

# Evaluación *in vitro* de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L) para tolerancia a frío

## *In vitro* evaluation of rice genotypes (*Oryza sativa* L) for cold tolerance

Azul C. Courtis\*, María A. Marassi \*\*

### Resumen

En la Estación Experimental de Arroz, del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), en Corrientes Argentina Se evaluaron materiales internacionales de tolerancia al frío conocida y materiales promisorios de buen comportamiento agronomico. Los trabajos de evaluación *in vitro* se realizaron en la FCA - UNNE evaluando la formación de callos en tres medios diferentes líquidos: N<sub>6-1</sub>, N<sub>6-m</sub> y NL, así como la regeneración de plantas verdes y albinas, en el medio MS. Las dos primeras generaciones de las nuevas líneas obtenidas fueron evaluadas para caracteres agronómicos y la segunda generación, además, para resistencia frente a la Piriculariosis. Las líneas que combinaron resistencia a la Piriculariosis y buenos caracteres agronómicos fueron evaluadas en condiciones de infección natural, con alta presión del patógeno. La utilización de la técnica del cultivo de anteras mostró alta dependencia del genotipo y el medio de cultivo. Con el medio NL se lograron los valores más altos para la formación de callos. Se obtuvieron nuevos genotipos resistentes a la Piriculariosis y de alto rendimiento agrícola.

**Palabras clave:** Arroz, Mejoramiento genético, Cultivo *in Vitro*

### Abstract

Rice genotypes were selected from the international tolerance genotypes and six rice varieties of good agronomic performance, at Rice Research Station of the National Agricultural Technologies Institute (INTA) and the *in vitro* culture of F<sub>2</sub> plants were *in vitro* culture using three liquid media: N<sub>6-1</sub>, N<sub>6-m</sub>, and NL, for callus formation and after plants regenerations using MS medium. The first two generations of breeding lines were evaluated for agronomic characters and the second generations, also, for Blast resistant. The lines that combined resistance to Blast and good agronomic performance were evaluated under high pressure of natural Blast infection conditions. The success rate of anther culture was highly dependent on the genotype and culture media used. NL medium led to the highest callus formation values. In the process, new blast resistant and high yielding genotypes were obtained.

**Key words:** Rice, Rice Breeding, *In vitro* culture

**Recibido:** enero 20 de 2015

**Aprobado:** junio 19 de 2015

\* Trabajo final de graduación - FaCENA - Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes - Argentina accourtis@hotmail.com

\*\* Jefe de Trabajos prácticos - Fisiología Vegetal - FCA - Universidad Nacional del Nordeste, Corrientes - Argentina

## Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales de mayor producción a nivel mundial, ocupa el segundo lugar en superficie cosechada, pero desde el punto de vista alimenticio una mayor cantidad de población depende de él (Tan *et al.*, 2001 y Álvarez *et al.*, 2008). En Cuba, constituye unas de las principales fuentes de carbohidratos en la alimentación de la población pero la producción nacional no satisface esas necesidades (Madruga 2004) debido a la obtención de muy bajos rendimientos motivado por diferentes causas, entre las que se encuentra un extenso grupo de agentes infecciosos que causan enfermedades (Cordero y Rivero 2001).

El hongo *Magnaporthe grisea* Barr (*Pyricularia grisea* Sacc) produce la más devastadora enfermedad del arroz a nivel mundial, debido a su amplia distribución y las graves pérdidas económicas que ocasiona (Castejón-Muñoz 2008), constituyendo el desarrollo de variedades resistentes la vía más económica para su control y con menor impacto ambiental (Zambrano *et al.*, 2006).

Por su parte, en todo programa de mejora para resistencia a enfermedades, se necesita conocer la fuente de resistencia genética, establecer las condiciones idóneas de infección del patógeno, con el fin de garantizar una efectiva selección y escoger el método adecuado. Dentro de ellos, el cultivo *in vitro* de anteras de plantas  $F_2$  presenta numerosas ventajas, ya que la población proveniente de esta combinación de métodos de mejora (hibridaciones y cultivo *in vitro*), representa la variabilidad genética de la población  $F_2$  y las plantas obtenidas *in vitro* son genéticamente homocigóticas. Esto reduce el tiempo para la obtención de los nuevos cultivares, ahorra recursos financieros y materiales y se aumenta la eficiencia de la selección, facilitando la identificación de individuos superiores (Pérez-Almeida 2004; Jiang *et al.*, 2004; Ramakrishnan *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2006).

Teniendo en cuenta estos antecedentes y conociendo que en Cuba las variedades comerciales de arroz son de tipo indica, conocidas por ser más recalcitrantes al cultivo de tejidos (Saharan *et al.*, 2004) se llevó a cabo este trabajo cuyo objetivo fue obtener genotipos de arroz tolerantes a la Piriculariosis con la utilización del cultivo *in vitro* de anteras de plantas  $F_2$ , procedentes de cruces en los que intervienen variedades con cierto grado de resistencia al hongo, así como la evaluación de 3 medios de cultivo para mejorar la eficiencia en el proceso de mejoramiento.

## Materiales y métodos

En la Estación Experimental del Arroz, ubicada en Los Palacios y perteneciente al Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, se realizaron cruzamientos entre cultivares resistentes a la Piriculariosis y cultivares de buen comportamiento agrícola (tabla 1) y cada cultivar de buen comportamiento agrícola fue empleado como parental materno y paterno, con los cultivares resistentes, para posteriormente utilizar la progenie en el cultivo *in vitro* de anteras.

### Cultivo *in vitro*

En el laboratorio de cultivo de tejidos, de las mejores plantas  $F_2$  por cada cruce, teniendo en cuenta el vigor y su estado fitosanitario, entre los 60 - 70 días de edad, se seleccionaron de dos a tres panículas, que poseían una distancia de 4 - 8 cm entre las aurículas de las dos últimas hojas, a las que se les conservó el entrenudo y la vaina de la hoja para protegerlas de la contaminación con patógenos del campo. Posteriormente fueron desinfectadas y sembradas *in vitro*, según la metodología propuesta por Lentini *et al.* (1995).

Se utilizaron 3 medios líquidos (tabla 2) para la inducción de callos a partir del polen inmaduro:  $N_{6-1}$ , (MeiFang 1992) y  $N_{6-m}$  y NL (Lentini *et al.*, 1995) y de 3 a 10 frascos por réplica, dependiendo de la disponibilidad de anteras y 3 réplicas por cada medio. Después de la siembra, los frascos se mantuvieron en ausencia de luz de 30 a 60 días, hasta la formación de los micro callos. Se evaluó la cantidad de anteras que formaron callos.

Los callos de 1-2 mm de diámetro (10 callos por frasco, replicados hasta 10 veces, dependiendo de su disponibilidad) fueron transferidos a un medio MS (Murashige y Skoog, 1962) suplementado con  $1\text{mg.L}^{-1}$  de ANA,  $2\text{mg.L}^{-1}$  de AIA,  $4\text{mg.L}^{-1}$  de Kinetina,  $30\text{g.L}^{-1}$  de sacarosa y solidificado con  $7\text{g.L}^{-1}$  de Phytigel. Los frascos fueron incubados a  $26\pm 2^\circ\text{C}$  con un fotoperiodo de 16 horas luz y entre los 30 y 40 días se evaluó la regeneración de plantas verdes y albinas.

El diseño estadístico empleado fue un bloque completamente aleatorio, los datos obtenidos fueron procesados mediante análisis de varianza simple y las medias comparadas con la prueba de Duncan al 5%, además fueron procesados mediante análisis de componentes principales. Para el procesamiento automatizado de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.0 sobre Windows.

### Evaluación de los regenerantes obtenidos

Cuando las plantas alcanzaron suficiente desarrollo foliar y radical, se retiraron del frasco y se sumergieron en agua por varios días, luego se trasplantaron a bandejas, donde permanecieron a temperatura ambiente

y protegidas del sol, después de 15 días se pasaron a la luz directa y a las 3 semanas se trasplantaron al campo, donde recibieron el manejo apropiado del cultivo, según los instructivos técnicos (MINAG 2005).

**Tabla 1.** Variedades y líneas utilizadas como progenitores y su procedencia.

Variedades y líneas	Progenitores	Objetivo	Origen
6066	IR1529-430 / IR 759-54-2-2	Variedades de buen comportamiento agronómico	Cuba
Amistad'82	IR 1529-430 / Vniir 3223		Cuba - URSS
CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub>	Cica 4 / IR 24		Cuba
IR 1529-430	Sigadis / TN 1 // IR 24		Filipinas
INCA LP-1	J-104 / Amistad'82		Cuba
INCA LP-6	2077 / CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub>		Cuba
2077	Cica 9 / BG 90 // Cica 7	Variedades resistentes a Frio	Colombia
IR 759-54-2-2	IR 8 / Peta 3 // Dawn		Filipinas
Moroberekan	Desconocido		Guinea
Tetep	Desconocido		Viet Nam

En el momento de la cosecha, las plantas fueron evaluadas morfológicamente para asociarlas de manera visual con su nivel de ploidía. Posteriormente, a 142 líneas isogénicas fértiles obtenidas (supuestamente diploides), provenientes de 14 cruces (tabla 3), se les evaluó la altura final, el número de panículas por planta, la longitud de la panícula, el número de granos llenos por panícula, el peso de 1000 granos y el largo y ancho del grano y los datos obtenidos fueron procesados mediante análisis de componentes principales, además se determinaron valores máximo y mínimo, la media, error estándar y coeficiente de variación. Para el procesamiento automatizado de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.0 sobre windows.

### Evaluación de la segunda generación

Las semillas obtenidas, de las plantas cosechadas de la primera generación de líneas isogénicas, fueron sembradas en campo a chorrillo en surcos de 5 m de largo, para realizar las pruebas de uniformidad. A cada línea isogénica (surco) se le evaluó el ciclo y en 1m lineal, el rendimiento agrícola y el número de panículas. La altura final fue medida a 20 plantas y, en 20 panículas tomadas al azar, se contaron los granos llenos por panícula, el peso de 1000 granos, la longitud de la

panícula, el largo y ancho del grano. Los datos obtenidos fueron sometidos a análisis multivariado de clasificación automática (Cluster) (Varela 1998). Para el procesamiento automatizado de los datos se utilizó el paquete estadístico SPSS versión 11.0 sobre windows.

Las evaluaciones frente a la Piriculariosis se realizaron bajo infección natural en campo, en las hojas, en la fase vegetativa y en el cuello de la panícula, en la fase reproductiva, de acuerdo con las escalas propuestas por el IRRI (2002).

### Evaluación de las mejores líneas obtenidas frente a la incidencia de la Piriculariosis en canteros de infección

En la Granja Caribe, perteneciente al CAI Arrocero "Los Palacios", se sembraron en el mes de marzo, durante cuatro años, sobre un suelo Gley Nodular Ferralítico Concrecionario (Hernández *et al.*, 1999), las mejores líneas obtenidas por cultivo de anteras (aquellas que combinaron alto rendimiento agrícola y resistencia a la Piriculariosis), los cultivares resistentes: Moroberekan, Tetep, IR 759-54-2-2 y 2077 y el cultivar susceptible J-104. Se utilizó la metodología de campo propuesta por el Centro Internacional de Agricultura Tropical y validada en Cuba por Cárdenas *et al.*, (2000), la cual

propone realizar los ensayos de selección para la resistencia a la enfermedad en un sitio “hot spot”, que presente una alta incidencia de la enfermedad, favorecida por condiciones ambientales y una alta diversidad del patógeno *P. grisea*.

**Tabla 2.** Composición de los medios de cultivo utilizados para la inducción de callos

Medios	Composición (mg.l <sup>-1</sup> )		
	N <sub>6-1</sub>	N <sub>6m</sub>	NL
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463,0	231.5	231.5
KNO <sub>3</sub>	2830,0	2830,0	3134,0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400,0	540,0	540,0
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	185,0	3.7	185,0
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	166,0	166,0	150,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1,6	1.6	6.2
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	4,0	4.4	22.3
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1,5	1.5	8.6
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25		0.25
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,25		0,025
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,25		0,025
KI	0,8	0.83	0.83
Na <sub>2</sub> EDTA	37,3	37.3	37.3
Fe SO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	27.8	27.8
Mioinositol	1,0		
Tiamina	0,1	1,0	2.5
Acido nicotínico	0,5	0.5	2.5
Piridoxina	0,5	0.5	2.5
Glicina	2,0	2,0	2.5
2,4 D	2,0	2,0	2,0
Picloramo		0.07	0.07
ANA	1,5		
Kinetina	1,0	0.5	0.5
Lactoalbumina hidrolizada	500,0		
AgNO <sub>3</sub>			10,0
Sacarosa (g/L)	50,0	50,0	
Maltosa (g/L)			50,0

**Tabla 3.** Regenerantes evaluados por cruce, con características morfológicas similares a los diploides.

No.	Cruce	Líneas evaluadas
1	Amistad´82 / 2077	20
2	2077 / Amistad´82	17
3	Amistad´82 / IR 759-54-2-2	15
4	Moroberekan / Amistad´82	6
5	IR759-54-2-2 / INCA LP-6	12
6	INCA LP-6 / Moroberekan	10
7	Tetep / INCA LP-6	6
8	IR75954-2-2 / 6066	16
9	6066 / IR759-54-2-2	8
10	2077 / INCA LP-1	9
11	Tetep / INCA LP-1	6
12	INCA LP-1 / Tetep	6
13	IR 1529-430 / IR 759-54-2-2	6
14	2077 / CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub>	5

Se estimó el porcentaje de área foliar afectada (% AFA) por la Piriculariosis en 10 plantas por línea, durante la fase vegetativa, entre 25 y 35 días después de la germinación y, en la fase reproductiva, se evaluaron los porcentajes de cuellos dañados y se determinó la resistencia de las variedades de acuerdo con las escalas propuesta por el IRRI (2002). Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza de clasificación simple y las medias se docimaron según la prueba de rangos múltiples de Duncan al 5% de probabilidad de error.

## Resultados y discusión

### Cultivo in vitro

Con la utilización de la técnica del cultivo **in vitro** se observó una respuesta diferenciada para los diferentes cruces empleados, ya que no todos los híbridos fueron capaces de formar callos y los que tuvieron éxito, no lo hicieron en igual magnitud. La frecuencia de anteras que formaron callos, como se aprecia en la tabla 4, osciló entre 0 y 55.3 %, dependiendo del genotipo y el medio de cultivo.

El valor máximo fue alcanzado por Amistad´82 / 2077 en el medio NL (55.3 callos por 100 anteras sembradas), seguido de este mismo cruce en el medio N<sub>6m</sub> (44,6) y el cruce Amistad´82 / IR 759-54-2-2 también en el medio NL (43,2).

**Tabla 4.** Formación de callos y regeneración de plantas verdes y albinas por 100 anteras sembradas

	Callos						Plantas			
	N6-1		N6m		NL		Verdes		Albinas	
Amistad'82 / 2077	33,0	a*	44,6	a	55,3	a	22,6	A	20,4	ab
2077 / Amistad'82	23,1	c	14,6	c	36,1	c	14,4	B	10,8	de
Amistad'82 / IR 759-54-2-2	28,6	b	37,2	b	43,2	b	12,7	Bc	8,3	def
IR 759-54-2-2 / Amistad'82	0,7	ij	0,3	j	0,0	l	0,3	J	0,0	g
Amistad'82 / Tetep	0,9	hij	1,5	ij	2,5	jkl	2,3	Hij	0,4	g
Moroberekan / Amistad'82	4,8	defg	6,6	ef	4,3	ijk	4,2	Gh	6,8	efg
2077 / INCA LP-1	6,2	de	9,0	d	7,5	fgh	6,7	Efg	24,0	a
INCA LP1 / IR 759-54-2-2	0,2	j	0,0	j	0,0	l	0,0	J	0,3	g
INCA LP1 / Tetep	5,1	defg	10,3	d	15,2	d	3,6	H	17,0	bc
Tetep / INCA LP 1	4,4	defgh	5,7	efg	8,3	efg	4,8	Gh	8,7	def
INCA LP-1 / Moroberekan	1,6	fghij	3,4	ghi	4,8	hijk	2,5	Hij	1,6	g
Moroberekan / INCA LP-1	5,6	de	6,3	ef	7,5	fgh	0,0	J	0,0	g
IR 759-54-2-2 / INCA LP-6	5,0	defg	0,0	j	2,4	jkl	14,4	B	4,1	fg
INCA LP-6 / Tetep	0,7	ij	3,2	hi	0,0	l	0,2	J	0,1	g
Tetep / INCA LP-6	0,9	hij	0,0	j	2,1	kl	3,4	Hi	0,9	g
INCA LP-6 / Moroberekan	4,3	defghi	4,3	fgh	3,2	ijk	10,4	Cd	14,1	cd
Moroberekan / INCA LP-6	8,0	d	9,6	d	10,7	e	0,0	J	0,0	g
6066 / IR 759-54-2-2	5,0	defg	0,0	j	6,0	ghi	7,6	Ef	0,0	g
IR 759-54-2-2 / 6066	3,8	efghij	3,3	hi	5,2	hij	9,0	De	17,8	bc
Moroberekan / 6066	0,2	j	0,6	j	0,0	l	0,7	Ij	0,0	g
CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub> / 2077	1,5	ghij	0,0	j	0,0	l	0,0	J	0,0	g
2077 / CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub>	2,9	efghij	0,0	j	2,0	kl	4,3	Gh	5,5	efg
Tetep / CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub>	5,3	def	8,0	de	8,1	efg	0,0	J	0,0	g
IR 1529-430 / IR 759-54-2-2	7,9	d	6,3	ef	10,3	ef	5,2	Fgh	0,0	g
X	6,7		7,3		9,8		5,4		5,9	
ESx	1,1*		0,8*		0,9*		0,9*		2,0*	

\* Medias con iguales letras por columna no difieren estadísticamente según prueba de Duncan al 5%.

Es interesante señalar que en estos cruces aparece Amistad'82 y coincide además que participa como progenitor femenino, sin embargo en otros cruces donde interviene esta variedad se apreciaron valores muy inferiores (entre 0 y 6,6%) y su participación es indistinta como madre o padre.

Al respecto muchos autores han encontrado que tanto el medio de cultivo como el genotipo, son factores de gran importancia para la obtención de diploides a través del cultivo *in vitro* de anteras (Grewal, Gill y Gosal,

2006, Niroula y Bimb, 2009, Khatun, Islam y Bari, 2010 y Gueye y Ndoeye, 2010).

Con la utilización del medio NL se lograron los valores más altos para la formación de callos. Los tres medios evaluados difieren en la concentración de sales (macro y microelementos) vitaminas y reguladores del crecimiento, razón por la que se hace difícil atribuir una mejor respuesta al efecto de componentes individuales que posee este medio en particular, no obstante es el único de ellos en el que fue sustituida la sacarosa por maltosa y además se emplea nitrato de plata.

En este sentido Lentini *et al.* (1997) mostraron que al reemplazar la sacarosa por maltosa se obtienen incrementos significativos en la inducción de callos de genotipos indica recalcitrantes y como hecho más notable, la producción de plantas verdes de estos callos se incrementa significativamente.

Otros autores recomiendan también el empleo de maltosa en sustitución de sacarosa para el medio de inducción de callos, sobre todo para la especie indica (Bishnoi *et al.*, 2000 y Chen y Qin, 2008). Por otro lado, la utilización del nitrato de plata en el medio de inducción reduce notablemente la senescencia de las anteras de arroz de tipo indica recalcitrantes, este resultado indica que el etileno acumulado en el envase pudiera estar inhibiendo la formación de callos, efecto que probablemente es revertido con la aplicación de este compuesto (Bishnoi *et al.*, 2000; Bhojwani *et al.*, 2002 y Lentini *et al.*, 1997).

Otro aspecto de interés fue la diferencia en cuanto al tipo de plantas regeneradas (verdes o albinas); INCA LP1 / IR 759-54-2-2, solamente formó plantas albinas (0,3 plantas por 100 anteras sembradas) y los cruces IR 759-54-2-2 / Amistad'82, 6066 / IR 759-54-2-2, Moroberekan / 6066 y IR 1529-430 / IR 759-54-2-2, solo formaron plantas verdes (0,3; 7,6; 0,7 y 5,2; respectivamente, por 100 anteras sembradas).

En este sentido los resultados que se obtienen por diversos autores son muy variables, por ejemplo Sharmin *et al.* (2004) obtuvieron entre 57 y 75 plantas verdes por 100 callos y sólo de 1 a 8 callos por 100 anteras, Asaduzzaman *et al.* (2003) obtuvieron regeneración de plantas verdes entre 15 y 30 días después del cultivo y los valores más altos obtenidos fueron 33,3 % y Tran y Voung (2004) sólo obtienen entre 3 y 9 callos por 100 anteras y de 1 a 6 plantas por 100 callos.

La producción de plantas albinas, carentes de clorofila, es un fenómeno común en el cultivo de anteras de arroz, predominante en plantas derivadas de híbridos interespecíficos o híbridos intraespecífico entre las subespecies *japónicas* e *indica* con una frecuencia entre 10 y 100 % (Sangwan 2004).

Diversos estudios sugieren que la formación de plantas albinas es debida a alteraciones de los plastidios durante la microsporogénesis *in vivo* y que el albinismo está relacionado con el deterioro del ADN de los cloroplastos. Otros han encontrado delecciones y moléculas completas en el ADN de los plastidios sugiriendo que tal heterogeneidad pudiera ser la causa del albinismo (Yamagishi 2002). Por su parte Ankele *et al.*

(2005) sugieren que la formación de la planta albina es un fenómeno complejo en el cual están envueltos los plastidios y factores nucleares o sus interacciones defectivas.

Para analizar de manera conjunta la formación de callos y regeneración de plantas verdes y albinas logradas y de esta forma determinar el mejor cruce, se efectuó, con toda la información obtenida, un análisis de componentes principales (tabla 5), el cual explicó el 93% de la variación total en las dos primeras componentes. Los caracteres formación de callos en los tres medios evaluados ( $N_{6-1}$ ,  $N_{6m}$  y NL), así como la regeneración de plantas verdes tuvieron una fuerte contribución a la formación de la primera componente, mientras que la regeneración de plantas albinas contribuyó con un valor más alto a la segunda componente.

**Tabla 5.** Matriz de valores y vectores propios.

	Componentes Principales	
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Valores propios	3,912	0,736
% Contribución total	78,240	14,729
% Acumulado		92,968
Callos medio $N_{6-1}$	<b>0,964</b>	-0,242
Callos medio $N_{6m}$	<b>0,937</b>	-0,228
Callos medio NL	<b>0,963</b>	-0,232
Plantas verdes	<b>0,865</b>	0,227
Plantas albinas	0,656	<b>0,722</b>

La representación gráfica de los cultivares, tomando en consideración estas dos componentes (figura 1), presenta a los cruces 1, 2 y 3 (Amistad'82 / 2077, 2077 / Amistad'82 y Amistad'82 / IR 759-54-2-2), ubicados en el cuadrante inferior derecho con la mejor respuesta a la utilización de la técnica de cultivo *in vitro*, ya que combinaron mayor formación de callos en los 3 medios (14.6 – 55.3 callos por cada 100 anteras sembradas) con mayor regeneración de plantas verdes (12.7 – 22.6 plantas verdes por cada 100 anteras sembradas) (figura 2) y menos plantas albinas por cada 100 anteras sembradas.

Javed *et al.* (2007) y Silva y Ratnayake (2009) encontraron que variedades con una alta habilidad para formar callos también mostraron las mejores frecuencias de regeneración de plantas. Por otro lado Talebi *et al.*, 2007; encontraron casos en los que a pesar de presentar una gran habilidad para formar callos la regeneración fue

pobre, lo cual estos autores atribuyen al medio empleado para la inducción de callos que puede influir en su capacidad posterior para regenerar plantas.

El genotipo, como es conocido, posee también un efecto significativo sobre la regeneración de plantas verdes, aun cuando es posible producir un alto número de dobles haploides de muchas variedades e híbridos de arroz de tipo japónica, la regeneración de plantas verdes de la mayoría de las variedades tipo índica es baja (Pérez-Almeida 2004). Jain Maluszynski (2004) plantearon que para obtener una buena respuesta del cultivo de anteras es necesario trabajar con cruzamientos donde uno de los progenitores sea del tipo japónica, mientras que otros autores proponen, como una vía para mejorar la eficiencia del cultivo *in vitro* de anteras, la utilización de diferentes medios teniendo en cuenta el tipo de arroz (índica o japónica) (MeiFang 1992; Bishnoi *et al.*, 2000; Bhojwani *et al.*, 2002; Tran y Voun 2004 y Chen y Qin 2008).

De los tres medios evaluados para la formación de callos a partir de anteras de plantas F<sub>2</sub>, los mejores resultados fueron obtenidos con el medio NL y tres cruces: Amistad´82 / 2077, Amistad / IR 759-54-2-2 y

Amistad´82 / 2077, aportaron la mayor formación de callos y posterior generación de plantas verdes.

Evaluación de los regenerantes obtenidos

Las plantas maduras fueron evaluadas morfológicamente para de esta forma asociarlas de manera visual con su nivel de ploidía. 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 *et al.*, 1997).

Los resultados del análisis de componentes principales realizado a las líneas, con características fenotípicas similares a las diploides, provenientes de los cruces Amistad´82/2077, 2077/Amistad´82, Amistad´82/IR759-54-2-2, Moroberekan/ Amistad´82, IR759-54-2-2/INCA LP-6, INCA LP-6/Moroberekan, Tetep/INCA LP-6, IR75954-2-2/6066, 6066/IR759-54-2-2 , 2077/INCA LP-1, Tetep/INCA LP-1, INCA LP-1/Tetep, IR 1529-430/IR 759-54-2-2, y 2077/CP<sub>1</sub>C<sub>8</sub>, se presentan en la tabla 6.

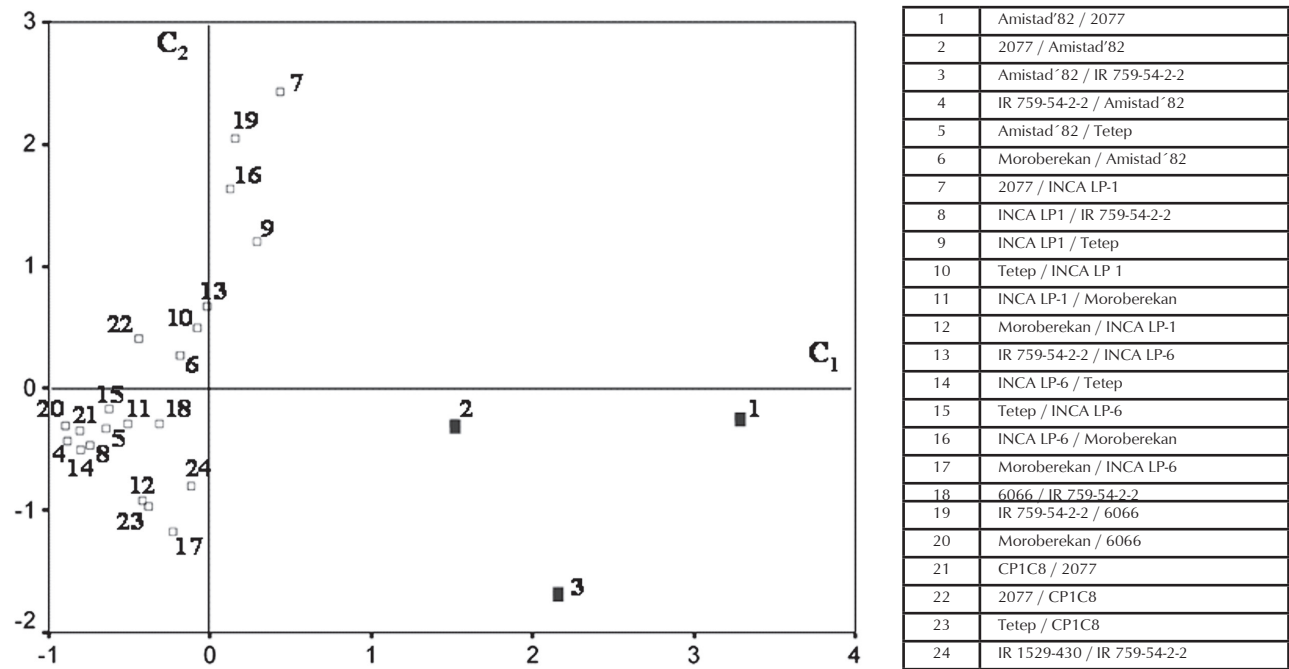
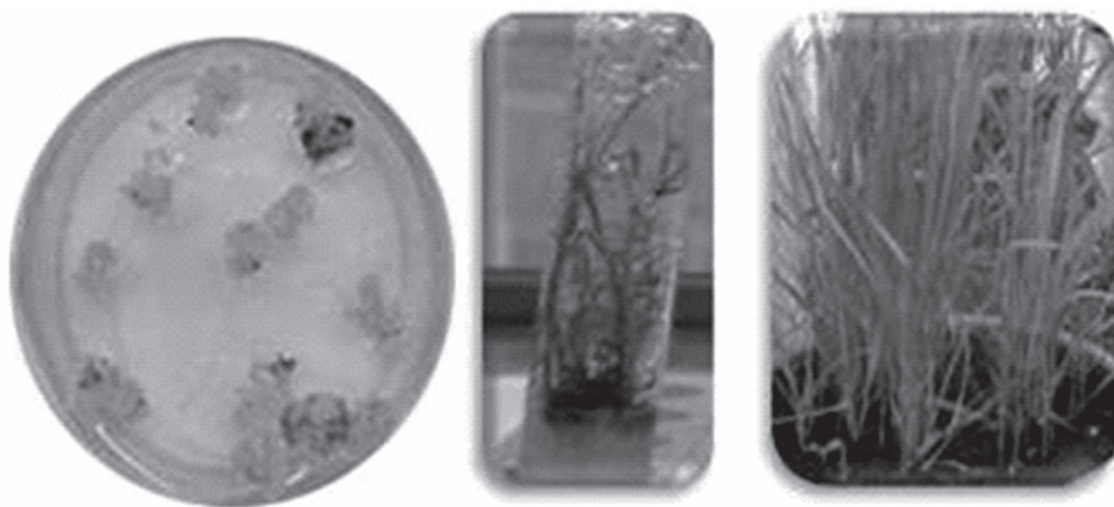


Figura 1. Distribución de los genotipos según las componentes consideradas.



**Figura 2.** A-Callos formados, B-plantas verdes regeneradas *in vitro* y C- plantas en macetas, provenientes del cruce Amistad'82/ IR 759-54-2-2.

**Tabla 6.** Matriz de valores y vectores propios.

	Componentes Principales	
	C <sub>1</sub>	C <sub>2</sub>
Valores propios	5.138	0.637
% Contribución total	73.399	9.099
% Acumulado		82.498
Altura final	<b>0.835</b>	0.007
Panículas por planta	<b>0.781</b>	-0.256
Longitud de la panícula	<b>0.959</b>	0.073
Granos llenos por panícula	0.691	0.689
Peso de 1000 granos	<b>0.894</b>	0.014
Largo del grano	<b>0.910</b>	-0.135
Ancho del grano	<b>0.898</b>	-0.269

El porcentaje de contribución de las dos primeras componentes (C<sub>1</sub> y C<sub>2</sub>) fue alto, nótese que explican el 82.5% de la variación total, lo que pudiera estar relacionado con la correlación existente entre las variables iniciales y por tanto el análisis realizado puede brindar información acertada sobre la clasificación de los genotipos y las relaciones de asociación entre las variables. Todos los caracteres evaluados presentaron una fuerte contribución a la formación de la primera componente y la segunda estuvo representada por los granos llenos por panícula.

La representación gráfica de las dos primeras componentes (figura 3) mostró una amplia dispersión en la distribución de los 142 individuos y no fue posible la

formación de grupos. En el extremo positivo del eje de la primera componente se ubicaron los mejores genotipos, dentro de ellos los valores medios de los cruces Amistad'82 / 2077, 2077 / Amistad'82, Amistad'82 / IR759-54-2-2, INCA LP-6 / Moroberekan, IR 759-54-2-2 / 6066 e INCA LP-1 / Tetep.

Estos cruzamientos aportaron mayor cantidad de líneas que combinan valores altos de panículas por planta, granos llenos por panícula y peso de 1000 granos, componentes importantes que definen el rendimiento de las plantas de arroz, y también presentan mayor longitud de la panícula y el grano, así como ancho del grano.

Dentro de las combinaciones que aportaron las mejores líneas se destacan tres, de las cuatro evaluadas, que incluyen a la variedad Amistad´82 como progenitor, sin importar su utilización ya sea como parental paterno o materno, también coincide que estos cruces lograron mayor cantidad de plantas, se evaluaron 58 en este estudio, que representan el 41% del total.

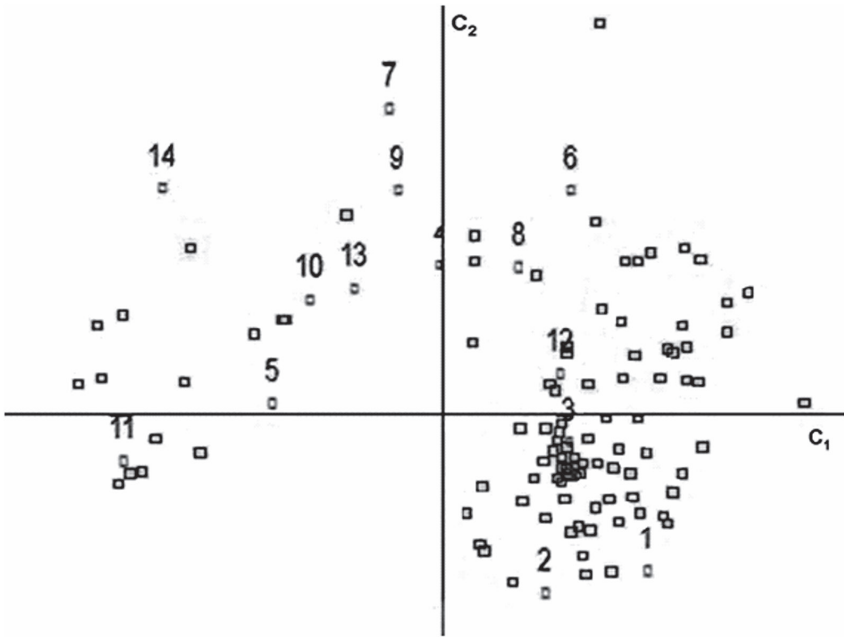
Al analizar para cada carácter evaluado los valores máximos y mínimos alcanzados, así como la media, el error estándar y el coeficiente de variación, se pudo reafirmar la variabilidad presentada entre los diploides, en esta primera generación (tabla 7), en este sentido se destacan las panículas por planta, seguidas de los granos llenos por panícula con los coeficientes de variación más altos dentro de los obtenidos en el estu-

dio. El largo del grano resultó ser el carácter con el coeficiente de variación más bajo.

Roy y Mandal (2005) señalan a los caracteres panículas por planta, granos llenos por panícula y el rendimiento por planta como los de más altos coeficientes de variación.

Los valores medios de las líneas obtenidas para todos los caracteres evaluados se redujeron con respecto a la media de los progenitores (seleccionados por poseer buenos caracteres agronómicos) que les dieron origen. Resultados similares fueron obtenidos por Mandal et al., 2000; y Roy y Mandal (2005), al evaluar 180 diploides obtenidos mediante el cultivo de anteras, pero en este caso fueron utilizadas como donantes un grupo de variedades locales.

No	Cruces
1	Amistad´82 / 2077
2	2077 / Amistad´82
3	Amistad´82 / IR 759-54-2-2
4	Moroberekan / Amistad´82
5	IR759-54-2-2 / INCA LP-6
6	INCA LP-6 / Moroberekan
7	Tetep / INCA LP-6
8	IR75954-2-2 / 6066
9	6066 / IR759-54-2-2
10	2077 / INCA LP-1
11	Tetep / INCA LP-1
12	INCA LP-1 / Tetep
13	IR 1529-430 / IR 759-54-2-2
14	2077 / CP <sub>1</sub> C <sub>8</sub>



**Figura 3.** Distribución de las variedades y el valor medio de las líneas por cruce según las componentes consideradas.

**Tabla 7.** Variación observada en la primera generación de las líneas obtenidas para los caracteres agronómicos evaluados.

Caracteres evaluados	Progenitores		Líneas			
	Comerciales	Resistentes	Rango	X	Es x	CV
Panículas por planta	18.0	10.0	4 - 22	12.0	0.43	42.0
Granos llenos por panícula	101.0	79.0	36.0 -162.0	66.0	1.97	35.4
Peso de 1000 granos	29.3	28.7	23.3 – 35.4	28.3	0.21	8,7
Altura	88.2	97.8	65.0 - 95.1	81.1	0.82	12.0
Longitud de la panícula	22.0	18.0	15.3 – 23.6	19.3	0.25	15.4
Largo del grano	10.4	10.0	9.6 – 10.9	10.1	0.03	3.3
Ancho del grano	2.6	2.4	2.1 – 2.7	2.4	0.02	7.4

Diversos autores han informado variaciones fenotípicas con relación al número de tallos por planta, la longitud media de la panícula, número de granos llenos y altura de la planta en la primera generación de diploides de arroz, las que pudieran ser debidas por un lado, a la técnica de mejoramiento empleada antes del cultivo de anteras (hibridación) y también a factores fisiológicos, químicos, a los componentes del medio de cultivo, condiciones biológicas del explante, recombinación somática, mutaciones, entre otras (Roy y Mandal 2005).

Según Lentini et al., 1997; al realizar la selección de las plantas regeneradas (R1), se debe tener en cuenta que éstas han pasado por diferentes situaciones de estrés en su desarrollo y, debido a esto, es posible que ciertas características fenotípicas tales como altura, floración, macollamiento, fertilidad y centro blanco, puedan verse afectadas y no se expresen en forma normal. Por consiguiente, los datos que se tomen en las plantas regeneradas R1 deben interpretarse con cuidado, teniendo en cuenta estas consideraciones no se efectuó selección en la primera generación.

### ***Evaluación de la segunda generación de plantas diploides***

Al evaluar las plantas de la segunda generación de dobles haploides sembradas en condiciones de campo, se observó un alto grado de homogeneidad fenotípica dentro de cada línea, lo que mostró la rápida fijación de los caracteres que se alcanza al utilizar la técnica del cultivo de anteras.

Sobre la base de la clasificación automática (*cluster*), se agruparon los genotipos en estudio en 10 clases (tabla 8) y se destaca la clase 4 con las 20 mejores líneas que presentan valores más altos de rendimiento y sus principales componentes (panículas por metro cuadrado y granos llenos por panícula), que superan la media del experimento y de los progenitores comerciales que las originaron, los que fueron ubicados en las clases 2 (INCA LP-6 y 6066), 5 (Amistad´82) y 9 (INCA LP-1 y IR 1529-430).

Las 7 líneas agrupadas en la clase 9 le siguen a las anteriores aunque con 0,9 t.ha<sup>-1</sup> menos de rendimiento y resalta dentro de sus resultados el largo y ancho de los granos con los valores más altos dentro del estudio.

En las clases 3, 7, 8 y 10 se aprecian los valores más bajos para la formación de panículas y en las clases 7, 8 y 10 para los granos llenos por panícula, lo que puede ser la causa de los bajos rendimientos obtenidos por los genotipos agrupados en estas clases. Muchos

autores hablan en sus resultados de las correlaciones existentes entre el rendimiento y dos componentes importantes como lo son las panículas por metro cuadrado y los granos llenos por panícula.

Al respecto, Díaz et al. (2003) en trabajos realizados con la variedad IR 1529-430 encontraron altas correlaciones del rendimiento agrícola con las panículas por metro cuadrado y los granos llenos por panícula. Mientras que Castillo et al. (2008), al evaluar el rendimiento y sus componentes en la variedad de arroz IIA-Cuba 20, encontraron que el número de panículas por metro cuadrado, fue el componente del rendimiento que mayor contribución directa ejerció sobre el rendimiento agrícola.

Con relación a la evaluación realizada frente a la Piri-culariosis los resultados mostraron que sólo 9 líneas (8394, 8425, 8432, 8837, 8838, 8839, 8840, 8841 y 8842), dentro del estudio mostraron resistencia a la enfermedad en los dos momentos evaluados, ubicadas todas en la clase 4, que coincide además con la clase que presentó los valores más altos de rendimiento y sus componentes principales. Cuatro de estas líneas tuvieron como progenitor resistente a la variedad IR 759-54-2-2 (8425, 8432, 8837 y 8838) cruzado con Amistad´82, 6066 e IR 1529-430.

También resultaron resistentes, en la evaluación efectuada tanto en la hoja como en el cuello de la panícula, cinco de las variedades utilizadas como progenitores, ubicados en las clases 2 (INCA - LP 6, IR 759-54-2-2 y Tetep), 3 (Moroberekan) y 9 (2077). Otras 93 líneas distribuidas en las 10 clases mostraron resistencia a la enfermedad cuando esta fue evaluada en uno de los dos momentos y susceptibilidad en el otro, lo que pudo ser un factor que contribuyó a la obtención de bajos rendimientos.

En este sentido Zambrano et al. (2006) plantean que cuando no hay destrucción total del cultivo es bastante difícil estimar las pérdidas, por lo que no hay una estimación exacta de las mismas, pero se considera que las pérdidas son proporcionales al porcentaje del área foliar o del cuello de la panícula afectada.

Las líneas que resultaron resistentes deben ser evaluadas en un sitio donde exista una alta presión de la enfermedad y diversidad del patógeno asociada a condiciones ambientales favorables al desarrollo del hongo, lo que permite la selección de materiales con resistencia duradera a la enfermedad causada por el hongo *Magnaporthe grisea* Barr. En tal sentido Fabregat (1984), citada por Cárdenas (1998), informó que la presencia de la enfermedad en las diferentes fenofases

**Tabla 8.** Valores medio de los caracteres evaluados en cada grupo establecido sobre la base de la diversidad existente.

Clases	Líneas	R*	P	GL	PG	A	LP	LG	AG	Resistentes			S
										H	C	H y C	H y C
1	24	5,7	539	69	29,0	86,0	20,7	10,2	2,5	10	6	0	8
2	20	4,9	325	67	27,3	82,8	19,3	10,1	2,4	6	7	3	4
3	11	3,8	233	81	29,5	92,5	22,8	10,3	2,5	2	6	1	2
4	20	7,1	577	95	28,9	88,1	21,0	10,2	2,5	9	2	9	0
5	15	5,6	594	59	29,6	86,4	20,8	10,3	2,5	6	5	0	4
6	11	5,7	497	69	29,0	88,2	21,0	10,2	2,5	4	2	0	5
7	11	2,6	266	52	25,8	73,7	17,6	9,9	2,4	1	5	0	5
8	11	2,3	180	46	27,0	69,7	16,0	9,8	2,3	0	8	0	3
9	7	6,2	411	81	29,4	88,5	22,5	10,5	2,6	0	1	1	5
10	22	2,2	141	55	26,7	78,4	16,9	9,7	2,2	2	11	0	9
X		4,6	376	67	28,2	83,4	19,9	10,1	2,4				

Líneas por clases												
1	8396	8397	8401	8405	8408	8412	8414	8424	8430	8390	8416	8400
	8404	8409	8420	8422	8428	8431	8803	8817	8395	8435	8616	8817
2	IR 759-54-2-2	8383	8660	8676	8799	8800	8801	8816	8772	8630	8617	8618
	INCA LP-6	8622	8763	8765	8683	8634	6066	Tetep				
3	Moroberekan	8388	8677	8774	8398	8433	8436	8628	8635	8619	8682	
4	8394	8403	8411	8423	8385	8392	8421	8429	8439	8425	8427	8432
	8841	8839	8773	8842	8838	8752	8840	8837				
5	Amistad´82	8382	8407	8413	8387	8389	8399	8419	8426	8434	8406	8415
	8797	8767	8753									
6	8384	8402	8417	8386	8418	8391	8798	8802	8393	8626	8764	
7	8781	8783	8656	8658	8679	8627	8629	8768	8755	8757	8680	
8	8437	8782	8662	8631	8620	8760	8766	8754	8759	8751	8614	
9	IR1529-430	8410	8749	8750	INCA LP-1	CP1C8	2077					
10	8438	8784	8785	8657	8659	8661	8670	8678	8770	8771	8624	8625
	8621	8623	8762	8769	8756	8758	8681	8687	8613	8615		

\* R- Rendimiento agrícola (t.ha<sup>-1</sup>), P- Panículas por metro cuadrado, GL- granos llenos por panícula, PG- Peso de 1000 granos, A- Altura final, LP- Longitud de la panícula, LG- Largo del grano, AG- Ancho del grano, H- Hoja, C- Cuello, S- Susceptibles.

del cultivo está muy relacionada con lo óptimo de las condiciones ambientales, pero su desarrollo depende de las características genéticas de las variedades y de la variabilidad del patógeno, de ahí la necesidad de evaluar las líneas obtenidas en la época de mayor incidencia de la enfermedad y en la localidad selecciona-

da en Cuba como "Hot Spot ", la Unidad Económica Básica Caribe perteneciente al Complejo Agroindustrial Arrocero "Los Palacios", por poseer condiciones de alta presión de la enfermedad favorecida por condiciones ambientales y una alta diversidad en virulencia del patógeno (Cárdenas *et al.*, 2005).

### **Evaluación de las nuevas líneas obtenidas por cultivo de anteras frente a la incidencia de la Piriculariosis en canteros de infección**

Si analizamos la media anual del comportamiento de las líneas evaluadas en canteros de infección en la localidad Caribe (tabla 9) se aprecian, en todos los casos, valores de la enfermedad considerados como susceptibles, o sea afectaciones del área foliar y cuellos superiores a 3 y 10% respectivamente.

Se observaron además diferencias en los cuatro años evaluados y exhibió los valores más altos el tercero. En este sentido Cárdenas *et al.* (2007) al valorar los resultados, de un ensayo similar pero con variedades y épocas diferentes, plantean que la enfermedad no exhibe un patrón común en su expresión, lo que consideran está muy relacionado con las condiciones climáticas.

En términos epidemiológicos es conocido que para el desarrollo de cualquier enfermedad debe coexistir un hospedero susceptible, el patógeno y las condiciones ambientales favorables, siendo éstas las que determinan el éxito de la relación patógeno hospedero. La

incidencia y severidad del hongo *Magnaporthe grisea* Barr (*Pyricularia grisea* Sacc) están influenciadas por diversos factores, tales como la fertilización nitrogenada, la susceptibilidad de los materiales y el tipo de suelo, los cuales interactúan con los factores ambientales que condicionan el progreso de la enfermedad (Meneses *et al.*, 2001).

El conocimiento de la dinámica poblacional del hongo y el desarrollo de estrategias de mejoramiento que incluyan la selección y evaluación de germoplasma de arroz en sitios y época donde exista alta variabilidad del mismo, así como una alta presión de inóculo, permite implementar programas de mejoramiento para desarrollar una resistencia durable a la Piriculariosis. En tal sentido, la selección de localidades y épocas de evaluación de *P. grisea*, es un factor crítico, en el cual hay que tomar en consideración las variantes climáticas imperantes (Navas *et al.*, 2003).

Si se analiza el comportamiento individual de las líneas ante la infección en la hoja y cuello de la panícula, en los 4 años evaluados, en ella se aprecia una reacción

**Tabla 9.** Incidencia de la enfermedad en las nuevas líneas obtenidas durante los 4 años evaluados.

Líneas	Área foliar afectada (%)					Cuellos afectados (%)				
Años	1ro	2do	3ro	4to	X	1ro	2do	3ro	4to	X
8394	2 c	2 c	2 b	2 b	2	0 f	15 cd	12 de	0 g	7
8425	2 c	4 bc	2 b	2 b	2,5	0 f	6 fg	10 e	0 g	4
8838	8 b	8 b	2 b	1 b	4,75	10 e	10 def	25 b	5 efg	13
8839	8 b	8 b	1 b	2 b	4,75	20 c	18 c	23 b	35 b	24
8840	1 c	2 c	1 b	4 b	2	10 e	7 efg	7 e	8 e	8
8841	4 bc	8 b	4 b	2 b	4,5	4 f	10 def	10 e	25 c	12
8842	2 c	0,5 c	4 b	8 b	3,63	25 b	25 b	25 b	25 c	25
IR 759-54-2-2	2 c	2 c	4 b	2 b	2,5	10 e	8 ef	16 cd	6 ef	10
Moroberekan	1 c	1 c	1 b	1 b	1	15 d	12 de	20 bc	15 d	16
Tetep	1 c	1 c	1 b	1 b	1	2 f	2 g	1 f	3 efg	2
2077	0,5 c	1 c	0,5 b	1 b	0,75	2 f	2 g	1 f	1 fg	2
J-104	16 a	16 a	82 a	32 a	36,5	60 a	45 a	60 a	48 a	53
X	4,0	4,5	8,7	4,8		13	13	18	14	
ESx	1,62*	1,74*	1,76*	2,65*		1,60*	1,79*	1,84*	1,81*	

diferente de las mismas, por años y dentro de un mismo año en dependencia del momento evaluado (plántula y paniculación), lo cual puede ser explicado por la existencia en la localidad de una alta diversidad genética del patógeno (Fuentes *et al.*, 1998) que unido a la falta de protección al cultivo permitió la infección de las variedades.

El cultivar J-104 mostró siempre los valores más altos de incidencia de la enfermedad, con diferencias estadísticamente significativas del resto de los genotipos. Así mismo se observaron en esta variedad manchas típicas de la enfermedad y porcentajes de área foliar afectada comprendidos entre los grados susceptibles 6-9 de la escala, lo que coincide con el comportamiento de esta variedad en áreas de producción que además es considerada la principal causa de los bajos rendimientos, tanto de esta variedad como de los cultivares susceptibles que se siembran en producción en la localidad en estudio (UEB Caribe).

Con excepción del tercer año evaluado para el cultivar IR 759-54-2-2, el resto de los testigos resistentes presentaron afectaciones de área foliar por debajo de 3%, mientras que para la incidencia en el cuello, Moroberekan e IR 759-54-2-2 superaron el 10% límite considerado como resistentes, en las cuatro evaluaciones en el caso de Moroberekan y el tercer año IR 759-54-2-2. Teniendo en consideración estos resultados y conociendo además que la localidad utilizada para la evaluación (UEB Caribe) históricamente ha mostrado una alta incidencia de la plaga, razón por la que ha sido seleccionada como hot spot, es meritorio destacar el comportamiento de las líneas 8394, 8425 y 8840 quienes mantienen, durante los 4 años evaluados, los valores más bajos de porcentajes de área foliar y cuellos afectados dentro de los grados 0 y 3 de las escalas utilizadas, superando incluso a los progenitores que les dieron origen.

El mejoramiento tradicional ha jugado un papel importante en el mejoramiento del rendimiento y calidad de las variedades de arroz en el mundo, mientras que la utilización de los métodos biotecnológicos puede asistir el desarrollo de variedades con rendimiento más alto y resistencia a enfermedades y estrés abióticos. El cultivo *in vitro* de anteras acelera el proceso de obtención debido a su producción rápida de líneas homocigóticas y por consiguiente la retención de alelos recesivos o mutaciones útiles. Existen en la actualidad un gran número de variedades desarrolladas combinando las técnicas convencionales con el cultivo de anteras (Chen *et al.*, 2006).

## Conclusiones

Los resultados obtenidos permiten concluir que la utilización de la técnica del cultivo de anteras mostró alta dependencia del genotipo y el medio de cultivo, las dos primeras generaciones de las líneas obtenidas presentaron un alto grado de homocigosis fenotípica. De los 3 medios líquidos empleados para la formación de callos a partir de anteras, resultó el NL con los valores más altos y se obtuvieron nuevos genotipos resistentes a la Piriculariosis y de alto rendimiento agrícola.

## Referencias bibliográficas

- Álvarez, R. M., Pérez, M., Reyes, E., Moreno, O. J., Delgado, N., Torrealba, G., T., Acevedo, M., A., Castrillo, W. A., Navas, M. I., Salazar, M., Torres, O. J., Torres, E. A., García, P. J. y Pérez, A. 2008. Evaluación comparativa de híbridos y variedades de arroz en los llanos centroccidentales de Venezuela. *Agronomía Tropical*. 58(2): 101-110.
- Ankele, E., Heberle-Bors, E., Pfösser, M. and Hofinger, B. 2005. Searching for mechanisms leading to albino plant formation in cereals. *Acta Physiologiae Plantarum*. 27(4B): 651-664.
- Asaduzzaman, M., Bari, M., Rahman, M., Khatun, N., Islam, M. y Rahman, M. 2003. *In vitro* plant regeneration through anther culture of five rice varieties. *Asian J. Plant Sci.*, 3:167-171.
- Bhojwani, S., Pande, H. and Raina, A. 2002. Factors affecting androgenesis in indica rice. Department of Botany, University of Delhi, Delhi, India, p12.
- Bishnoi, U.; Jain, R.K.; Rohilla, J.S., Chowdhury, V.K., Gupta, K.R. y Chowdhury, J.B. 2000. Anther culture of recalcitrant indica - Basmati rice hybrids Anther culture of indica rice hybrids. *Euphytica*. 114: 93-101.
- Cárdenas, R. 1998. Estudio de aislamientos de *Pyricularia grisea* Sacc., toxigenicidad de sus metabolitos y su utilización en la diferenciación de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.). [Tesis de Maestría]. Instituto Superior de Ciencias Agropecuarias de la Habana, Cuba, p100.
- Cárdenas, R. M., Cordero, V., Pérez, Noraida, Cristo, Elizabeth y Gell, I. 2000. Utilización de una nueva metodología para la evaluación de arroz ante la infección producida por el hongo *Pyricularia grisea*. *Cultivos Tropicales*. 21(1): 63-66.
- Cárdenas, R. M., Pérez, Noraida, Cristo, Elizabeth, González María C y Fabré, Leonila. 2005. Estudio sobre el comportamiento de líneas y variedades de arroz (*Oryza sativa*) ante la infección por el hongo *Pyricularia grisea*. *Cultivos Tropicales*. 26 (4): 83-87.
- Cárdenas, R. M., Pérez, Noraida, Cristo, Elizabeth y Fabré, Leonila. 2007. Análisis comparativo del comportamiento de líneas y variedades de arroz (*Oryza sativa* lin.) ante *Pyricularia grisea* Sacc. en dos épocas. *Cultivos Tropicales*. 28(2): 45-50.
- Castejón-Muñoz, M. 2008. The effect of temperature and relative humidity on the airborne concentration of *Pyricularia oryzae* spores and the development of rice blast in southern Spain. *Spanish Journal of Agricultural Research*. 6(1), 61-69.

- Castillo, A., Rodríguez, S., González, A. y Peña, R. 2008. Fertilización nitrogenada y la densidad de población en el rendimiento y sus componentes en la variedad de arroz (*Oryza sativa* L.) IIA Cuba-20 en siembras de primavera. Libro Resúmenes Encuentro Internacional del Arroz. Palacio de las Convenciones, La Habana Cuba, p200.
- Chen, C., Xiao, H., Zhang, W., Wang, A., Xia, Z., Li, X., Zhai, W., Cheng, Z. and Zhu, L. 2006. Adapting rice anther culture to gene transformation and RNA interference. *Science in China Series C: Life Sciences*. 49(5): 414-428.
- Chen, H. and Qin, R. 2008. Analysis of different effectors enhancing the anther culture ability of autotetraploid japonica rice. *Journal of Agricultural Science and technology*. 10(3): 90-96.
- Cordero, V. y Rivero, L. E. 2001. Principales enfermedades fungosas que inciden en el cultivo del arroz en Cuba. Instituto de Investigaciones del Arroz. Habana, Cuba, p32p.
- Correa-Victoria, F.J. and Zeigler RS. 1994. Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast "hot spot" breeding site in Eastern Colombia. *Plant Diseases*. 77: 1029-1035.
- Díaz, S., Morejón, R. y Núñez, M. 2003. Effects of Biobras-16 on rice (*Oryza sativa* L.) yield and others characters. *Cultivos Tropicales*. 24(2): 35-40.
- Fuentes, J. L. 1998. Estructura y diversidad genética de poblaciones cubanas del hongo *Pyricularia grisea*. Tesis para optar por el título de Master en Biología Vegetal, Mención Biotecnología Vegetal, CIAT, Colombia y CEADEN, Cuba, 64p.
- Fuentes, J. L.; Álvarez, Alba; Deus, J. E.; Gutiérrez, L.; Suárez, E. y Duque, M. C. 1998. Caracterización de la diversidad genética inducida por radiaciones ionizantes en genotipos de arroz con diferentes fuentes citoplasmáticas. En: Libro Resúmenes I Encuentro Internacional de Arroz. Palacio de las Convenciones. La Habana, Cuba, p:197-199.
- Grewal, D., Gill, R. y Gosal, S. 2006. Role of cysteine in enhancing androgenesis and regeneration of indica rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Growth Regul.* 49:43-47.
- Gueye, T. and Ndoye, K. 2010. *In vitro* production of double haploid plants from two rice species (*Oryza sativa* L. and *Oryza glaberrima* Steudt.) for the rapid development of new breeding material. *Scientific Research and Essays*. 5(7):709-713.
- Hernández, A., Pérez, J.M., Bosch, D. y Rivero, L. Nueva versión de clasificación genética de los suelos de Cuba. Agrinfor, Instituto de Suelos, La Habana; 64p, (1999).
- IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice. International Rice Research Institute, Philippine, p56.
- Jain, S.M. and Maluazynski, M. 2004. Induced mutations and biotechnology in improving crops. In: *In vitro* application in crop improvement. A. Mujib, M.J. Cho, S. Predieri, and S. Banerjee (Eds.). Science Publishers, Inc, USA, p: 170-202.
- Javed M.A., Ishii T, Kamijima O. and Misoo S. 2007. The role of alternating culture temperatures and maltose in enhancing the anther culture efficiency of salt tolerant indica rice (*Oryza sativa* L.) cultivars, Pokkali and Nona Bokra. *Plant Biotechnology*. 24: 283-287.
- Jiang, J., Gibbons, J.W., Moldenhauer, K.A.K., Johnson, V.A. and Lee, F.N. 2004. The Use of Anther Culture for Rice Variety Development in Arkansas. In: B.R. Wells Rice Research Studies 2003 (ed.). University of Arkansas Agricultural Experiment Station Research Series 517: 49-54.
- Khatun, R., Islam S.M. and 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.
- Lentini, Z., Martínez, C. y Roca W. 1997. Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma. Publicación CIAT No 293, ISBN 958-9439-92-6, Agosto 1997. Fundación Polar, CIAT y Fundación Rockedeller, p 50.
- Lentini, Z.; Reyes, P.; Martínez, C. P.; Núñez, V. M. y Roca, W. 1995. Mejoramiento del arroz con cultivo de anteras. Aplicaciones en el desarrollo de germoplasma adaptado a ecosistemas Latinoamericanos y el Caribe. Centro Internacional de Agricultura Tropical, Cali, Colombia, 80 p.
- Madrugá, A. 2004. Cuba por aumentar sus rendimientos arroceros. Periódico Granma. La Habana, Lunes 23 de Febrero, no. 46 p8.
- Mandal, A.B., Sheeja, T. E. y Roy, B. 2000. Assessment of androclonal variation in indica rice PTB28. *Indian Journal Exp. Bio*. 38: 1054- 1057.
- Meifang, L. 1992. Anther culture breeding of rice at the Chinese Academy of Agricultural Sciences. In: Z. Kangle and T. Murashige (Eds.), *Anther culture for Rice Breeders*, CNNRI, Hangzhou, China, p: 75-86.
- Meneses, R., Gutiérrez, A., García, A., Antigua, G., Gómez, J., Correa-Victoria, F. y Calvert, L. 2001. Principales enfermedades del cultivo del arroz. *Pyricularia grisea*. En: Instituto de Investigaciones del Arroz (IIA) de Cuba, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), de Colombia y Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR) (Eds.), *Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz*, p:46-48.
- MINAG. 2005. Instructivos Técnicos para el cultivo del arroz. Instituto de Investigaciones del Arroz. La Habana, Cuba, p113.
- Murashige, T. y Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* (Copenhagen). 15 (3): 473-479.
- Navas, M., Gamboa, C., Torres, O., Salazar, M., Marín, C., Crespo, J. y Gutiérrez, R. 2003. Estimación de la época de mayor presión de inóculo de *Pyricularia grisea* Sacc en el campo experimental del centro de investigaciones agropecuarias del estado Barinas, Venezuela. *Investigación Agrícola*. (8): 9.
- Niroula, R.K and 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.
- Pérez-Almeida, Iris. 2004. Aplicaciones Biotecnológicas en el Mejoramiento del Arroz. Revista Digital CENIAP HOY del Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias de Venezuela, 6. sep-dic.

- Ramakrishnan, S. H., Saravanan, S. Anandakumar, C. R. y Kannanbapu, J. R. 2005. *In vitro* androgénesis in rice (*Oryza sativa* L.). *Asian Journal of Plant Sciences*. 4(6):600-602.
- Roy B. y Mandal, A.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(3): 235-240.
- Saharan, V.; Yadav, R. C.; Yadav, N. R.; Chapagain, B. P. 2004. High frequency plant regeneration from desiccated calli of indica rice (*Oryza sativa* L.). *African Journal of Biotechnology*. 3(5): 256-259.
- Sangwan, R. S. 2004. Haploid plants from pollen grains: advances and potential in plant breeding. International Training Course on Application of Induced Mutations & Biotechnology for Crop Salt Tolerance Improvement. Institute of Crop Science, (2004 aug 2 – 6: Beijing), China.
- Sharmin, S., Bari, M.A., Siddique, N.A., y Rahman, M.H. 2004. Effects of genotype on induction of callus and plant regeneration potential *in vitro* anther culture of rice (*Oryza sativa* L.). *Pakistan Journal of Biological Sciences*. 7 (2): 235-237.
- Silva, T.D. and Ratnayake, W.J. 2009. Anther culture potential of indica rice varieties, *kurulu thuda* and Bg 250. *Tropical Agricultural Research & Extension* 12(2):53-56.
- Talebi R, Rahemi MR, Arefi H, Nourozi M and 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.
- Tan, Y.F., Sun, M., Xing, Y.Z., Hua, J.P. and Sun. X.L. 2001. Mapping quantitative trait loci for milling quality, protein content and color characteristics of rice using a recombinant inbred line population derived from an elite rice hybrid. *Theor. Appl. Genet.* 103: 1037-1045.
- Tran, D.G. and Vuong, D. T. 2004. Anther culture from crosses between IR64 and new plant type cultivars. *Omonrice*. 12: 27-32.
- Varela, M. 1998. Análisis multivariado de datos. Aplicación a las Ciencias Agrícolas. Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas, San José de las Lajas, La Habana, p56.
- Yamagishi, M. 2002. Heterogeneous plastid genomes in anther culture-derived albino rice plants. *Euphytica*. 123: 67–74.
- Zambrano, A.; Vegas, A., Cardona, R., Gutiérrez, Z. y Demey, J. R. 2006. Estructura genética y diversidad de linajes de *Pyricularia grisea* en la zona arrocerá venezolana. *Interciencia*. 31(1):62-66.