

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Juan Carlos Macías Suárez

Declaro que:

La Tesis de Grado denominada “Obtención de líneas dihaploides de arroz (*Oryza sativa* L.) a través del cultivo *in vitro* de anteras de 10 poblaciones F1”, ha sido desarrollado con base a una investigación, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas, cuyas fuentes se incorporan en la bibliografía. Consecuentemente este trabajo es de mi autoría.

En virtud de esta declaración, me responsabilizo del contenido, veracidad y alcance científico del proyecto de grado en mención.

Guayaquil, febrero de 2015

Juan Carlos Macías Suárez

0922217823

REPOSITORIO NACIONAL EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA		
FICHA DE REGISTRO DE TESIS		
TÍTULO: "OBTENCIÓN DE LINEAS DIHAPLOIDES DE ARROZ (<i>Oryza sativa</i> L.) A TRAVES DEL CULTIVO <i>IN VITRO</i> DE ANTERAS EN 10 POBLACIONES F1"		
AUTOR/ES: JUAN CARLOS MACÍAS SUÁREZ	TUTOR: Ing. Agr. Ricardo Guamán Jiménez	REVISORES: Ing. Agr. Leticia Vivas Vivas, Msc. Ing. Agr. Carlos Becilla Justillo, Msc. Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire, Msc.
INSTITUCIÓN: Universidad de Guayaquil	FACULTAD: Ciencias Agrarias	
CARRERA: Ingeniería Agronómica		
FECHA DE PUBLICACIÓN:	No. DE PÁGS:	
TÍTULO OBTENIDO: Ingeniero Agrónomo		
ÁREAS TEMÁTICAS: Agricultura, Biotecnología, Mejoramiento genético		
PALABRAS CLAVE: Cultivo de anteras		
<p>RESUMEN: La presente investigación estuvo dirigida a la obtención de plantas dihaploides de arroz a través del cultivo de anteras. Los objetivos fueron: 1) Realizar el cultivo de anteras para obtener microcallos; 2) Obtener plántulas dihaploides en 10 poblaciones de arroz y 3) Determinar la ploidía de las estas poblaciones F1 mediante la técnica de citometría de flujo. Se estudiaron diez poblaciones F1 de arroz, solo cuatro de éstas obtuvieron mayor respuesta a la inducción de callos (GO38404 X GO38063; INIAP-12 X GO38404; FEDEARROZ-50 X INIAP-12; INIAP-14 X JAPON), En la regeneración de plantas, se obtuvieron los resultados esperados ya que de las diez poblaciones en estudio, cuatro regeneraron plantas (GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; INIAP-16 X JAPON). Los cultivares tipo indica, tuvieron mejor respuesta a esta herramienta biotecnológica. Además se obtuvieron cinco plantas verdes en los cultivares GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; mientras que se obtuvieron cinco plantas albinas en cuatro cultivares GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; INIAP-16 X JAPON. La ploidía a través de la citometría de flujo, no se obtuvieron los resultados esperados, puesto que de los tres cultivares que regeneraron plantas verdes solo el cultivar INIAP-16 X FEDEARROZ-50 se adaptó a la fase de aclimatación, la constitución genética de este genotipo tuvo un grupo cromosomas haploide.</p>		
No. DE REGISTRO (en base de datos):	No. DE CLASIFICACIÓN:	
DIRECCIÓN URL (tesis en la web):		
ADJUNTO PDF:	SI <input checked="" type="checkbox"/>	NO <input type="checkbox"/>
CONTACTO CON AUTOR/ES: Juan Carlos Macías Suárez	Teléfono: 0994457326	Email: jcmaciass@hotmail.com
CONTACTO EN LA INSTITUCIÓN:	Nombre: Abg. Isabel Zambrano	
Ciudadela Universitaria "Dr. Salvador Allende". Av. Delta s/n y Av. Kennedy s/n. Guayaquil- Ecuador	Teléfono: (03)2848487 Ext. 123	
	E-mail: www.ug.edu.ec/facultades/cienciasagrarias	

AUTORIZACIÓN

Yo, Juan Carlos Macías Suárez autorizo a la Universidad de Guayaquil, la publicación, en la biblioteca virtual de la Institución de la tesis de grado titulada “Obtención de líneas dihaploides de arroz (*Oryza sativa* L.) a través del cultivo *in vitro* de anteras de 10 poblaciones F1”, cuyo contenido, ideas y criterios son de exclusiva responsabilidad y autoría.

Guayaquil, febrero de 2015

Juan Carlos Macías Suárez

0922217823



**UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS**

TESIS DE GRADO

Previa a la obtención del título de

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA:

“Obtención de líneas dihaploides de arroz (*Oryza sativa* L.) a través del cultivo *in vitro* de anteras de 10 poblaciones F1”

AUTOR:

JUAN CARLOS MACÍAS SUÁREZ

DIRECTOR DE TESIS:

ING. AGR. RICARDO GUAMÁN JIMENEZ Msc.

GUAYAQUIL – ECUADOR

2015



UNIVERSIDAD DE GUAYAQUIL
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

La presente tesis de grado titulada “Obtención de líneas dihaploides de arroz (*Oryza sativa* L.) a través del cultivo *in vitro* de anteras de 10 poblaciones F1”; realizada por el Egdo. Juan Carlos Macías Suárez, bajo la dirección del Ing. Agr. Ricardo Guamán Jiménez; ha sido aprobada y aceptada por el Tribunal de Sustentación como requisito parcial para obtener el título de:

INGENIERO AGRÓNOMO

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Agr. Leticia Vivas Vivas Msc.
Presidente

Ing. Agr. Eison Valdiviezo Freire Msc.
Examinador Principal

Ing. Agr. Carlos Becilla Justillo Msc. Ed.
Examinador Principal

DEDICATORIA

A Dios, por darme, sabiduría, fortaleza y perseverancia para cumplir con mi trabajo.

A mis padres Ing. Agr. Euclides Santos Macías García y Sra. Ángela Eugenia Suárez Villamar excelentes padres, mi orgullo y ejemplo, quienes con devoción, amor y principios supieron guiar mi vida y formarme para ser la persona que soy.

A mí esposa Diana, a mí hija Doménica, quienes son la expresión del amor infinito, en reconocimiento a su entrega, dedicación y amor; la razón para seguir luchando.

A mis abuelos Ernestina, Mami Ninfa, Papi Pedro quienes velan y velaron por mí en mis primeros años y aportaron incondicionalmente en mi educación.

A mis tíos paternos: Georgina, Elizabeth, Margarita, Fidel, Walter y Arístides por todo lo que significan para mí.

A mis tíos maternos: Galo, Germania, Sonia, Juan, Pedro, por sus consejos y enseñanzas, en mi diario vivir.

A mi hermano Denisse, Walter mi mejor amigo, e Ileana la niña de mis ojos, por su ayuda, y comprensión.

A mis queridos suegros Efraín, Sonia por su apoyo incondicional en el desarrollo del presente trabajo.

AGRADECIMIENTO

El autor presenta su gratitud sincera a la Universidad de Guayaquil, Facultad de Ciencias Agrarias, autoridades, profesores, personal administrativo y de servicios quienes de una u otra forma cooperaron en la formación profesional del autor.

Al Laboratorio de Biotecnología y Programa de Arroz del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP) Estación Experimental del Litoral Sur.

Un reconocimiento especial a la Ing. Agr. María Eugenia Romero Román, y al Ing. Agr. Lenin Pedro Arana Vera, Responsable y Técnico correspondientemente del Laboratorio de Biotecnología; por su apoyo, consejos, y ayuda.

Al Ing. Agr. Francisco Andrade España (+), Ing. Agr. Ricardo Guamán Jiménez ex-catedrático y catedrático respectivamente de la Universidad de Guayaquil; ya que gracias a ellos fue posible la realización del presente trabajo de investigación por su tiempo, colaboración y conocimientos.

A la Corporación Favorita C.A a través de la Gerencia de Talento Humano, por haberme dado la facilidad para poder culminar con mis estudios superiores.

A mi gran amigo y compañero de fórmula Ing. Agr. Darlin Saúl Tumbaco Pibaque; a mis compañeros de laboratorio, Sra. Mónica Puga, Sr. Jesús Farías por brindarme su apoyo. A todos mis amigos, personal técnico y administrativo de la EELS - INIAP que indirectamente ayudaron para la finalización de la Tesis.

Las investigaciones, resultados, conclusiones y recomendaciones del presente trabajo, son de exclusiva responsabilidad de la autor.

Juan Carlos Macías Suárez

jcmaciass@hotmail.com

INDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Objetivos	2
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Descripción Botánica	3
2.2. Importancia económica	3
2.3. Mejoramiento Genético	4
Selección masal	5
Selección por pedigré	5
Mejoramiento genético moderno	6
Cultivo de Tejidos	7
Cultivo de anteras	7
Proceso de cultivo de anteras en arroz	8
2.4. Citometría de flujo	9
III. MATERIALES Y MÉTODOS	10
3.1. Ubicación geográfica	10
3.2. Material Vegetal	10
3.3. Materiales de laboratorio, equipos y reactivos	12
3.4. Manejo del ensayo	13
Selección de panículas para cultivo de anteras	13
Desinfección de panículas y flores para cultivo de anteras	14
Siembra de anteras en medios de cultivo para la inducción de callos	14
Transferencia de callos a medio de regeneración de plantas	15
Aclimatación de plantas R1	16
3.5. Variables estudiadas	17
Potencial callogénico	17
Diferenciación de órganos	17
Potencial de regeneración	17

Plantas verdes	17
Plantas albinas	17
Nivel de ploidía	18
3.6. Análisis estadístico	18
IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
4.1. Potencial callogénico	19
4.2. Diferenciación de órganos	20
4.3. Potencial de regeneración	21
4.4. Plantas verdes	22
4.5. Plantas albinas	23
4.6. Nivel de ploidía	25
V. CONCLUSIÓN	26
VI. RECOMENDACIONES	27
RESUMEN	28
SUMMARY	30
LITERATURA CITADA	31
ANEXOS	35

INDICE DE CUADROS

CUADRO 1. PARENTALES DE 10 POBLACIONES F1 UTILIZADOS PARA EL CULTIVO DE ANTERAS EELS/UG, 2014	11
CUADRO 2. CARACTERÍSTICAS FENOTÍPICAS Y SANITARIAS DE LOS MATERIALES GENÉTICOS UTILIZADOS. EELS/UG, 2014.....	11
CUADRO 3. MATERIALES, EQUIPOS Y REACTIVOS USADOS EN EL ESTUDIO DEL CULTIVO DE ANTERAS EELS/UG, 2014.....	12

INDICE DE ANEXOS

ANEXO 1. VALORES DE ANTERAS SEMBRADAS EN MEDIO DE INDUCCIÓN DE CALLOS (IC). EELS/UG, 2014	35
ANEXO 2. VALORES DE CALLOS SEMBRADOS EN MEDIO DE REGENERACIÓN DE PLANTAS (RP). EELS/UG, 2014.	35
ANEXO 3. VALORES DE PLANTAS REGENERADAS (%), TRANSFERIDAS A MEDIOS DE REGENERACIÓN. EELS/UG, 2014.	36
ANEXO 4. ÍNDICE DE PLANTAS VERDES REGENERADAS A PARTIR DE CALLOS DIFERENCIADOS. EELS/UG, 2014.....	36
ANEXO 5. ÍNDICE DE PLANTAS ALBINAS REGENERADAS A PARTIR DE CALLOS DIFERENCIADOS. EELS/UG, 2014.....	37
ANEXO 6. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS Y MEDIO DE CULTIVO M1, PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS. (FUENTE: CIAT).....	38
ANEXO 7. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS Y MEDIO DE CULTIVO L1, PARA LA INDUCCIÓN DE CALLOS.	40
ANEXO 8. PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS Y MEDIO DE CULTIVO MS, PARA REGENERACIÓN DE PLANTAS. (FUENTE: CIAT).....	42

INDICE DE FIGURAS

FIGURA 1. SELECCIÓN DE PANÍCULA DE ACUERDO A DISTANCIA ENTRE HOJA BANDERA Y AURÍCULA (A, B); COLECTA DE 5 A 10 PANÍCULAS POR CRUCE (C); DISTANCIA ENTRE HOJA BANDERA Y AURÍCULA DE 3 A 4 CM (D). EELS/UG, 2014. ...	13
FIGURA 2. SELECCIÓN DE FLORES PARA LA SIEMBRA DE ANTERAS (A); FLORES DE ARROZ SECCIONADAS PARA SER SEMBRADAS (B); SIEMBRA DE ANTERAS EN MEDIO DE CULTIVO DE INDUCCIÓN DE CALLOS (C); ENVASE PLÁSTICO UTILIZADO PARA LA SIEMBRA DE ANTERAS DE ARROZ (D). EELS/UG, 2014.....	15
FIGURA 3. FASE DE TRANSFERENCIA DE CALLOS PARA REGENERACIÓN EELS/UG, 2014.	16
FIGURA 4. PLANTAS REGENERADAS A PARTIR DEL CICLO ANDROGÉNICO (A,B); PLANTAS EN PROCESO DE ACLIMATACIÓN EN VIVERO (C); PLANTAS REGENERADAS TRASPLANTADAS A MACETAS CON LODO (D). EELS/UG, 2014.	16
FIGURA 5. PORCENTAJE DE POTENCIAL CALLOGÉNICO EN EL CULTIVO DE ANTERAS DE 10 POBLACIONES F1 DE ARROZ EELS/UG, 2014.	20
FIGURA 6. DIFERENCIACIÓN DE CALLOS TRANSFERIDOS A MEDIOS DE REGENERACIÓN DE PLANTAS, OBTENIDO EN 10 POBLACIONES F1 DE ARROZ. EELS/UG, 2014.	21
FIGURA 7. PORCENTAJE DE REGENERACIÓN DE PLANTAS IN VITRO, EN 10 POBLACIONES F1 DE ARROZ. EELS/UG, 2014.	22
FIGURA 8. PORCENTAJE DE PLANTAS VERDES REGENERADAS IN VITRO, DE 10 POBLACIONES F1 DE ARROZ. EELS/UG, 2014.	23
FIGURA 9. PORCENTAJE DE PLANTAS ALBINAS REGENERADAS IN VITRO, EN 10 POBLACIONES F1 DE ARROZ. EELS/UG, 2014.	24
FIGURA 10. ANÁLISIS DE PLOIDÍA, REALIZADO A TRAVÉS DEL EQUIPO MARCA PARTEC. EELS/UG, 2014.	25

Guayaquil, 12 de febrero de 2015

CERTIFICADO DE GRAMATOLOGÍA

Ing. Agr. Leticia Vivas Vivas, Msc., con domicilio ubicado en la ciudad de Guayaquil, por el presente Certifico: Que he revisado la tesis de grado, elaborada por el señor **JUAN CARLOS MACÍAS SUÁREZ**, previa a la obtención del título de **INGENIERO AGRÓNOMO**, cuyo tema es: “**OBTENCIÓN DE LÍNEAS DIHAPLOIDES DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) A TRAVÉS DEL CULTIVO *IN VITRO* DE ANTERAS DE 10 POBLACIONES F1**”.

La tesis de grado arriba señalada, ha sido escrita de acuerdo a las normas gramaticales y de sintaxis vigentes de la Lengua Española.



ING. AGR. LETICIA VIVAS VIVAS, Msc.

C.C. No. 1304384546

Registro SENESCYT: 1009-02-211813

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.), es una de las especies sembradas más antiguas y fue domesticado hace más de 10000 años en el área que abarca el noreste de India, Bangladesh, Birmania, Tailandia, Laos, Vietnam y el sureste de China. La mayor diversidad de las formas cultivadas primitivas y sus parientes silvestres se han encontrado en esta vasta región (Poehlman y Sleper, 2003).

A través del tiempo, los mejoradores de plantas han realizado cruzamientos intentando obtener descendencias que proporcionen nuevas características de interés y beneficio para los agricultores y su economía local. Para mejorar la calidad, productividad, utilidad y acelerar la introducción de características superiores en los productos agrícolas, la biotecnología de plantas ha desarrollado métodos para la fijación de genes exógenos en especies económicamente importantes (INIA, 2005).

Los avances de la biotecnología en algunos cultivos han sido muy rápidos ya que en poco tiempo se puede causar mutación, fusionar o transformar cualquier célula y, de entre miles de células tratadas hacer selección de aquellas que tengan posibilidades de regenerar plantas nuevas con las características deseadas (UJAT, 2002).

El método de cultivo de anteras y obtención de haploides *in vitro* está cobrando importancia en muchos programas de mejoramiento, ya que al diploidizar a las plantas se aumenta la frecuencia de determinados genes, lo cual magnifica la variabilidad genética lo que permite acelerar el proceso de selección de plantas superiores o con resistencia a factores bióticos o abióticos (FAO, 1995).

El cultivo de anteras es una herramienta complementaria en el mejoramiento genético, pues posee la ventaja de fijar las características deseadas en un tiempo

menor al requerido por el método tradicional de pedigree. La integración de las metodologías de mejoramiento genético tradicional, el cultivo de anteras y la caracterización bioquímica y molecular, posibilitan la generación de variedades diferenciadas de arroz con elevado valor nutricional y sin alérgenos, que pueden ofrecerse en nichos de mercado específicos, lo cual incrementará las utilidades de los productores de arroz (Martínez, 2005).

Por lo antes expuesto la presente investigación estuvo orientada a la búsqueda de herramientas biotecnológicas complementarias como el cultivo de anteras y la citometría de flujo aplicadas a 10 poblaciones F1 de arroz, provenientes de cruzamientos simples realizados por el Programa de Arroz del INIAP, para de esta manera poder contribuir con el avance de las investigaciones de dicho Programa.

Por lo señalado anteriormente los objetivos de la presente investigación fueron los siguientes:

1.5. Objetivos

Objetivo general

- Obtener plantas dihaploides a partir del cultivo de anteras en 10 poblaciones F1 de arroz.

Objetivos específicos

- Realizar el cultivo de anteras para la obtención de microcallos de arroz en 10 poblaciones F1.
- Obtener plántulas dihaploides en 10 poblaciones F1 de arroz.
- Determinar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción Botánica

El arroz (*Oryza sativa*, L.) es una planta monocotiledónea perteneciente a la familia *Poaceae* de las gramíneas. Las raíces son delgadas, fibrosas y fasciculadas, las mismas que son de dos tipos seminales y adventicias. El tallo se forma de nudos y entrenudos alternados, siendo cilíndrico, erguido, nudoso, glabro de 60-120 cm de longitud; sus hojas son completas en las cuales se distingue la vaina, el cuello y la lámina. En el cuello se encuentra la lígula y las aurículas que son estructuras que fijan la hoja alrededor del tallo a manera de protección. Las espiguillas de la planta de arroz están agrupadas en una inflorescencia denominada panícula, una espiguilla consta de dos lemas estériles, glumas rudimentarias, la raquilla y la florecilla, ésta consta de dos brácteas o glumas florales con seis estambres y un pistilo. Los estambres son filamentos delgados que sostienen las anteras alargadas y bífidas, las cuales contienen los granos de polen (INIAP, 2007).

2.2. Importancia económica

Según el INEC (2013), en el país se cultivaron alrededor de 414.416 hectáreas de cultivo de arroz. La mayor producción de este cultivo se encuentra en la provincia del Guayas con un 69.97 % del total nacional.

2.3. Mejoramiento genético

Muñoz (2011) indica que el mejoramiento genético es la aceleración del proceso evolutivo natural de las especies, con el objeto de crear nuevas variedades que tengan ventajas para el hombre. El mejoramiento genético vegetal ha sido aplicado de forma empírica por el hombre desde que este se hizo sedentario señala Gilleta (2001). El mejoramiento genético en la actualidad según Castañón (2010), se practica de tres formas que son: la tradicional, la

biotecnológica y mediante el uso de la ingeniería genética e hibridación del ADN. Por otra parte, Gardner (1984) menciona que los fitomejoradores son también ingenieros genéticos, pues ellos conjugan grupos de genes de tal manera que maximizan la producción de los cultivos.

De acuerdo con Gilleta (2000) citado por Castañón (2010), indica que el mejoramiento genético vegetal o mejoramiento tradicional ha sido aplicado en forma empírica por los agricultores desde que este se hizo sedentario. Esto se apoya, en lo que hace tiempo alguien anotó que la genética vegetal y animal nacieron cuando el hombre primitivo mezcló las semillas para lograr especies de mayor rendimiento y cruzó animales para obtener ejemplares más fuertes.

Según Arana (2012) el objetivo primordial de los fitomejoradores en el cultivo de arroz es el de desarrollar variedades más productivas para utilizarlas a nivel de fincas. Crestelo (2006) indica que en el mejoramiento genético de arroz existen varios métodos los cuales tienen sus ventajas y desventajas, el método a elegir dependerá del interés y la variabilidad presente. Entre los métodos de mejoramiento genético en arroz más conocidos son la selección masal y selección por pedigree.

De igual manera Antón y Lizaso (2001) citado por Castañón (2010), los cuales mencionan que el mejoramiento genético convencional o clásico, ha permitido obtener nuevas especies de plantas o híbridos con mejores rendimientos o con características agronómicas más favorables. Sin embargo, estos cultivares demandan mayor cantidad de nutrimentos y la aplicación de pesticidas para el control de plagas, enfermedades y maleza. Con el uso de estas prácticas se ha logrado incrementar en un 50% el rendimiento de los cultivos de importancia social como el maíz, sorgo, trigo, arroz y soya. El otro 50% de incremento corresponde a la ganancia por mejoramiento genético señala Boyer (1982), citado por Castañón (2010).

Selección masal

En investigaciones realizadas por Camarena, Chura y Blas (2012), señalan que este método de mejoramiento genético, consiste en la selección de un gran número de individuos, con características fenotípicas similares que luego son mezclados para constituir la generación siguiente. Es uno de los métodos más antiguos de mejoramiento. Este método es eficiente en poblaciones heterogéneas, constituidas por mezclas de líneas puras, en especies autóгамas o por individuos heterocigotos en el caso de alógamas. La idea principal de la selección masal es que al escoger los mejores fenotipos, se mejora el nivel de la población con la reunión de los fenotipos superiores ya existentes.

Selección por pedigré

Por otra parte, Camarena, Chura y Blas (2012), mencionan que el método genealógico, conocido también como el método pedigree, fue inicialmente propuesto por Hjalman Nilsson, usaba la selección individual de plantas como prueba de progenie, metodología que dió origen al método genealógico convencional.

La Asociación de Semilleros Argentinos (ASA) en su portal, mencionan que la selección por pedigrí o genealógica, se basa en la formación de líneas a partir de plantas élite (las que presentan las mejores características). Para ello, cada planta elegida es cosechada individualmente y sus semillas sembradas en una hilera. En la próxima generación se cosechan de cada hilera sólo las mejores plantas, se repite el proceso y se seleccionan las que presenten mejor comportamiento agronómico para las características objeto del mejoramiento. La selección por pedigrí considera el fenotipo y la heredabilidad de los caracteres y resulta más apropiada para plantas autóгамas.

Mejoramiento genético moderno

INIA (2005), menciona a Simmonds (1979), se refiere que en los últimos decenios, los mejoradores de plantas han realizado cruzamientos intentando obtener descendencias que proporcionen nuevas características de interés y beneficios para horticultores. Para Tanksley y McCouch (1997), ese aspecto representa ya una inconsciente utilización del concepto “Biotecnología de plantas” y a su vez manifiesta del mismo modo el requerimiento de una colección de germoplasma y de la mantención de una amplia gama de diversidad genética. La finalidad última, poseer una fuente de genes, con mapas genéticos que permitan la obtención de plantas de interés económico.

Para Camarena, Chura y Blas (2012), la Biotecnología se presenta como una alternativa atractiva no sólo para reducir el tiempo de obtención de los genotipos deseados, sino también para lograr una economía de mano de obra y espacio en el campo experimental. También mencionan que las plantas autógamas, con los métodos convencionales de mejoramiento, la homocigosis prácticamente se logra recién luego de seis a ocho generaciones de autofecundación, mientras que con una técnica de producción de haploides, seguida de duplicación cromosómica, es posible llegar a homocigosis completa en una generación.

Poehlman y Sleper (2003), indican que las técnicas de biología molecular han avanzado rápidamente en el arroz en virtud de que este cultivo respondió de manera favorable al cultivo de anteras y la subsiguiente regeneración en una planta completa. Castañon (2010), refiere que es necesario e indispensable que se desarrollen nuevas tecnologías con las cuales en corto tiempo se generen más y mejores variedades.

Cultivo de Tejidos

Camarena, Chura y Blas (2012), refieren que esta técnica consiste en colocar un trozo de tejido, órgano o embrión, llamado “explante”, en medios artificiales y en condiciones ambientales determinadas para regenerar un individuo completo. Es una reproducción vegetativa, pero utilizando minúsculos propágulos (idealmente una sola célula) en lugar de esquejes, estacas, rizomas, yemas injertadas, entre otras. Este concepto parte de la teoría de totipotencia planteado por Schwann & Schleiden, fue de hecho el núcleo del que nació el cultivo de tejidos y células. Los primeros intentos hechos por Haberlandt en 1902, sobre cultivo de tejidos fracasaron, debido a que utilizó un medio de cultivo relativamente simple y por otra parte, tejidos vegetales demasiado diferenciados. En 1939 consiguieron el primer cultivo de tejidos auténtico. Después de la segunda guerra mundial el desarrollo en este campo ha sido muy rápido.

INIA (2005), señala que existen varias aplicaciones de esta técnica, entre las cuales se pueden señalar las siguientes: propagación clonal, cultivo de embriones, obtención de haploides, criopreservación, suspensiones celulares, fusión de protoplastos, entre otras.

El cultivo de tejidos es importante no solo porque es el área de la Biotecnología que tiene actualmente mayor aplicación práctica en la agricultura, sino por ser una herramienta versátil para el estudio de los problemas básicos y aplicados de la biología de las plantas; constituye, en efecto el puente necesario para llevar las manipulaciones genéticas desde el laboratorio hasta el campo Camarena, Chura y Blas (2012).

Cultivo de anteras

Los últimos avances en el cultivo de anteras ofrecen nuevas posibilidades para la aplicación de esta técnica en los programas de fitomejoramiento. Mediante el cultivo de anteras se han regenerado plantas haploides de especies

de los géneros *Solanum*, *Petunia*, *Nicotiana*, *Triticum* (CIAT, 1991). El cultivo de anteras se define como la manipulación “*in vitro*” de los granos de polen inmaduros, para evitar el desarrollo gametofítico e inducir el desarrollo esporofítico con el propósito de obtener plántulas diploides (CIAT, 1994; Poehlman y Sleper, 2003).

En estudios realizados en el cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) por INTA (2005), señalan que para la obtención de un nuevo cultivar de trigo a través de métodos tradicionales son necesarios aproximadamente 10 años. A diferencia de esta herramienta biotecnológica que permite reducir hasta en 5 años la liberación al mercado de una nueva variedad. Al aplicar esta técnica se obtienen líneas homocigóticas en solo 8 o 9 meses.

De acuerdo con Lentini, Martínez y Roca (1997), señalan que uno de los primeros en regenerar plantas a partir del cultivo de anteras fueron Niizeki y Oono en 1968, además, indican que la primera variedad desarrollada con cultivo de anteras liberó en 1975 y, desde entonces, se han desarrollado más de 100 cultivares a nivel mundial.

Hay varios factores que afectan el cultivo de anteras en arroz entre ellos: el estado de desarrollo de los granos de polen, los tratamientos físicos y el medio de cultivo.

CIAT (1991), menciona que en general los cereales se caracterizan por una baja eficiencia en cuanto a la producción de callos y a la regeneración de las plantas verdes.

Proceso de cultivo de anteras en arroz

Desde la perspectiva experimental mencionan Lentini, Martínez y Roca (1997), que el cultivo de anteras consiste básicamente en colocar las anteras, que son las que contienen los granos de polen inmaduros, en un ambiente que sea estéril y pueda mantenerse en esa condición, y proveerlas de sustancias

químicas, luz y temperatura apropiados para el desarrollo del callo y posteriormente la diferenciación de plantas. El CIAT (1994), señala que este proceso ocurre a través de la formación de un tejido no diferenciado (callo) que culmina en la formación de embriones o plantas, fenómeno conocido como androgénesis.

2.4. Citometría de flujo

Para Loureiro (2009), esta técnica se desarrolla en la década de los 50's y da sus primeros pasos a inicios de los 80's; por la necesidad de los investigadores de esa época de conocer las potencialidades de la citometría de flujo. Estable, señala que un citómetro de flujo es un instrumento complejo ya que combina avanzados conocimientos de dinámica de fluidos (que permite alinear las células en la columna líquida para su análisis), iluminación LASER, óptica (que permite obtener y recoger la información celular) y de procesamiento electrónico y computacional de las señales celulares. La integración de todos estos elementos torna a los citómetros de flujo.

La citometría de flujo de acuerdo con Laguado (2007), es un método automatizado, multiparamétrico y cuantitativo que analiza las señales dispersadas y fluorescentes producidas por una célula al pasar por un haz de luz. La idea antes mencionada coincide con Ramírez (2004); Cires y Cuesta, (2011) al acotar que la citometría de flujo representa un método rápido, objetivo y cuantitativo de análisis de células, núcleos, cromosomas, mitocondrias u otras partículas en suspensión con que se obtienen los resultados, además del poco tiempo en la preparación de las muestras señaladas. En biotecnología vegetal, la citometría de flujo es una de las herramientas utilizadas para analizar la estabilidad genética a través del nivel de ploidía de los cultivos *in vitro* y de las plantas obtenidas señala Loureiro (2009).

Cires y Cuesta, (2011), indican que se trata de un método “no destructivo” porque solamente se necesitan unos pocos miligramos de tejido, obteniendo una gran cantidad de núcleos que pueden ser medidos en poco tiempo.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación geográfica

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Biotecnología de la Estación Experimental Litoral Sur (E.E.L.S) del Instituto Nacional Autónomo de Investigaciones Agropecuarias (INIAP). Está ubicada entre las coordenadas geográficas 2° 15' 06,9'' latitud Sur y 79° 38' 40,7'' de longitud Occidental¹, en el km 26 al este de Guayaquil en la vía Durán – Tambo, parroquia Virgen de Fátima, cantón Yaguachi, provincia del Guayas, a 17 msnm, precipitación promedio anual de 1398,0 mm, 83% de humedad relativa media, y temperatura promedio anual de 24,6 °C.²

3.2. Material Vegetal

Se utilizaron anteras de 10 poblaciones segregantes F1 proporcionadas por el Programa de Arroz del INIAP Estación Experimental Litoral Sur, las mismas que fueron obtenidas mediante hibridación simple, y se describen en el Cuadro 1. Estas líneas y variedades proceden de cruzamientos realizados por INIAP (especie índica); FLAR (especie índica); FEDEARROZ (especie índica); JAPON (especie japónica) y se encuentran en el banco de germoplasma de dicho programa. Las características agronómicas y fitosanitarias de los materiales estudiados se detallan en el Cuadro 2.

¹ <https://maps.google.com/>

² <http://www.iniap.gob.ec/>

Cuadro 1. Parentales de 10 poblaciones F1 utilizados para el cultivo de anteras EELS/UG, 2014

#	CRUCE
1	INIAP 16 X JAPÓN
2	INIAP 16 X FED-50
3	INIAP 14 X JAPÓN
4	INIAP 12 X GO38404
5	INIAP 12 X INIAP 16
6	GO38404 X FED-50
7	GO38404 X GO38063
8	GO38063 X INIAP 14
9	GO38242 X INIAP 16
10	FED-50 X GO38242

Cuadro 2. Características fenotípicas y sanitarias de los materiales genéticos utilizados. EELS/UG, 2014

PROGENITORES	FLORACIÓN (días)	CICLO VEGETATIVO (días)	ALTURA DE PLANTA (cm)	RENDIMIENTO (kg/ha)	VOLCAMIENTO ^{1/}	LONGITUD DEL GRANO DESCASCARADO	CENTRO BLANCO ^{3/}	ÍNDICE DE PILADA (%)	PUDRICIÓN DE VAINA ^{4/}	MANCHADO DE GRANO ^{5/}	HOJA BLANCA ^{6/}	PYRICULARIA ^{7/}
FED-50	108	140	127	6958	TF	L	P	61.34	MR	MR	MR	MR
GO-38063	83	118	116	5607	TF	EL	P	67	T	T	R	R
GO-38242	97	127	108	8460	TF	L	P	70	T	T	T	T
INIAP-12	60	95	100	5000	TF	EL	P	71	MS	MR	MS	R
INIAP-14	78	113	99	5800	TF	L	P	66	MR	MR	MR	MS
INIAP-16	71	106	93	5000	TF	EL	P	68	MS	T	T	T
JAPON*	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

* El germoplasma "JAPON" es un material introducido del exterior e identificado en INIAP con el nombre del país de origen, se desconoce sus características agronómicas con exactitud, sin embargo se la utilizó por conocerse que pertenece a la subespecie japónica, es decir, posee buena calidad de grano, altura baja y precocidad.

1/: TF= tallos fuertes sin volcamiento

2/: L= grano largo; EL= grano extra largo

3/: P= centro blanco pequeño; M= centro blanco mediano

4/, 5/, 6/, 7/: R= resistente; MR= medianamente resistente; T= tolerante; MT= medianamente tolerante; MS= medianamente susceptible.

3.3. Materiales de laboratorio, equipos y reactivos

Los materiales, equipos y reactivos utilizados para el cultivo de anteras en el cultivo de arroz se describen en el Cuadro 3.

Cuadro 3. Materiales, equipos y reactivos usados en el estudio del cultivo de anteras. EELS/UG, 2014

Materiales	Equipos	Reactivos
Macetas	Sorbona	NH ₄ NO ₃
Etiquetas	Potenciómetro	(NH ₄) ₂ SO ₄
Hojas para bisturí no. 10	Balanza analítica	KNO ₃
Mangos para bisturí	Plato agitador/calentador	KH ₂ PO ₄
Pinza mediana de punta gruesa	Autoclave simple	MgSO ₄ .7H ₂ O
Pinzas pequeña de punta fina	Cámara de flujo laminar	CaC ₁₂ .2H ₂ O
Papel filtro	Estereoscopio	H ₃ BO ₃
Caja petri grande	Estufa	MnSO ₄ .4H ₂ O
Papel toalla	Refrigerador	ZnSO ₄ .7H ₂ O
Papel aluminio	Microscopio	Na ₂ Mo O ₄ .2H ₂ O
Fundas para esterilizar grandes		CoC ₁₂ .6H ₂ O
Cinta adhesiva masking tape		CuSO ₄ .5H ₂ O
Tijeras		KI
Guantes de látex (s)		Na ₂ EDTA
Guantes de nitrilo (s)		FeSO ₄ .7H ₂ O
Mascarillas		Tiamina-HCl
Cobertores de zapatos estériles		Acido nicotínico
Bandejas plásticas		AIA (ácido indolacético)
Porta y cubre objetos		2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético)
Espátulas		AFA (ácido fenilacético)
Micropipetas de 100 – 1000 µl		ANA (ácido naftalenacético)
Pipeta graduada (1 ml)		Cinetina (6-furfurilaminopurina)
Vasos graduados (100, 250, 500, 1000 ml)		Sacarosa
Cajas plásticas (250 ml)		Maltosa
Probetas (5, 10, 25, 50, 100, 500, 1000 ml)		Phytigel
Erlenmeyer (125, 250, 500, 1000, 2000 ml)		Alcohol
Filtros 0,22 micras		Cloro

3.4. Manejo del ensayo

Selección de panículas para cultivo de anteras

La selección de las panículas se realizó a los 60 días después de la siembra, mismas que se colectaron en horas de la mañana (Figuras. 1A y 1B), de cada planta se tomaron de 5 a 10 inflorescencias (Fig. 1C); se debe considerar a más de la diferenciación floral, la distancia entre la hoja bandera y la aurícula, misma que debe ser entre 2 a 5 cm aproximadamente (Fig. 1D).



Figura 1. Selección de panícula de acuerdo a distancia entre hoja bandera y aurícula (A, B); colecta de 5 a 10 panículas por cruce (C); distancia entre hoja bandera y aurícula de 3 a 4 cm (D). EELS/UG, 2014.

Desinfección de panículas y flores para cultivo de anteras

Una vez colectadas las panículas, se llevaron a laboratorio donde se las desinfectó superficialmente con alcohol etílico a una concentración del 70%.

Antes de la siembra de anteras provenientes de las panículas colectadas se procedió de la siguiente manera: se abrió la vaina de la panícula y se extrajo la inflorescencia, tomándose de forma invertida para proceder a cortar la sección con flores óptimas para el cultivo de anteras con una tijera previamente esterilizada.

Siembra de anteras en medios de cultivo para la inducción de callos

Para la siembra se utilizaron envases plásticos en los cuales se vertió aproximadamente 25 mL de medio de cultivo para inducir callos. Se sembraron alrededor de 90 a 100 anteras por vaso teniendo en cuenta que de cada flor cayeron de dos a cuatro anteras.

Una vez seleccionadas las flores para la siembra, se procedió a realizar una pequeña incisión en la base de la misma para que de esta manera puedan caer las anteras en el medio de cultivo (Figuras 2A y 2B); realizada la incisión, se tomaron con una pinza mediana las flores por el extremo donde se golpeó el borde interior del vaso plástico que contenía el medio de cultivo (Fig. 2C). Estos vasos se sellaron con stretch film para evitar contaminación, luego se almacenaron en un cuarto oscuro a 24°C durante 60 días aproximadamente. En estas condiciones los granos de polen empezaron a dividirse mitóticamente hasta la formación de callos (Fig. 2D).

Debido a la poca disponibilidad de inflorescencias por cada cruzamiento, la cantidad de anteras sembradas fue variable (Anexo 1.)

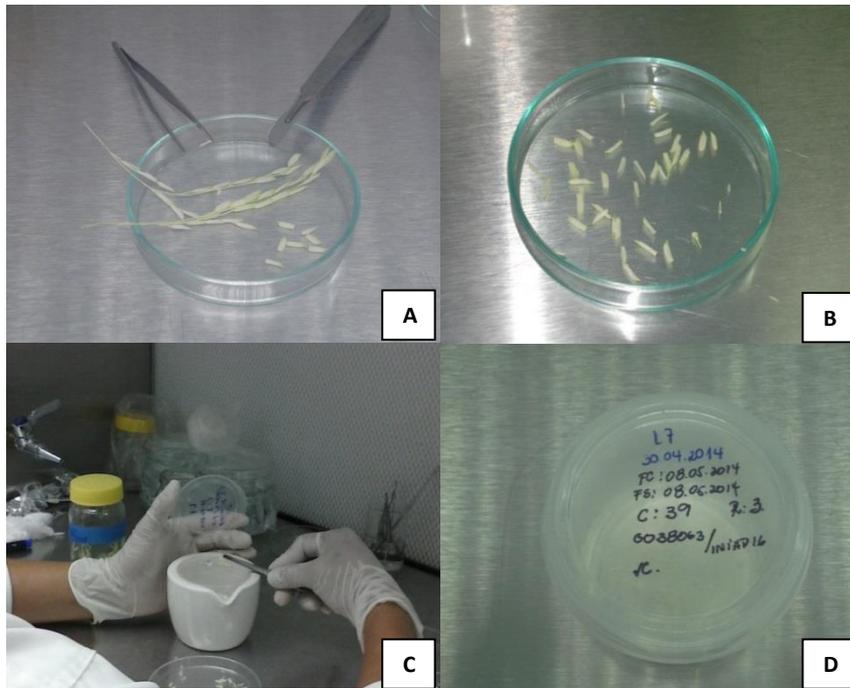


Figura 2. Selección de flores para la siembra de anteras (A); Flores de arroz seccionadas para ser sembradas (B); Siembra de anteras en medio de cultivo de inducción de callos (C); Envase plástico utilizado para la siembra de anteras de arroz (D). EELS/UG, 2014.

Transferencia de callos a medio de regeneración de plantas

La formación de callos se observó en aproximadamente dos meses de almacenamiento en oscuridad y a una temperatura de 24°C (Fig. 3A y 3B), en este período se comenzó la transferencia de los mismos a medios de cultivo para regeneración de plantas, dicho traspaso se lo realizó con pinzas cuello de cisne.

Durante el desarrollo de las plantas regeneradas, a éstas se las mantuvo a una temperatura de 25°C, colocadas en estanterías con luz tenue, por una semana, luego se las mantuvo con luz directa para proporcionar un fotoperiodo alrededor de alrededor de 10 horas/día (Fig. 3C).

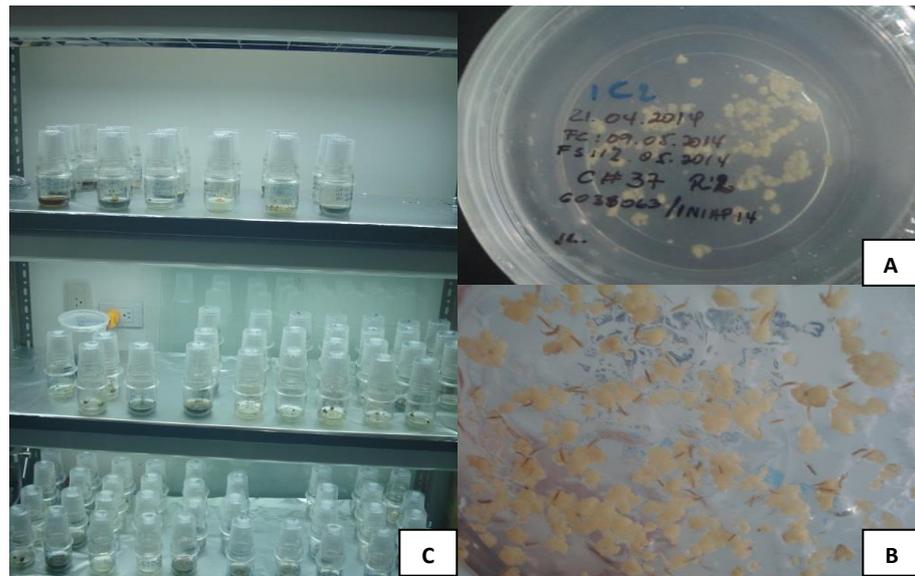


Figura 3. Fase de transferencia de callos para regeneración EELS/UG, 2014.

Aclimatación de plantas R1

Una vez que se obtuvieron las plantas regeneradas y habiendo desarrollado su sistema radicular y foliar (Figuras 4A y 4B), se las llevó a vivero donde se procedió a abrir el envase para su aclimatación al ambiente; se las mantuvo alrededor de uno a dos días (Fig. 4C). Al siguiente día se les retiró del medio de cultivo y se las dejó en agua potable por un día más finalmente se las trasplantó a macetas que contenían suelo de campo (Fig. 4D).

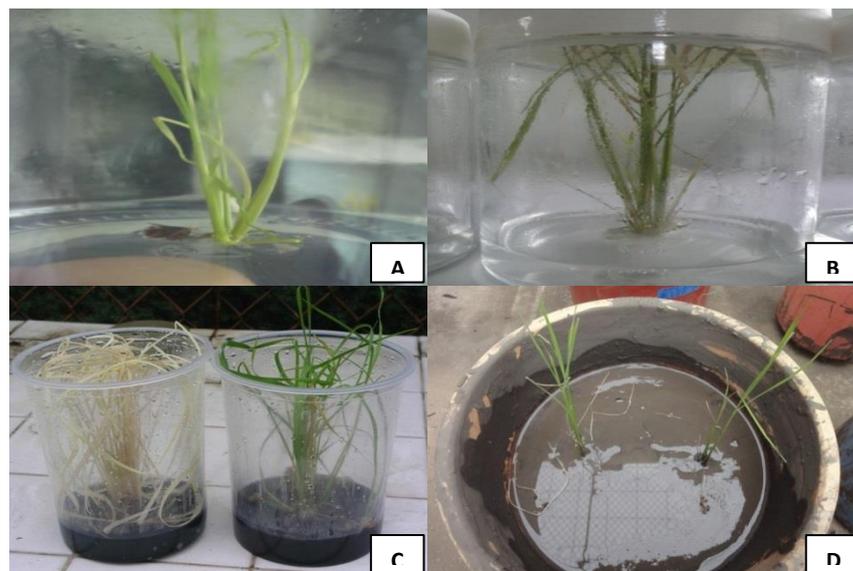


Figura 4. Plantas regeneradas a partir del ciclo androgénico (A,B); plantas en proceso de aclimatación en vivero (C); plantas trasplantadas a macetas con lodo (D). EELS/UG, 2014.

3.5. Variables estudiadas

Potencial callogénico

Para determinar el potencial callogénico del material en estudio, se procedió a promediar el número de callos formados de cada uno de los cruces estudiados y fueron transformados a porcentaje.

Diferenciación de órganos

Esta variable se registró la cantidad de callos sembrados por cruce y el número de callos que mostraron diferenciación de tejido (hojas, raíces).

Potencial de regeneración

En esta variable se tomó en cuenta el número de plantas regeneradas por cruce, luego se dividió para el número de callos sembrados.

Plantas verdes

Se realizó el conteo del número de plantas verdes regeneradas y se comparó con el número de callos diferenciados de cada material; los datos se expresaron en porcentaje.

Plantas albinas

Esta variable se obtuvo contando el número de plantas albinas regeneradas y comparándolas con el número de callos diferenciados de cada cruce.

Nivel de ploidía

Para determinar el nivel de ploidía se utilizó la técnica de Citometría de Flujo (CMF), siguiendo el protocolo del laboratorio de Biotecnología del INIAP Estación Experimental Litoral Sur, el cual consistió en tomar la muestra de tejidos foliares jóvenes de plantas de arroz, luego se procedió a triturarla y tratarla con el Kit para determinar ploidía. Para este propósito se usó un equipo.

3.6. Análisis estadístico

Debido a la naturaleza del ensayo, el análisis estadístico de las variables evaluadas se realizó mediante el uso de medidas de tendencia central y de dispersión así como gráficos.

IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Potencial callogénico

De acuerdo al número de anteras sembradas, mismas que fluctuaron entre 200 y 1200, se obtuvieron entre 1 y 148 callos (Anexo1).

El mayor potencial callogénico fue para el cruzamiento GO-30404 X GO-38063 con un 24.8 %, seguido de INIAP-12 X GO-38404 con 21.5 % y FEDEARROZ-50 X INIAP-12 con 12.3%; los de menor valor fueron INIAP-14 X GO-38404 con 0.4%, INIAP-12 X INIAP-14 con 1.7% (Figura 5).

La mayor cantidad de anteras sembrada fue 1200 correspondiente a los cruces GO38063/INIAP 14; INIAP 14/JAPON. De acuerdo con los resultados obtenidos se puede afirmar que los callos producidos no necesariamente dependen del mayor número de anteras sembradas; en contraste a lo mencionado por Lentini, Martínez y Roca (1997) quienes aseguran que el mayor número de callos producidos dependen de la mayor cantidad de anteras sembradas pasando las 10000.

Por otro, lado se puede acotar que la respuesta obtenida probablemente se deba a la constitución genética intrínseca propia de cada tratamiento, coincidiendo con lo mencionado por (Lentini, Martínez y Roca, 1997), quienes señalan que el genotipo es el factor que más influye en la frecuencia de anteras productoras de callos.

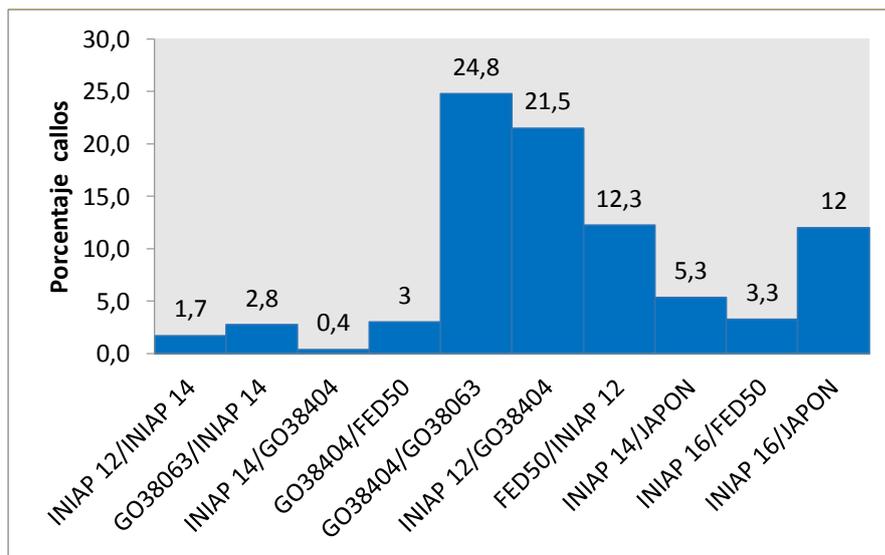


Figura 5. Porcentaje de potencial calogénico en el cultivo de anteras de 10 poblaciones F1 de arroz EELS/UG, 2014.

4.2. Diferenciación de órganos

Acorde al número de callos sembrados, los mismos que oscilaron entre 1 a 148, se obtuvieron de 2 a 3 callos diferenciados (Anexo 2).

El mayor porcentaje de diferenciación de callos se presentó en el cruce INIAP-16 X FEDEARROZ-50 con 23%; mientras que el menor porcentaje lo obtuvo el cruzamiento GO38063/INIAP-14 con 6% (Figura 6).

Los resultados obtenidos en la diferenciación de callos, especialmente en los tratamientos que no presentaron una respuesta favorable, probablemente se deba a la poca disponibilidad de ellos, a la constitución genética de cada cruce, así como al estado de desarrollo del polen. Esta idea concuerda con Cristo y González (2000), quienes en su trabajo de investigación observaron que no existe correspondencia entre la respuesta de los genotipos en cuanto a porcentaje de callos formados y el número de callos con brotes, y que puede estar dado por la capacidad embriogénica de los callos formados.

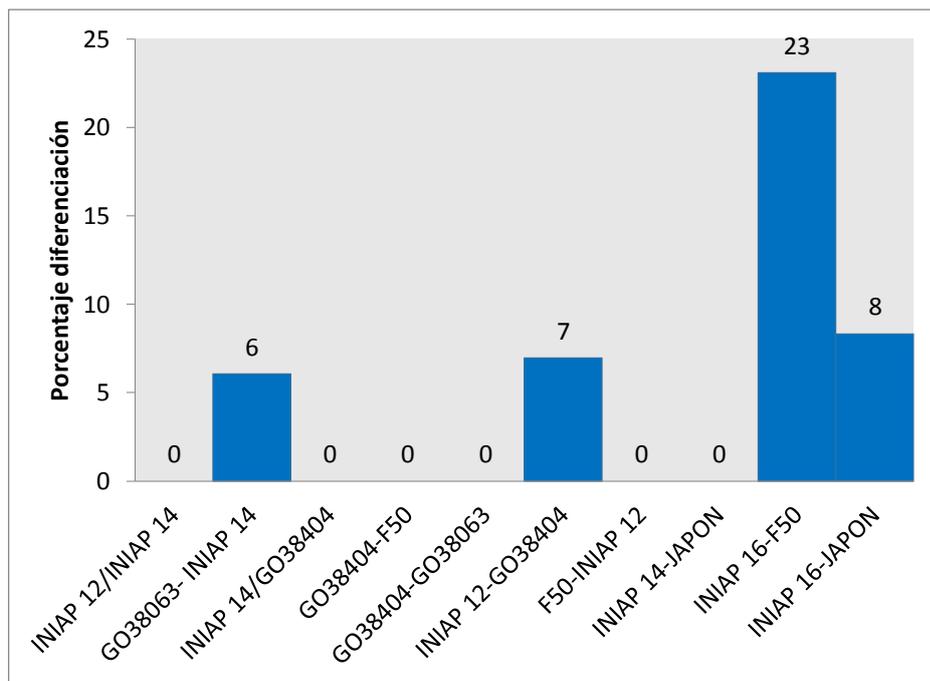


Figura 6. Diferenciación de callos transferidos a medios de regeneración de plantas, obtenido en 10 poblaciones F1 de arroz. EELS/UG, 2014.

4.3. Potencial de regeneración

Conforme al número de callos diferenciados, los cuales variaron entre 2 y 3, se obtuvo de 2 a 3 plantas, es decir un 100% de regeneración (Anexo 3).

El mayor número de plantas regeneradas fue para los genotipos INIAP-12 X GO38404 e INIAP-16 X FEDEARROZ-50 con 3 plantas regeneradas cada uno; los de menor número de plantas regeneradas fueron los tratamientos GO38063 X INIAP-14 e INIAP-16 X JAPON con 2 plantas cada uno (Figura 7).

Con los datos obtenidos, especialmente en el porcentaje de plantas regeneradas, se enfoca en los cruces donde no se presentó un resultado favorable, posiblemente sea por el medio de cultivo para regeneración de plantas que se utilizó, los componentes y concentraciones de los compuestos no eran los adecuados, además de las características genéticas de los tratamientos en estudio; resultados que coinciden con los ensayos realizados por Rahemi, Aref, Nourozi y Bagheri (2007), donde indican que para obtener regeneración de plantas a través de la androgénesis depende en gran parte de los

componentes de los medios de cultivo además de los genotipos. Con lo antes mencionado coincide Arana (2012), quien asegura que las probables causas para la poca regeneración de plantas son el genotipo y el medio de cultivo.

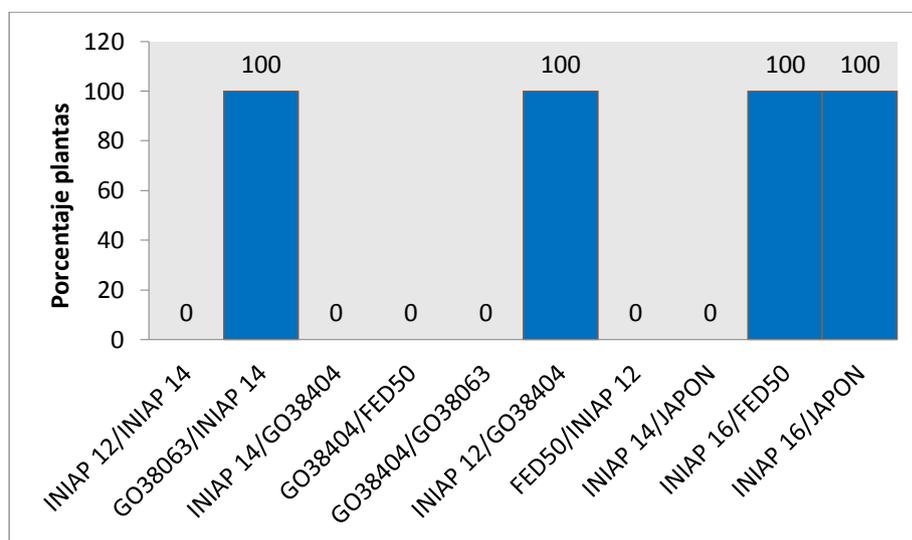


Figura 7. Porcentaje de regeneración de plantas *in vitro*, en 10 poblaciones F1 de arroz. EELS/UG, 2014.

4.4. Plantas verdes

De acuerdo al número de callos diferenciados, mismos que fluctuaron de dos a tres callos, se identificaron de uno a dos plantas verdes regeneradas (Anexo 3).

El mayor número de plantas verdes regeneradas fue para los tratamientos INIAP-12 X GO38404 e INIAP-16 X FEDEARROZ-50 equivalente a un 67%; el menor valor fue para el genotipo GO38063 X INIAP-14 con 50% (Figura 8).

En el presente trabajo el porcentaje de plantas verdes regeneradas se da en un promedio de 18,3 % de frecuencia, es decir que dos de cada 10 cultivares regeneraron plantas verdes. De acuerdo con trabajos de investigación realizados por Lentini, Martínez y Roca (1997), quienes mencionan que el genotipo es el factor que más influye en la proporción de plantas verdes y albinas.

Por otra parte, Velasquez, Artioli, Noguera y Marin (2010), señalan que la frecuencia de inducción de callos y regeneración de plantas de arroz a partir del cultivo de anteras para los genotipos que estudiaron fue altamente dependiente de los mismos.

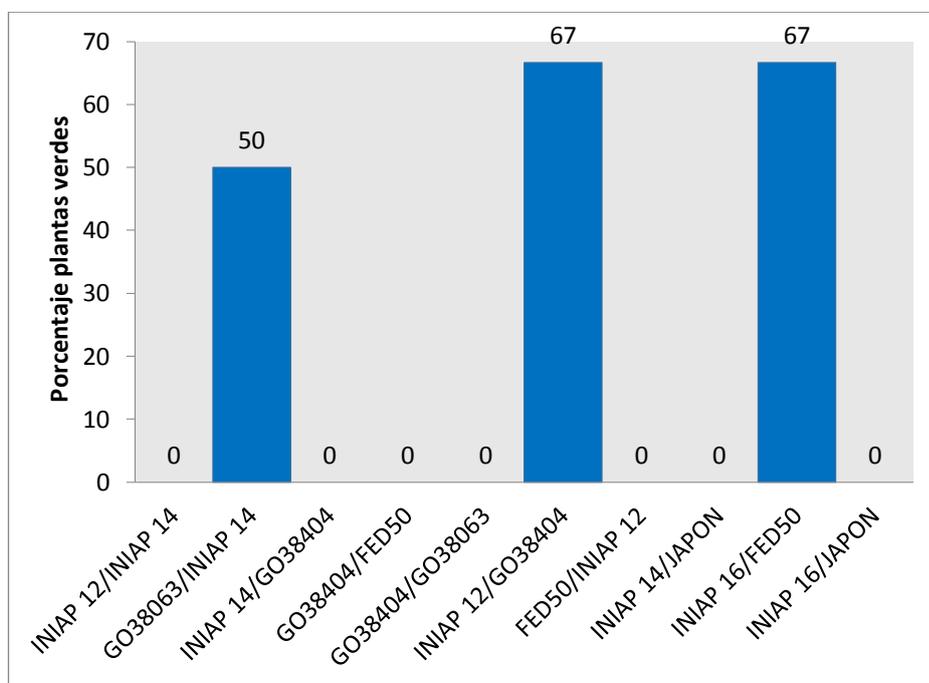


Figura 8. Porcentaje de plantas verdes regeneradas *in vitro*, de 10 poblaciones F1 de arroz. EELS/UG, 2014.

4.5. Plantas albinas

Acorde al número de callos diferenciados, mismos que fluctuaron de dos a tres, se obtuvieron entre uno a dos plantas albinas regeneradas (Anexo 5).

El mayor porcentaje de plantas albinas regeneradas, se dió en el cultivar INIAP-16 X JAPON con 100%, seguido de GO38063 X INIAP-14 con 50%; los de menor porcentaje fueron INIAP-12 X GO38404 e INIAP-16 X FEDEARROZ-50 con un 33% (Figura 9).

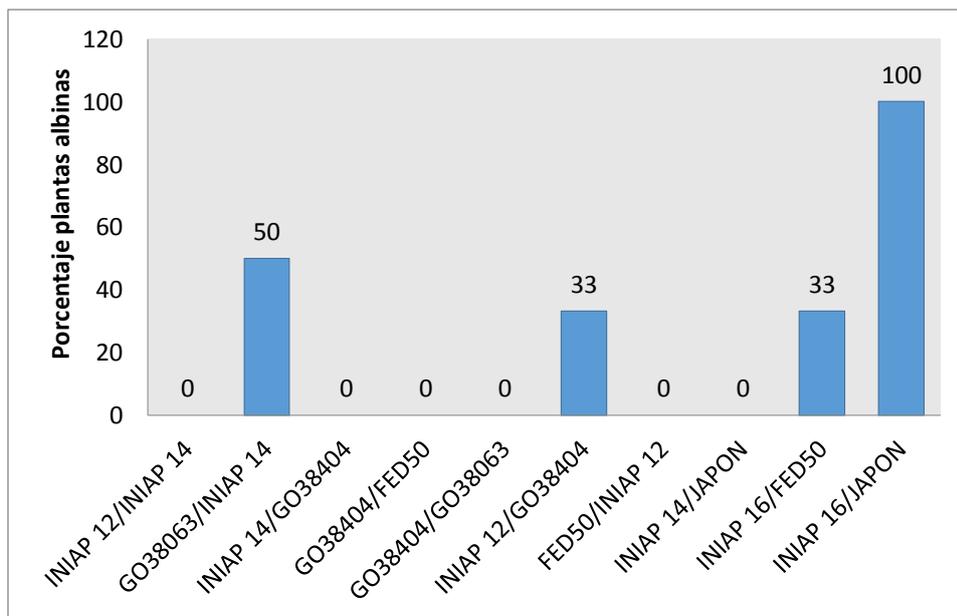


Figura 9. Valores de plantas albinas regeneradas *in vitro*, expresado en (%); a partir de 10 poblaciones F1 de arroz. EELS/UG, 2014.

De acuerdo a investigaciones realizadas por Mohiuddin Abul Kashem, Nilufer, Sultana y Ferdous (2011), mencionan que el alto porcentaje de plantas albinas en el uso de esta herramienta biotecnológica, se debe básicamente a la descomposición del ADN en los plastidios, núcleos o en ambos. Por otra parte Makowska y Oleszczuk (2013), señalan que el albinismo ocurre a menudo en plantas derivadas de la androgénesis incluyendo la mayoría de los cereales como: el trigo, centeno, avena y cebada. En la cebada Makowska y Oleszczuk (2013) cita a (Caredda *et al* 2000; Castillo *et al.*, 2000), quienes indican que la fracción de plantas albinas varía de 1 a 99,7% dependiendo de los genotipos, información que se corroboró en la presente investigación ya que la dominancia de las plantas albinas se ve más representativa en ejemplares de especie índica.

4.6. Nivel de ploidía

Se determinó que las plantas verdes regeneradas pertenecientes al cruce INIAP16/FED50, fueron plantas con un solo grupo de cromosomas (**n**); es decir haploides como se observa en la (Fig. 10). Cabe mencionar que las plantas verdes regeneradas de los cruces restantes no pudieron adaptarse a la fase de aclimatación, por tal motivo no se pudo realizar el respectivo análisis de ploidía.

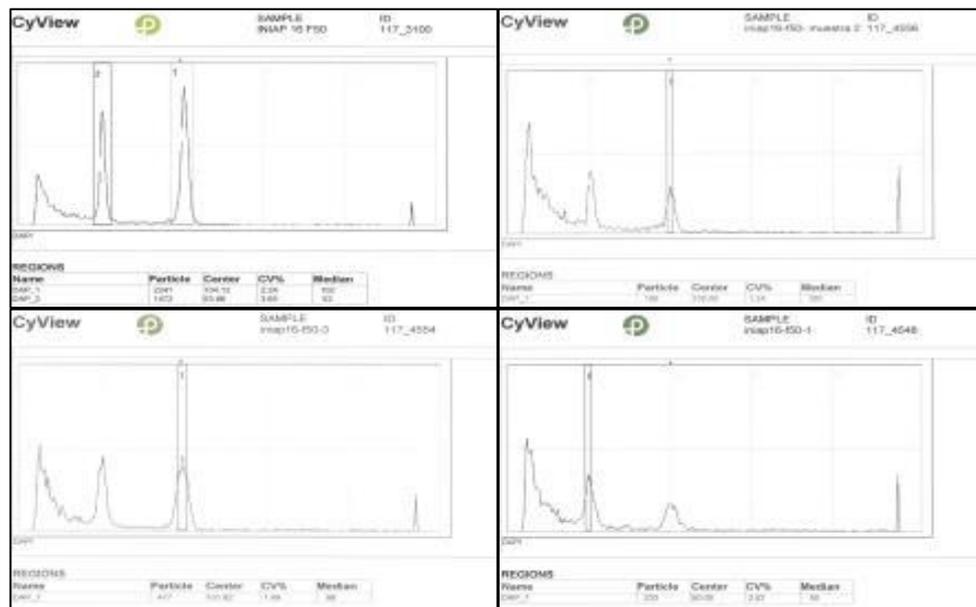


Figura 10. Análisis de ploidía, realizado a través del equipo marca PARTEC. EELS/UG, 2014.

V. CONCLUSIÓN

De los diez cruzamientos utilizados en esta investigación todos produjeron callos, es decir que la técnica de cultivo de anteras en arroz fue eficiente.

No se obtuvo plantas dihaploides, ya que muchas de las plantas regeneradas no pudieron adaptarse a la fase de aclimatación.

Se obtuvieron cinco plantas albinas regeneradas de los siguientes cruces: GO38063 X INIAP-14, INIAP-12 X GO38404, INIAP-16 X FEDEARROZ-50 e INIAP-16 X JAPON; igual número de plantas verdes en los siguientes cruzamientos: GO38063 X INIAP-14, INIAP 12 X GO38404 e INIAP-16 X FEDEARROZ-50.

Mediante el análisis de ploidía a través de la citometría de flujo, determinó que el tratamiento INIAP-16 X FEDEARROZ-50, fueron plantas haploides, es decir de un solo grupo de cromosomas.

VI. RECOMENDACIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en la presente investigación, se recomienda lo siguiente:

- Evaluar las poblaciones que mostraron mayor respuesta al cultivo de anteras en condiciones de campo.
- Ajustar protocolos relacionados a la regeneración y aclimatación de las plantas, con la finalidad de disminuir la pérdida de plantas.
- Continuar utilizando el cultivo de anteras y la citometría de flujo como herramientas biotecnológicas complementarias, para así contribuir con programas de mejoramiento genéticos de diferentes proyectos.

RESUMEN

La presente investigación estuvo dirigida a la obtención de plantas dihaploides de arroz a través del cultivo de anteras.

Los objetivos fueron: 1) Realizar el cultivo de anteras para obtener microcallos; 2) Obtener plántulas dihaploides en 10 poblaciones de arroz y 3) Determinar la ploidía de las estas poblaciones F1 mediante la técnica de citometría de flujo.

Se estudiaron diez poblaciones F1 de arroz, solo cuatro de éstas obtuvieron mayor respuesta a la inducción de callos (GO38404 X GO38063; INIAP-12 X GO38404; FEDEARROZ-50 X INIAP-12; INIAP-14 X JAPON), mientras que en la diferenciación de órganos resaltaron las poblaciones INIAP-16 X FEDEARROZ-50; INIAP-16 X GO38404; INIAP-12 X GO38404; GO38063 X INIAP-14.

En la regeneración de plantas, se obtuvieron los resultados esperados ya que de las diez poblaciones en estudio, cuatro regeneraron plantas (GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; INIAP-16 X JAPON). Los cultivares tipo indica, tuvieron mejor respuesta a esta herramienta biotecnológica. Además se obtuvieron cinco plantas verdes en los cultivares GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; mientras que se obtuvieron cinco plantas albinas en cuatro cultivares GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; INIAP-16 X JAPON.

La ploidía a través de la citometría de flujo, no se obtuvieron los resultados esperados, puesto que de los tres cultivares que regeneraron plantas verdes solo el cultivar INIAP-16 X FEDEARROZ-50 se adaptó a la fase de aclimatación, la constitución genética de este genotipo tuvo un grupo cromosomas haploide.

SUMMARY

This research was aimed at obtaining diploid rice plants through anther culture.

The objectives were: 1) Conduct anther culture for microcalli; 2) Obtain 10 diploid populations seedlings of rice and 3) determine the ploidy of these F1 populations by flow cytometry technique.

Ten F1 rice populations were studied, only four of them obtained more responsive to callus induction (GO38404 X GO38063; INIAP-12 X GO38404; INIAP FEDEARROZ-50 X-12, X JAPAN INIAP-14), while the organ differentiation highlighted the INIAP-16 X-50 FEDEARROZ populations; INIAP-16 X GO38404; INIAP-12 X GO38404; GO38063 X INIAP-14.

In regeneration plant, expected results and that of the ten populations under study, four regenerated plants (; INIAP-12 X GO38404; INIAP-16 X FEDEARROZ-50; INIAP-16 X JAPAN GO38063 X INIAP-14) were obtained . The type cultivars suggests, had best answer to this biotechnological tool. Further in five green plant regeneration plants were obtained in cultivars GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; FEDEARROZ INIAP-16 X-50; while five albino plants were obtained in four cultivars GO38063 X INIAP-14; INIAP-12 X GO38404; FEDEARROZ INIAP-16 X-50; INIAP-16 X JAPAN.

The ploidy by flow cytometry, the expected results were obtained, since the three cultivars regenerated green plants only grow INIAP-16 X FEDEARROZ-50 was adapted to the acclimatization phase, the genetic constitution of this genotype group had a haploid chromosomes.

LITERATURA CITADA

- Agropecuaria, D. d. (n/f de Agosto de 2003). Manual Técnico para el cultivo de Arroz. publicación técnica. Honduras.
- Arana, L. (2012). Cultivo in vitro de anteras en arroz (*Oryza sativa* L.), para inducir plantas doble haploides homocigóticas. Babahoyo.
- ASA. (s.f.). ASA. Obtenido de ASA:
<http://asabiotechnologia.com.ar/fitomejoramiento#>
- Camarena, F., Chura, J., y Blas, R. (2012). Mejoramiento Genético y Biotecnológico de plantas. Lima : Promotora Lima.
- Castañon, G. (2010). Biotecnología y el Mejoramiento genético vegetal. Kuxulkab, revista de divulgación, 15.
- CIAT. (1991). Cultivo de tejidos en la agricultura (fundamentos y aplicaciones). Cali, Colombia: CIAT.
- CIAT. (1994). Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras (aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas latinoamericanos y el caribe). Cali, Colombia: CIAT.
- Cires, E., y Cuesta, C. (2011). Una herramienta eficaz en el estudio de la Botánica: la citometría de flujo. Cuadernos de Biodiversidad, 19-25.
- Crestelo, E. (2006). Curso de capacitación en mejoramiento en arroz. Principios del mejoramiento genético en el arroz, (pág. 9). Cuba.
- Cristo, E., y González, M. (2000). Androgénesis in vitro en híbridos y variedades de arroz. Cultivos Tropicales, 21-22.
- Estable, I. d. (s.f.). IIBCE-SECIF. Recuperado el 18 de 11 de 2014, de Servicio de Clasificación Celular y Citometría de Flujo:
<http://www.iibce.edu.uy/SECIF/quees.htm>

- FAO. (1995). Biotecnología apropiable: racionalidad de su desarrollo y aplicación en america latina y el caribe. Santiago, Chile.
- Gilleta, F. (21 de Noviembre de 2001). Reflexiones sobre transgénicos vegetales. Recuperado el 26 de Mayo de 2014, de <http://www.eniacsoluciones.com.ar/terragni/doctrina/ttransgénicos.htm>
- INIA, I. D. (2005). Biotecnología Vegetal. Santiago, Chile: n/f.
- INIAP. (2007). Manual del Cultivo de Arroz.
- INIFAP. (2000). Manual para la producción de arroz en la región central de México. n/f, México: n/f.
- INTA. (2005). Obtencion de plantas haploides de cultivares argentinos de trigo de pan por cultivo de antera y cruzamiento con maíz. Revista de investigaciones agropecuarias, 151-176.
- Laguado, J. (Julio-Diciembre de 2007). Aplicaciones de la citometría de flujo en microbiología, veterinaria y agricultura. MVZ Córdoba, 1077-1093.
- Lentini, Z., Martínez, C., y Roca, W. (1997). Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Cali, Colombia: CIAT.
- Loureiro, J. (2009). Aplicación de la citometria de flujo en el estudio del genoma vegetal. Ecosistemas, 103-108.
- INEC. (2013). Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Recuperado el 20 de Diciembre de 2014, de www.ecuadorencifras.com
- Makowska, K., y Oleszczuk, S. (11 de Diciembre de 2013). Albinism in barley androgenesis. Plant cell reports, 385–392.
- Martínez, A. L. (2005). Caracterización de las proteínas de reserva y cultivo de anteras para el desarrollo de genotipos de arroz de alta calidad nutricional. Publicación Dpartamento de Biotecnología, INIFAP, 4.
- Mohiuddin Abul Kashem, K., Nilufer, H., Sultana, S., y Ferdous, Z. (22 de Mayo de 2011). Recovery of Green Plantlets from Albino Shoot Primordia Derived

from Anther Culture of Indica Rice (*Oryza sativa* L.). Tropical Life Science Research, 1-12.

Muñoz, C. (3 de Junio de 2011). Mejoramiento Genético: La Base del Desarrollo Agrícola . Recuperado el 23 de Mayo de 2014, de http://www.uchile.cl/documentos/presentacion-sr-carlos-munoz_72607_1.pdf

Nárvaez, L. (Mayo de 2007). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Obtenido de Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria: <http://agr.unne.edu.ar/fao/Nica-ppt/Narvaez-SELECCIoN.pdf>

Poehlman, J. M., y Sleper, D. A. (2003). Mejoramiento genético de las cosechas (SEGUNDA ed.). (G. Noriega, Ed., M. Guzmán Ortiz, & M. Hernandez Cuapio, Trads.) Balderas, México: Limusa, S.A.

Quintero, M. (2003). Ajuste del sistema RITA para la inducción de callo embriogénico y regeneración de plantas a partir del cultivo de anteras de arroz. Palmira, Colombia.

Rahemi, R. T., Aref, H., Nourozi, M., y Bagheri, N. (15 de Junio de 2007). In vitro plant regeneration through anther culture of some Iranian local rice (*Oryza sativa* L.) cultivars. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2056-60.

Ramírez, L. M. (2004). Citometría de flujo: Vínculo entre la Investigación Básica y la aplicación clínica. Revista del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias, 42-55.

Seguí, J., y Nuez, F. (2006). Ivia. Recuperado el 16 de Diciembre de 2014, de Ivia: <http://www.ivia.es/mejora2006/apdf/Solanaceas/019cultivoanterasSegui-Simarro%20y%20Nuez%2002.pdf>

Tariq, M., Ali, G., Hadi, F., Ahmad, S., Ali, N., y Shah, A. (15 de Enero de 2008). Callus induction and in vitro plant regeneration of rice (*Oryza sativa* L.) under various conditions. Pakistán journal of biological sciences, 255-259.

UJAT. (2002). La Biotecnología y el mejoramiento genético vegetal. Kuxulkab, 1-68.

Velasquez, R., Artioli, P., Noguera, A., y Marin, C. (23 de Abril de 2010). Regeneración de plantas de arroz (*Oryza sativa* L.) a partir de anteras de tres genotipos venezolanos. *Revista de Agronomía UCV*, 67-71.

Ventura, E. (2005). Caracterización de las proteínas de reserva y cultivo de anteras para el desarrollo de genotipos de arroz de alta calidad nutricional.

ANEXOS

Anexo 1. Número de anteras sembradas en medio de cultivo para inducción de callos (IC), número de callos obtenidos y potencial callogénico determinados en 10 poblaciones F1 de arroz. EELS/UG, 2014

No.	Cruce	Anteras sembradas	Callos producidos	Potencial callogénico (%)
1	INIAP 12/INIAP 14	232	4	1,7
2	GO38063/INIAP 14	1200	33	2,8
3	INIAP 14/GO38404	250	1	0,4
4	GO38404/FED50	200	6	3
5	GO38404/GO38063	597	148	24,8
6	INIAP 12/GO38404	200	43	21,5
7	FED50/INIAP 12	465	57	12,3
8	INIAP 14/JAPON	600	32	5,3
9	INIAP 16/FED50	400	13	3,3
10	INIAP 16/JAPON	200	24	12
	\bar{x}	434,4	36,1	8,7
	S	320	43,3	8,6

Anexo 2. Número de callos sembrados en medio de cultivo para regeneración de plantas (RP), número de callos, callos diferenciados, y potencial de diferenciación determinados en 10 poblaciones F1 de arroz. EELS/UG, 2014.

No.	Cruce	Numero de Callos	Callos diferenciados	Porcentaje de diferenciación (%)
1	INIAP 12/INIAP 14	4	0	0
2	GO38063/INIAP 14	33	2	6
3	INIAP 14/GO38404	1	0	0
4	GO38404/FED50	6	0	0
5	GO38404/GO38063	148	0	0
6	INIAP 12/GO38404	43	3	7
7	FED50/INIAP 12	57	0	0
8	INIAP 14/JAPON	32	0	0
9	INIAP 16/FED50	13	3	23
10	INIAP 16/JAPON	24	2	8
	\bar{x}	36,1	1	4,4
	S	43,31	---	---

Anexo 3. Número de plantas regeneradas (%), transferidas a medios de cultivo para regeneración, callos diferenciados, números de plantas. EELS/UG, 2014.

No.	Cruce	Callos Diferenciados	Número de plantas	Porcentaje de plantas regeneradas (%)
1	INIAP 12/INIAP 14	0	0	0
2	GO38063/INIAP 14	2	2	100
3	INIAP 14/GO38404	0	0	0
4	GO38404/FED50	0	0	0
5	GO38404/GO38063	0	0	0
6	INIAP 12/GO38404	3	3	100
7	FED50/INIAP 12	0	0	0
8	INIAP 14/JAPON	0	0	0
9	INIAP 16/FED50	3	3	100
10	INIAP 16/JAPON	2	2	100
	\bar{x}	1	1	40
	S	---	---	---

Anexo 4. Índice de plantas verdes regeneradas a partir de callos diferenciados, y número de callos transferidos a medio de cultivo para regeneración de planta. EELS-UG, 2014.

No.	Cruce	Callos diferenciados	Plantas verdes regeneradas	Porcentaje de plantas verdes regeneradas (%)
1	INIAP 12/INIAP 14	0	0	0
2	GO38063/INIAP 14	2	1	50
3	INIAP 14/GO38404	0	0	0
4	GO38404/FED50	0	0	0
5	GO38404/GO38063	0	0	0
6	INIAP 12/GO38404	3	2	67
7	FED50/INIAP 12	0	0	0
8	INIAP 14/JAPON	0	0	0
9	INIAP 16/FED50	3	2	67
10	INIAP 16/JAPON	2	0	0
	\bar{x}	1	0,5	18,3
	S	---	---	---

Anexo 5. Índice de plantas albinas regeneradas a partir de callos diferenciados, y número de callos transferidos a medio cultivo para regeneración. EELS/UG, 2014.

No.	Cruce	Callos diferenciados	Plantas albinas regeneradas	Porcentaje de plantas albinas regeneradas (%)
1	INIAP 12/INIAP 14	0	0	0
2	GO38063/INIAP 14	2	1	50
3	INIAP 14/GO38404	0	0	0
4	GO38404/FED50	0	0	0
5	GO38404/GO38063	0	0	0
6	INIAP 12/GO38404	3	1	33
7	FED50/INIAP 12	0	0	0
8	INIAP 14/JAPON	0	0	0
9	INIAP 16/FED50	3	1	33
10	INIAP 16/JAPON	2	2	100
	\bar{x}	1	0,5	21,7
	S	---	---	---

Anexo 6. Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo M1, para la inducción de callos. (Fuente: CIAT)

SOLUCIÓN	COMPONENTES	CANTIDAD (mg)	H ₂ O (mL)	SOLUCIÓN STOCK/LITRO DE MEDIO (mL)	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS
1	(NH ₄) ₂ SO ₄ KNO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O CaCl ₂ .2H ₂ O	2320 31340 1860 1500	1000	100	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración máximo un mes
2	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂ KI	25 600 1690 1000 2,5 1,4 100	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO ₄ .5H ₂ O se disuelve previamente en 1 mL de agua destilada y deionizada, de igual forma se disuelve CoCl ₂ antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
3	Tiamina-HCl Acido nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	125 125 125 125	50	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Cuando al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante 1 ó 2 meses, en refrigeración.
4	KH ₂ PO ₄	5400	100	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses.
5	Na ₂ EDTA Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	750 550	100	5	Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven por separado en agua destilada y deionizada, el Na ₂ EDTA y el Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O, en la cuarta parte del volumen final de la solución, al disolver el Na ₂ EDTA se debe calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agitan bien y se deja enfriar, para luego completar con el agua el volumen final. La solución se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente, donde puede mantenerse hasta por 5 meses.

6	2,4-D	50	100	4	La solución 2,4-D se prepara adicionando los 50 mg del compuesto a 5 mL de etanol de 50% calentado levemente al baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 100 mL, con agua previamente calentada a la misma temperatura. Almacenar en refrigeración.
7	AFA	100	100	10	Disolver 100 mg de AFA en 50 mL de agua destilada, calentar suavemente, ajustar el volumen final a 100 mL con agua destilada y filtrar utilizando filtros de 0,22 micras; debe hacerse en cámara con extractor de aire. Almacenar en refrigeración en frasco oscuro.
8	Cinetina	100	100	0,5	La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 100 mg del compuesto en aproximadamente 5 mL de HCl 0,5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 100 mL. Esta solución se divide en alícuotas de aproximadamente 10 mL cada una, para almacenar en el congelador a 0°C. Antes de usar cada alícuota se debe descongelar en baño de María, y el remanente se almacena a 4°C (refrigerador) por un máximo de 1 mes.

Preparación de 1 litro de medio M1 para inducción de callos:

1. Colocar 500 mL de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio
2. Adicionar las cantidades de las soluciones madres, siguiendo el mismo orden y con agitación continua; excepto el AFA.
3. Adicionar 80 g de maltosa
4. Completar el volumen a 1 litro
5. Ajustar el pH a 5,8
6. Esterilizar el medio en un autoclave a 122 °C de temperatura y 20 psi de presión, durante 15 minutos
7. Enfriar, adicionar el AFA en cámara (esterilizado con filtro 0,22 micras), dispensar y almacenar en refrigeración, donde puede permanecer hasta por 2 meses

Anexo 7. Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo L1, para la inducción de callos.

SOLUCIÓN	COMPONENTES	CANTIDAD (mg)	H ₂ O (mL)	SOLUCIÓN STOCK/LITRO DE MEDIO (mL)	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS
1	KNO ₃ NH ₄ NO ₃ KH ₂ PO ₄ MgSO ₄ .7H ₂ O	38000 33250 3400 7400	500	25	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 1 meses
2	MnSO ₄ .H ₂ O H ₃ BO ₃ Cu- SO ₄ .5H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O H ₂ MoO ₄ CoCl ₂	1690 620 50 1050 50 5	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO ₄ .5H ₂ O se disuelve previamente en 1 mL de agua destilada y deionizada, de igual forma se disuelve CoCl ₂ antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
3	Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O Na ₂ EDTA	278 374	100	10	Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven por separado en agua destilada y deionizada, el Na ₂ EDTA y el Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O, en la cuarta parte del volumen final de la solución. Al disolver el Na ₂ EDTA se debe calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agitan bien y se deja enfriar, para luego completar con el agua el volumen final. La solución se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente, donde puede mantenerse hasta por cinco meses.
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	1760	100	2,9	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por cinco meses.
5	KI	20	25	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por un meses

6	Acidonicotínico Piridoxina Thiamina Glicina Arginina Biotina	50 50 100 200 1,25 170	1000	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Cuando al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante uno ó dos meses, en refrigeración.
7	Acido Indol Acético	25	1000	2	La solución AIA se prepara adicionando los 25 mg del compuesto a 2.5 mL de etanol al 50% calentado levemente al baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 1000 mL, con agua previamente calentada a la misma temperatura. Almacenar en refrigeración.
8	Cinetina	25	100	2	La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 25 mg del compuesto en 1 mL de HCl 0.5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 100 mL. Almacenar en refrigeración.
9	2,4-D	25	25	1	La solución 2,4-D se prepara adicionando los 25 mg del compuesto a 2.5 mL de etanol al 50% calentado levemente al baño de María. Luego se ajusta el volumen final a 100 mL, con agua previamente calentada a la misma temperatura. Almacenar en refrigeración.

Preparación de 1 litro de medio MS para inducción de callos:

1. Colocar 500 mL de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio
2. Adicionar las cantidades de las soluciones madres, siguiendo el mismo orden y con agitación continua
3. Adicionar 100 mg de Myo-Inositol
4. Adicionar 50 mg de Acido Ascórbico
5. Adicionar 30 g de sacarosa
6. Adicionar 100 mL de agua de coco
7. Completar el volumen a 1 litro, Ajustar el pH a 5.8 y adicionar 3 g de Gellan Gum
8. Esterilizar el medio en un autoclave a 122 °C de temperatura y 20 psi de presión , durante 15 minutos
9. Dispensar en cámara de flujo, enfriar y almacenar en refrigeración, donde puede permanecer hasta por 2 meses

Anexo 8. Preparación y almacenamiento de soluciones stocks y medio de cultivo MS, para regeneración de plantas. (Fuente: CIAT)

SOLUCIÓN	COMPONENTES	CANTIDAD (mg)	H ₂ O (mL)	SOLUCIÓN STOCK/LITRO DE MEDIO (mL)	PREPARACIÓN Y ALMACENAMIENTO DE SOLUCIONES STOCKS
1	NH ₄ NO ₃ KNO ₃ MgSO ₄ .7H ₂ O KH ₂ PO ₄	82400 95200 18400 8400	1000	20	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 1 meses
2	Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O H ₃ BO ₃ MnSO ₄ .H ₂ O ZnSO ₄ .7H ₂ O CuSO ₄ .5H ₂ O CoCl ₂	25 620 1692 860 2.5 1.4	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO ₄ .5H ₂ O se disuelve previamente en 1 mL de agua destilada y deionizada, de igual forma se disuelve CoCl ₂ antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
3	KI	83	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
4	CaCl ₂ .2H ₂ O	1500	100	29	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses
5	Na ₂ EDTA Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O	750 550	100	5	Para preparar la solución fuente de hierro, se disuelven por separado en agua destilada y deionizada, el Na ₂ EDTA y el Fe ₂ SO ₄ .7H ₂ O, en la cuarta parte del volumen final de la solución. Al disolver el Na ₂ EDTA se debe calentar un poco en baño de María. Posteriormente se mezclan los dos volúmenes, se agitan bien y se deja enfriar, para luego completar con el agua el volumen final. La solución se debe envasar en un frasco oscuro, y se almacena a temperatura ambiente, donde puede mantenerse hasta por 5 meses
6	Tiamina-HCl Acid nicotínico Piridoxina-HCl Glicina	10 50 50 200	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Cuando al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien, se debe calentar ligeramente. Esta solución se puede guardar durante 1 ó 2 meses, en refrigeración.
7	myo-Inositol	5000	500	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 2 meses

8	ANA	200	200	1	La solución de ácido naftalenacético (ANA) se prepara disolviendo 200 mg del compuesto en aproximadamente 5 mL de KOH 0,5 N. Luego se calienta a temperatura baja hasta disolver y se completa con agua el volumen final a 200 mL. Es aconsejable preparar esta solución semanalmente.
9	Cinetina	500	500	4	La solución de Cinetina se prepara disolviendo los 500 mg del compuesto en aproximadamente 25 mL de HCl 0.5 N. Se calienta a baja temperatura hasta que se disuelva, y entonces se ajusta el volumen a 500 mL. Esta solución se divide en alícuotas de aproximadamente 10 mL cada una, para almacenar en el congelador a 0°C. Antes de usar cada alícuota se debe descongelar en baño de María, y el remanente se almacena a 4°C (refrigerador) por un máximo de 1 mes.

Preparación de 1 litro de medio MS para regeneración de plantas:

1. Colocar 500 mL de agua destilada y deionizada en el recipiente donde va a preparar el medio
2. Adicionar las cantidades de las soluciones madres, siguiendo el mismo orden y con agitación continua
3. Adicionar 30 g de sacarosa
4. Completar el volumen a 1 litro
5. Ajustar el pH a 5.8
6. Adicionar 3 g de Gellan Gum
7. Esterilizar en un autoclave a 122°C de temperatura y 20 psi de presión , durante 15 minutos
8. Dispensar en cámara de flujo, enfriar y almacenar en refrigeración, donde puede permanecer hasta por 2 meses