gotas L⁻¹) durante 3 min.

El medio de cultivo utilizado con frecuencia para la etapa de inducción de callos en el IAC de arroz, es el N6 (Chu et al., 1975). Sin embargo, diversos estudios han realizado modificaciones con el propósito de mejorar la respuesta *in vitro*. Por ejemplo, Lentini et al. (1995) eliminaron el sulfato de amonio y disminuyeron la concentración de otros elementos, con lo cual mejoraron la inducción de callos en arroz variedad 'Similitud'. Bishnoi et al. (2000), utilizaron el medio con la mitad de amonio (NH⁴⁺) y el doble de fosfato (PO₄²⁻), además agregaron un agente de acción anti-etileno (nitrato de plata-AgNO₃). Por su parte, Ali et al. (2021) redujeron la sacarosa a 30 g L⁻¹, agregaron 30 g L⁻¹ de maltosa y 100 mg L⁻¹ de my-inositol, además redujeron el 2,4-D a 1 mg L⁻¹ y 1 mg L⁻¹ de ácido naftalenoacético (NAA) y 0.10 mg L⁻¹ de zeatina, registrando valores entre un 62% - 72.11% en la inducción de callos embriogénicos (Tabla 1).

La adición de AgNO₃ puede promover el desarrollo de callos y la regeneración de plantas verdes ya que inhibe la síntesis de etileno (Lentini et al., 1995; Niroula & Bimb, 2009). Por su parte, la reducción de

sacarosa y adición de maltosa muestran efectos beneficiosos para la inducción del crecimiento esporofítico de las microsporas (Lentini et al., 1995), además actúa como regulador osmótico, lo que conlleva a una mejor respuesta de callos y regeneración (Tripathy et al., 2019).

Respecto a los reguladores de crecimiento, Naik et al. (2017) utilizaron medio N6 suplementado con 2 mg L⁻¹ de 2,4-D y 0,5 mg L⁻¹ de BAP, lo cual resultó beneficioso para incrementar la inducción de callos. El uso de 2,4-D y NAA solos o en combinación con kinetina (kin) parecen ser los principales determinantes de la callosidad embriogénica de las anteras de arroz (Mukherjee et al., 2015). Los reguladores de crecimiento como el 2,4-D y NAA por si solos no siempre pueden iniciar la regeneración de los callos embriogénicos; sin embargo, su efecto puede mejorar cuando se agrega citoquininas como kin y BAP debido al efecto sinérgico de los reguladores de crecimiento. Se ha descrito que el 2,4-D induce la formación de callos, mientras que el ácido indol acético (AIA) y NAA promueven la androgénesis directa (Ball et al., 1993). Niroula & Bimb (2009) obtuvieron una mayor frecuencia de inducción de callos en el medio N6 suplementado con 2,4-D (2,5 mg L⁻¹) + Kin (0,5 mg L⁻¹) que el medio suplementado con NAA (4 mg L⁻¹) + Kin (0,5 mg L⁻¹); sin embargo, lo contrario se observa en la regeneración de plantas verdes. Altas concentraciones de BAP y 2,4-D (por encima de 1,0 mg L⁻¹ y 3,0 mg L⁻¹, respectivamente) mostraron efecto nulo en la formación de callos (Rahman et al., 2020). Además, las auxinas cumplen un rol importante para estimular el enraizamiento, mientras que las citocininas favorecen el desarrollo de los brotes, tallos y hojas (Lentini, 1997). El óptimo desarrollo del sistema caulinar y radicular de las plántulas permitirá que estas se adapten y logren altas tasas de supervivencia en condiciones *ex vitro*.

El IAC es una técnica que permite el mejoramiento de plantas y la obtención de haploides y DH (Suvorova, 2016). En arroz, se han desarrollado varias variedades y líneas parentales mejoradas a través de enfoques androgénicos, principalmente en híbridos japónica (He et al., 2006); sin embargo, el uso de IAC como técnica para mejorar el cultivo de arroz índica es limitado debido a la mala inducción de callos androgénicos y la posterior regeneración de la planta (Sripichitt et al., 2000). La baja tasa de frecuencia en la inducción de callos y regeneración de plantas verdes en cultivares índica, minimizan la obtención de plantas DH debido al escaso potencial que se muestran, además de una mayor presencia de plantas albinas (Chen et al., 1991; Dewi et al., 2009).

Las plantas haploides ($n = x$) son, por lo general, pequeñas, débiles, con problemas de crecimiento y estériles, las diploides DH ($n = 2x$) son plantas fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla y las plantas poliploides muestran un mayor crecimiento, con estructuras florales más

desarrolladas, granos con aristas largas, y parcialmente estériles (Lentini, 1997). Pérez et al., (2012), evaluaron plantas de la segunda generación de dobles haploides sembradas en condiciones de campo, y observaron un alto grado de homogeneidad fenotípica dentro de cada línea, lo que mostró la rápida fijación de los caracteres alcanzada al utilizar la técnica del cultivo de anteras, con relación a la evaluación realizada frente a la resistencia a Piriculariosis los resultados mostraron que sólo 9 líneas (8394, 8425, 8432, 8837, 8838, 8839, 8840, 8841 y 8842), además resultaron resistentes, tanto en la hoja como en el cuello de la panícula.

CONCLUSIONES

Los grandes avances en el cultivo in vitro de anteras de arroz han iluminado las perspectivas para el mejoramiento genético del cultivo. Los estudios han permitido desarrollar el cultivo aséptico, obtener altas tasas de inducción y regeneración de plantas verdes y su posterior diploidización, además del enraizamiento in vitro y el trasplante a condiciones ex vitro. Sin embargo, pese a los esfuerzos, los protocolos aún no son viables para su aplicación comercial en todos los cultivares ya que genotípicamente son diferentes y las reacciones cambian para cada uno. Es decir, aún existen problemas importantes a superar como la aparición de plantas albinas, por lo cual es necesario desarrollar protocolos específicos y viables para mejorar la respuesta de las microsporas en el desarrollo embriogénico de las anteras. Esta revisión debería facilitar un nivel de investigación más específico y profundo para el cultivo de anteras in vitro de arroz, promoviendo así la información para el mejoramiento del cultivo.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Afza, R., Shen, M., Zapata-Arias, F. J., Xie, J., Fundi, H. K., Lee, K.-S., Bobadilla-Mucino, E., & Kodym, A. (2000). Effect of spikelet position on rice anther culture efficiency. *Plant Science*, 153(2), 155-159. [https://doi.org/10.1016/S0168-9452\(99\)00266-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(99)00266-6)
- Ali, J., Nicolas, K. L. C., Akther, S., Torabi, A., Ebadi, A. A., Marfori-Nazarea, C. M., & Mahender, A. (2021). Improved Anther Culture Media for Enhanced Callus Formation and Plant Regeneration in Rice (*Oryza sativa* L.). *Plants*, 10(5), 839. <https://doi.org/10.3390/plants10050839>
- Asaduzzaman, M., Bari, M. A., Rahman, M. H., Khatun, N., Islam, M. A., & Rahman, M. (2003). In vitro plant regeneration through anther culture of five rice varieties. *OnLine Journal of Biological Sciences (Pakistan)*, 3(2), 167-171.

- Ball, S. T., Zhou, H., & Konzak, C. F. (1993). Influence of 2,4-D, IAA, and duration of callus induction in anther cultures of spring wheat. *Plant Science*, 90(2), 195-200.
- Bishnoi, U., Jain, R. K., Rohilla, J. S., Chowdhury, V. K., Gupta, K. R., & Chowdhury, J. B. (2000). Anther culture of recalcitrant indica × Basmati rice hybrids. *Euphytica*, 114(2), 93-101.
- Chen, C.-C., Tsay, H.-S., & Huang, C.-R. (1991). Factors Affecting Androgenesis in Rice (*Oryza sativa* L.). En Y. P. S. Bajaj (Ed.), *Rice* (Vol. 14, pp. 193-215). Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-642-83986-3_14
- Chu, C. C., Wang, C. C., Sun, C. S., Hsu, C., Yin, K. C., & Bi, F. Y. (1975). Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia sinica*, 18(5), 659-668.
- Cristo, E., & Gonzáles, M. C. (2000). Androgénesis in vitro en híbridos y variedades de arroz (*Oryza sativa* L.). *Cultivos Tropicales*, 21(2), 21-22.
- Dewi, I. S., Purwoko, B. S., Aswidinnoor, H., Somantri, I. H., & Chozin, M. A. (2009). Plant regeneration from anther cultures of several genotypes of indica rice tolerant to aluminum toxicity. *Indonesian J. Agric*, 2(1), 1-5.
- Dwivedi, S. L., Britt, A. B., Tripathi, L., Sharma, S., Upadhyaya, H. D., & Ortiz, R. (2015). Haploids: Constraints and opportunities in plant breeding. *Biotechnology Advances*, 33(6), 812-829.
- Forster, B. P., Heberle-Bors, E., Kasha, K. J., & Touraev, A. (2007). The resurgence of haploids in higher plants. *Trends in Plant Science*, 12(8), 368-375. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2007.06.007>
- Germanà, M. A. (2011a). Anther culture for haploid and doubled haploid production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 104(3), 283-300. <https://doi.org/10.1007/s11240-010-9852-z>
- Germanà, M. A. (2011b). Gametic embryogenesis and haploid technology as valuable support to plant breeding. *Plant Cell Reports*, 30(5), 839-857. <https://doi.org/10.1007/s00299-011-1061-7>
- Gioi, T. D., & Tuan, V. D. (2002). Effect of different media and genotypes on anther culture efficiency of F1 plants derived from crosses between IR64 and new plant type rice cultivars. 10, 107-109.
- Guzmán, M., & Zapata Arias, F. J. (2000). Increasing anther culture efficiency in rice (*Oryza sativa* L.) using anthers from ratooned plants. *Plant Science*, 151(2), 107-114.
- He, T., Yang, Y., Tu, S. B., Yu, M. Q., & Li, X. F. (2006). Selection of interspecific hybrids for anther culture of indica rice. *Plant Cell Tiss Org* 86:271– 277. <https://doi.org/10.1007/s11240-006-9117-z>

- Herath, H. M. I., & Bandara, D. C. (2011). Anther culture performance in selected high yielding indica (of Sri Lanka) and japonica rice varieties and their inter sub-specific hybrids. *Journal of the National Science Foundation of Sri Lanka*, 39(2), 149-154.
- Hooghvorst, I., Ferreres, I., & Nogués, S. (2021). Anther Culture and Chromosome Doubling in Mediterranean Japonica Rice. En *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.) (In *Doubled Haploid Technology*, Vol. 2287, pp. 333-341). https://doi.org/10.1007/978-1-0716-1315-3_19
- Hooghvorst, I., Ramos-Fuentes, E., López-Cristofannini, C., Ortega, M., Vidal, R., Serrat, X., & Nogués, S. (2018). Antimitotic and hormone effects on green double haploid plant production through anther culture of Mediterranean japonica rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 134(2), 205-215. <https://doi.org/10.1007/s11240-018-1413-x>
- Huang, C., Zhang, J., Zhou, D., Huang, Y., Su, L., Yang, G., Luo, W., Chen, Z., Wang, H., & Guo, T. (2021). Identification and candidate gene screening of qCIR9.1, a novel QTL associated with anther culturability in rice (*Oryza sativa* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 134(7), 2097-2111. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03808-z>
- Ignacimuthu, S., & Arockiasamy, S. (2006). Agrobacterium-mediated transformation of an elite indica rice for insect resistance. *Current Science*, 90(6), 829-838.
- Khatun, R., Islam, S. S., & Bari, M. A. (2010). Studies on Plant Regeneration Efficiency Through in vitro Micropropagation and Anther Culture of Twenty Five Rice Cultivars in Bangladesh. *Journal of Applied Sciences Research*, 6(11), 1705-1711.
- Lal, D., Shashidhar, H. E., Godwa, P. H. R., & Ashok, T. H. (2014). Callus Induction and Regeneration from In Vitro anther Culture of Rice (*Oryza sativa* L.). *International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology*, 7(2), 213. <https://doi.org/10.5958/2230-732X.2014.00236.8>
- Lentini, Z. (1997). Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. (Vol. 293). CIAT.
- Lentini, Z., Reyes, P., Martínez, C. P., & Roca, W. M. (1995). Androgenesis of highly recalcitrant rice genotypes with maltose and silver nitrate. *Plant Science*, 110(1), 127-138.
- López-Cristoffanini, C., Serrat, X., Ramos-Fuentes, E., Hooghvorst, I., Llaó, R., López-Carbonell, M., & Nogués, S. (2018). An improved anther culture procedure for obtaining new commercial Mediterranean temperate japonica rice (*Oryza sativa*) genotypes. *Plant Biotechnology*, 35(2), 161-166. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.18.0409a>

- Mayakaduwa, D. M. R. G., & Silva, T. D. (2021). In vitro response of Indica rice microspores subjected to cold stress: A cytological and histological perspective. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*. <https://doi.org/10.1007/s11627-021-10177-1>
- Mukherjee, A., Islam, M. R., Nasiruddin, K. M., & Banerjee, P. (2015). Study on callus initiation and plantlet regeneration ability of some rice genotypes. *Int J Sci Tech Res*, 4, 354-361.
- Naik, N., Rout, P., Umakanta, N., Verma, R. L., Katara, J. L., Sahoo, K. K., Singh, O. N., & Samantaray, S. (2017). Development of doubled haploids from an elite indica rice hybrid (BS6444G) using anther culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 679-689.
- Niizeki, H., & Oono, K. (1968). Induction of Haploid Rice Plant from Anther Culture. *Proceedings of the Japan Academy*, 44(6), 554-557. <https://doi.org/10.2183/pjab1945.44.554>
- Niroula, R. K., & Bimb, H. P. (2009). Effect of Genotype and Callus Induction Medium on Green Plant Regeneration from Anther of Nepalese Rice Cultivars. *Asian Journal of Plant Sciences*, 8(5), 368-374. <https://doi.org/10.3923/ajps.2009.368.374>
- Pérez, N. de J., González, M. C., Castro, R. I., & Aguilar, M. (2012). Nuevos genotipos de arroz resistentes a la Piriculariosis obtenidos por cultivo de anteras. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 1, 256-270.
- Rahman, Z. A., Seman, Z. A., Othman, A. N., Ab Ghaffar, M. B., Razak, S. A., Mohd Yusof, M. F., Nasir, K. H., Ahmad, K., Chow, Y. L., & Subramaniam, S. (2020). Efficient callus induction and plant regeneration of Malaysian indica rice MR219 using anther culture. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 31, 101865. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101865>
- Roy, B. (2005). Anther culture response in indica rice and variations in major agronomic characters among the androclones of a scented cultivar, Karnal local. *African journal of biotechnology*, 4(2), 235-240.
- Serrat, X., Cardona, M., Gil, J., Brito, A. M., Moysset, L., Nogués, S., & Lalanne, E. (2013). A Mediterranean japonica rice (*Oryza sativa*) cultivar improvement through anther culture. *Euphytica*, 195(1), 31-44. <https://doi.org/10.1007/s10681-013-0955-6>
- Shahnewas, S., Bari, M. A., Siddique, N. A., & Rahman, M. H. (2004). Effects of Genotype on Induction of Callus and Plant Regeneration Potential in vitro Anther Culture of Rice (*Oryza sativa* L.). *Pak J Biol Sci*, 7, 235-237. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2004.235.237>
- Sripichitt, P., Ozawa, T., Otani, M., & Shimada, T. (2000). Improved Method for Anther Culture of an Indica Rice Cultivar of Thailand. *Plant Production Science*, 3(3), 254-256.

- Suvorova, G. (2016). Buckwheat Tissue Cultures and Genetic Transformation. En *Molecular Breeding and Nutritional Aspects of Buckwheat* (pp. 365-375). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-803692-1.00029-8>
- Talebi, R., Rahemi, M. R., Arefi, H., Nourozi, M., & Bagheri, N. (2007). In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 10(12), 2056-2060. <https://doi.org/10.3923/pjbs.2007.2056.2060>
- Trejo-Tapia, G., Maldonado Amaya, U., Salcedo Morales, G., De Jesús Sánchez, A., Martínez Bonfil, B., Rodríguez-Monroy, M., & Jiménez-Aparicio, A. (2002a). The effects of cold-pretreatment, auxins and carbon source on anther culture of rice. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 71(1), 41-46. <https://doi.org/10.1023/A:1016558025840>
- Trejo-Tapia, G., Maldonado-Amaya, U., Jiménez-Aparicio, A., Blanqueto-Illescas, M., Salcedo-Morales, G., Martínez-Bonfil, B. P., & De Jesús-Sánchez, A. (2002b). Efecto del tiempo de exposición a baja temperatura y de reguladores de crecimiento en la regeneración de plantas a partir de anteras de arroz *Oryza sativa* L. (Cultivar Japónica H2005). *Agrociencia*, 36(4), 441-449.
- Tripathy, S. K., Swain, D., Mohapata, P. M., Prusti, A. M., Sahoo, B., Panda, S., Dash, M., Chakma, B., & Behera, S. K. (2019). Exploring factors affecting anther culture in rice (*Oryza sativa* L.). *Journal of Applied Biology & Biotechnology*, 7(2), 87-92.
- Wang, Li., Lin, G., Zhao, D., Wang, F., & Chen, J. (2011). Tissue Culture System for Different Hybrid of Indica Rice. *Journal of Northeast Agricultural University (English Edition)*, 18(2), 13-17. [https://doi.org/10.1016/S1006-8104\(12\)60003-8](https://doi.org/10.1016/S1006-8104(12)60003-8)
- Wang, M., van Bergen, S., & Van Duijn, B. (2000). Insights into a Key Developmental Switch and Its Importance for Efficient Plant Breeding. *Plant Physiology*, 124(2), 523-530.
- Zapata-Arias, F. J. (2003). Laboratory protocol for anther culture technique in rice. En M. Maluszynski, K. J. Kasha, B. P. Forster, & I. Szarejko (Eds.), *Doubled Haploid Production in Crop Plants* (pp. 109-116). Springer Netherlands. <https://doi.org/10.1007/978-94-017-1293-4>
- Zuraida, A. R., Naziah, B., Zamri, Z., & Sreeramanan, S. (2011). Efficient plant regeneration of Malaysian indica rice MR 219 and 232 via somatic embryogenesis system. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5), 1913-1921. <https://doi.org/10.1007/s11738-011-0739-3>