



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

**Trabajo Experimental presentado al H. Consejo Directivo como requisito previo a la
obtención del título de:**

INGENIERO AGRÓNOMO

TEMA:

Androgénesis *in vitro* de poblaciones segregantes F1 de arroz japonico (*Oryza sativa* L. ssp.
japonica) para desarrollar líneas homocigóticas

AUTOR:

Rony Alberto Crespo Reina

ASESOR:

Walter Oswaldo Reyes Borja, PhD

Babahoyo – Los Ríos – Ecuador

2017



UNIVERSIDAD TÉCNICA DE BABAHOYO
FACULTAD DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
ESCUELA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA

El presente trabajo experimental titulado “Androgénesis *in vitro* de poblaciones segregantes F1 de arroz japonico (*Oryza sativa* L. ssp. *Japonica*) para desarrollar líneas homocigóticas”, realizado por el Egdo. Rony Alberto Crespo Reina, bajo la dirección del PhD. Walter Oswaldo Reyes Borja; ha sido aprobado y aceptado por el Tribunal de Sustentación como requisito para obtener el título de **Ingeniero Agrónomo**.

TRIBUNAL DE SUSTENTACIÓN

Ing. Agr. Oscar Mora Castro, MAE.

PRESIDENTE

Ing. Agr. Guillermo García Vásquez, Msc.

VOCAL PRINCIPAL

Ing. Agr. Mercedes Maldonado Contreras, Mg.

VOCAL PRINCIPAL

CERTIFICACIÓN

El suscrito certifica:

Que el trabajo titulado “Androgénesis *in vitro* de poblaciones segregantes F1 de arroz japonico (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) para desarrollar líneas homocigóticas”, realizado por el Edgo. Rony Alberto Crespo Reina; ha sido dirigido y revisado periódicamente, cumpliendo todas las normas estatutarias establecidas por la Universidad Técnica de Babahoyo.

Babahoyo, 27 de abril del 2017

PhD. Walter Oswaldo Reyes Borja
ASESOR

DECLARACIÓN DE RESPONSABILIDAD

Rony Alberto Crespo Reina

Declaro que:

El trabajo de investigación “Androgénesis *in vitro* de poblaciones segregantes F1 de arroz japonico (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) para desarrollar líneas homocigóticas”, ha sido desarrollado con base a una investigación exhaustiva, respetando derechos intelectuales de terceros, conforme las citas que constan al pie de las páginas correspondientes, 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 de esta investigación.

Babahoyo, 27 de abril del 2017

Rony Alberto Crespo Reina
120649295-9

AUTORIZACIÓN

Yo, Rony Alberto Crespo Reina, autorizo a la Universidad Técnica de Babahoyo, la publicación en la biblioteca virtual de la Institución; el trabajo de grado titulado “Androgénesis *in vitro* de poblaciones segregantes F1 de arroz japonico (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*) para desarrollar líneas homocigóticas”, cuyo contenido, ideas y criterios son de exclusiva responsabilidad y autoría.

Babahoyo, 27 de abril del 2017

Rony Alberto Crespo Reina
120649295-9

DEDICATORIA

Este trabajo de investigación está dedicado principalmente a mis padres Alberto Crespo Fuentes y Karina Reina Duarte, por todo el amor, consejos, valores enseñados, confianza y sobre todo por el trabajo y sacrificio durante el tiempo de mi vida estudiantil; a mi hermana Jimena Crespo Reina y demás familiares quienes son el motivo, razón e inspiración para superarme día tras día. Por el cariño y el apoyo ilimitado que me han dado cada día, les quedo realmente muy agradecido.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente agradezco a Dios por bendecirme y permitirme disfrutar al máximo cada día la vida que me ha dado. Además, por toda la inteligencia y sabiduría para poder alcanzar todas las metas que me propongo.

Quedo en gratitud total a la Universidad Técnica de Babahoyo, Facultad de Ciencias Agropecuarias (FACIAG); por haber aceptado que yo sea parte de ella formándome como un gran profesional; reconozco todos mis agradecimientos a cada uno de sus docentes, quienes me entregaron sus conocimientos, experiencias adquiridas y su amistad en el transcurso de mi vida estudiantil.

A mi asesor de tesis Ing. Agr. Walter Oswaldo Reyes Borja, PhD. Docente Investigador; por brindarme la oportunidad de llevar a cabo este trabajo de investigación, por sus conocimientos científicos, sus experiencias adquiridas, el apoyo incondicional y toda la amistad que me ha brindado.

A los Ingenieros Agrónomos. María Eugenia Romero Román y Lenin Arana Vera; por todas las contribuciones de sus conocimientos y experiencias entregadas sin condición alguna, que han sido de gran ayuda para la realización de este trabajo de investigación.

Por último, pero no menos importante quiero agradecer a mis compañeros del Laboratorio de Biotecnología Vegetal. Egdos. Viviana Arana Vera y Jorge Borja Portilla por su colaboración y amistad brindada para la realización de este trabajo de investigación.

CONTENIDO

I. INTRODUCCIÓN.....	1
Objetivos	4
General.....	4
Específicos.....	4
II. REVISIÓN DE LITERATURA	5
2.1. Descripción taxonómica, morfológica y componentes orgánicos del arroz	5
2.2. Historia del mejoramiento genético	5
2.3. Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de plantas	6
2.4. Método genealógico o pedegree.....	7
2.5. Método de retrocruzamiento	7
2.6. Método masal o bulk.....	8
2.7. Cultivo <i>in vitro</i> en el mejoramiento genético.....	8
2.8. La antera del arroz.....	9
2.9. Genoma del arroz	9
2.10. Metodologías de generación de plantas haploides y doble haploides.....	10
2.11. Cultivo de anteras.....	12
2.12. Características de las plantas de arroz tipo japonico.....	14
III. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3.1. Ubicación del ensayo	15
3.2. Material genético.....	15
3.3. Factores estudiados	15
3.4. Tratamientos en estudio	15
3.5. Métodos.....	16
3.6. Análisis Estadístico	16
3.7. Materiales y equipos utilizados en laboratorio e invernadero.....	17
3.8. Manejo de los ensayos	18
3.8.1. Establecimiento de la población F1 en invernadero	18
3.8.1.1. Pregerminación	18

3.8.1.2.	Trasplante de plántulas F1	18
3.8.1.3.	Riego	18
3.8.1.4.	Control de malezas	18
3.8.1.5.	Control de insectos	19
3.8.1.6.	Fertilización.....	19
3.8.2.	Siembra <i>in vitro</i> de las anteras a nivel de laboratorio	19
3.8.2.1.	Formulación de las soluciones madres o stocks para la preparación de los medios de cultivos para inducción de callos y regeneración de plántulas	19
3.8.2.2.	Colecta de macollas para la obtención de anteras en el Laboratorio	24
3.8.2.3.	Esterilización y selección de flores idóneas para la inducción de callos	25
3.8.2.4.	Siembra de las anteras en medio de cultivo para la inducción de callos.....	25
3.8.2.5.	Transferencia de callos al medio de regeneración de plantas (MS).....	26
3.8.2.6.	Transferencia de callos con órganos formados en medio de aclimatación de plantas sin hormonas.	27
3.8.3.	Establecimiento de la población R1 en el invernadero obtenida a partir de cultivo de anteras	28
3.9.	Variables evaluadas.....	29
3.9.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de anteras en arroz tipo japonico	29
3.9.1.1.	Número de anteras sembradas.....	29
3.9.1.2.	Número de callos formados	29
3.9.1.3.	Número de plántulas regeneradas	29
3.9.1.4.	Número de plántulas aclimatadas	29
3.9.1.5.	Días a la formación de callos	30
3.9.1.6.	Días a la formación de brotes foliares.....	30
3.9.1.7.	Días a la regeneración de plantas	30
3.9.1.8.	Intervalo en días, anteras – plantas R1	30
3.9.2.	Características agronómicas del material genético R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir del cultivo <i>in vitro</i> de anteras	30
3.9.2.1.	Días a la floración	30
3.9.2.2.	Ciclo vegetativo	31
3.9.2.3.	Macollos por planta.....	31

3.9.2.4.	Panículas por planta	31
3.9.2.5.	Longitud (cm) y ancho de la hoja bandera (mm).....	31
3.9.2.6.	Altura de planta (cm)	31
3.9.2.7.	Longitud de panícula (cm)	31
3.9.2.8.	Granos por panícula	32
3.9.2.9.	Esterilidad de panícula (%).....	32
3.9.2.10.	Desgrane (%).....	32
3.9.2.11.	Peso de 1000 granos (g)	33
3.9.2.12.	Longitud de grano descascarado (mm)	33
3.9.2.13.	Forma del grano	33
3.9.2.14.	Nivel de ploidía en plántulas aclimatadas en invernadero	34
IV.	RESULTADOS.....	35
4.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de arroz tipo japonico	35
4.1.1.	Número de anteras sembradas.....	35
4.1.2.	Número de callos formados	36
4.1.3.	Número de plantas regeneradas	38
4.1.4.	Número de plantas aclimatadas en invernadero.....	40
4.1.5.	Días a la formación de callos	40
4.1.6.	Días a la formación de brotes.....	42
4.1.7.	Días a la regeneración de plantas	42
4.1.8.	Intervalo de días, anteras – plantas R1	43
4.2.	Caracteres agronómicos del material genético R1, obtenidos a partir del cultivo <i>in vitro</i> de anteras de cruces de arroz tipo japonico	45
4.2.1.	Días a la floración	45
4.2.2.	Ciclo vegetativo (días)	46
4.2.3.	Número de macollos por planta	46
4.2.4.	Número de panículas por planta.....	47
4.2.5.	Longitud de hoja bandera (cm)	48
4.2.6.	Ancho de hoja bandera (mm).....	49
4.2.7.	Altura de planta (cm)	49

4.2.8.	Longitud de panícula (cm)	50
4.2.9.	Número de granos por panícula	51
4.2.10.	Esterilidad (%)	52
4.2.11.	Desgrane (%).....	53
4.2.12.	Peso de 1000 granos (g)	53
4.2.13.	Longitud de grano descascarado (mm)	54
4.2.14.	Forma del grano	54
4.2.15.	Nivel de ploidía de las plántulas aclimatadas en invernadero.....	55
V.	DISCUSIÓN.....	57
5.1.	Cultivo <i>in vitro</i> de anteras de arroz tipo japonico	57
5.2.	Caracteres agronómicos del material genético R1 de arroz tipo japonico, obtenidos a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras.	58
VI.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	61
6.1.	CONCLUSIONES	61
6.2.	RECOMENDACIONES	62
VII.	RESUMEN.....	63
VIII.	SUMMARY	65
IX.	BIBLIOGRAFÍA.....	66

CONTENIDO DE TABLAS

Tabla 1.	Poblaciones segregantes F1 de 11 cruces de arroz tipo japonico utilizados en el estudio.	16
Tabla 2.	Materiales, equipos y reactivos utilizados en este experimento.....	17
Tabla 3.	Soluciones stocks utilizados en la preparación del medio de cultivo NL para inducir callos en arroz.	20
Tabla 4.	Soluciones stocks para la preparación del medio de cultivo Murashige & Skoog modificado, para la regeneración de callos en arroz.	22
Tabla 5.	Escala de evaluación estándar para arroz CIAT (desgrane %).....	32
Tabla 6.	Escala del sistema de evaluación estándar para arroz CIAT (Longitud y ancho del grano descascarado).	33

Tabla 7. Escala del sistema de evaluación estándar para arroz del CIAT (Forma del grano).....	34
Tabla 8. Variables evaluadas desde la siembra de las anteras en medio de cultivo de inducción de callos <i>in vitro</i> , hasta la aclimatación en invernadero.	36
Tabla 9. Significancia estadística del total callos formados en medio de cultivo de inducción de callos <i>in vitro</i> , provenientes de cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.....	37
Tabla 10. Días transcurridos de la siembra de las anteras en medio de cultivo de inducción de callos <i>in vitro</i> , hasta la aclimatación en el invernadero.	41
Tabla 11. Días a la floración, ciclo vegetativo (días), macollos/planta y panículas/planta de poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.....	45
Tabla 12. Long. Hoja de hoja bandera (cm), ancho de hoja bandera (mm) y altura de planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.....	48
Tabla 13. Longitud de panícula (cm), número de granos/panícula y esterilidad (%) de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.....	51
Tabla 14. Desgrane (%), peso 1000 granos (g), longitud de grano descascarado (mm) y forma del grano de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.....	53
Tabla 15. Niveles de ploidía estimados a cada uno de los individuos aclimatados en el invernadero.....	56

CONTENIDO DE FIGURAS

Figura1. Preparación de soluciones stock (A), soluciones stock en refrigeración (B), autoclavado del medio NL (C) y dispensión del medio de cultivo de cámara de flujo laminar (D).24	
Figura 2. Colecta de macollos y siembra de anteras en el medio de cultivo de inducción. Colecta de macollos (A), selección de las flores optimas (B), desinfección de las panículas (C) y siembra de las anteras a medios de cultivo de inducción (D).	26
Figura 3. Callogénesis y siembra de callos en medio de cultivo (MS). Callos de 34 días de edad promedio con 2 mm de diámetro (A), callos transferidos a medio (MS) (B) y frascos con callos en medio (MS) puestos perchas con luz fluorescente (C).....	27
Figura 4. Diferenciación de órganos en medio de cultivo (MS) (A) y plantas R1 en medio de aclimatación sin hormonas (B).	28

Figura 5. Número de anteras sembradas en medio de cultivo de inducción de callos <i>in vitro</i> , provenientes de cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.	35
Figura 6. Callos formados y porcentaje de callogénesis obtenidos por cultivo <i>in vitro</i> de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.....	37
Figura 7. Regeneración de plantas de arroz provenientes de cultivo <i>in vitro</i> de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.	38
Figura 8. Porcentaje de regeneración de plantas verdes y albinas <i>in vitro</i> , obtenidas a partir de callos en cruces de arroz tipo japonico.	39
Figura 9. Explantes cultivados en el Laboratorio. Formación de brotes en medio de regeneración obtenido del cruce JP002/JP003 (A), planta verde (B) y albina del cruce JP001/DH (C).	39
Figura 10. Plantas verdes R1 aclimatadas en invernadero, provenientes de cultivo <i>in vitro</i> de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.	40
Figura 11. Días promedio a la formación de callos en medio de inducción, provenientes de cultivo <i>in vitro</i> de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.....	41
Figura 12. Días a la formación de brotes entre los cruces de arroz tipo japonico en medio de cultivo de regeneración <i>in vitro</i> . FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.....	42
Figura 13. Días a la regeneración de brotes provenientes de cultivo <i>in vitro</i> de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.....	43
Figura 14. Intervalo de días, anteras - plantas R1 en invernadero. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.....	43
Figura 15. Desarrollo de las plantas verdes regeneradas en el laboratorio: Plántulas listas para ser trasplantadas (A), trasplante en suelo estéril (B) y plantas aclimatadas en invernadero (C).	44
Figura 16. Esquema en tiempo para la obtención de líneas puras homocigóticas por cultivo de anteras en arroz tipo japonico: Siembra de anteras (A), formación de callos (B), regeneración de plantas (C) y trasplante en invernadero (D).....	44
Figura 17. Días a la floración de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.	45
Figura 18. Ciclo vegetativo de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.	46

Figura 19. Macollos por planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017. ..	47
Figura 20. Panículas por planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017. ..	47
Figura 21. Longitud de hoja bandera (cm) de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	48
Figura 22. Ancho de hoja bandera (mm) de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	49
Figura 23. Altura de planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	50
Figura 24. Plantas aclimatas en invernadero. Individuos: JP001/DH-p2 (A), JP001/DH-p3 (B) y JP001/DH-p4 (C).	50
Figura 25. Longitud de panícula de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	51
Figura 26. Número de granos por panícula de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	52
Figura 27. Porcentaje de esterilidad de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo <i>in vitro</i> de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	52
Figura 28. Desgrane de panículas (%) y variables correspondientes al grano en el individuo JP002/JP003. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	54
Figura 29. Diferentes variables de rendimiento, evaluadas en los diferentes individuos R1 aclimatados en el invernadero. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.	55
Figura 30. Diferentes niveles de ploidía encontrados en la investigación. Individuo Haploide DH/JP004-p1 (A); individuo Doble Haploide JP002/JP003 (B) y, individuo Poliploide JP001/DH-p3 (C).	56

LISTADO DE FÓRMULAS Y ABREVIATURAS

Fórmula/Abreviatura	Definición
(NH ₄) ₂ SO ₄	Sulfato de amonio
CaCl ₂ .2H ₂ O	Cloruro de calcio dihidratado
CoCl ₂	Cloruro de cobalto
CuSO ₄ .5H ₂ O	Sulfato de cobre pentahidratado
FeSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato ferroso heptahidratado
H ₃ BO ₃	Ácido bórico
KH ₂ PO ₄	Fosfato de potasio monobásico
KI	Ioduro de potasio
KNO ₃	Nitrato de potasio
MgSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de magnesio heptahidratado
MnSO ₄ .H ₂ O	Sulfato de manganeso hidratado
Na ₂ EDTA	sodio del ácido etilendiamino tetraacético
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	Molibdato sódico dihidrato
NH ₄ NO ₃	Nitrato de amonio
ZnSO ₄ .7H ₂ O	Sulfato de zinc heptahidratado
2,4-D	Ácido diclorofenoxiacético
ANA	Ácido naftalenacético
BAP	6-benzilaminopurina
AFA	Ácido fenilacético
HOLBRIDGE	Sistema de clasificación de las Zonas de Vida Natural del Mundo

I. INTRODUCCIÓN

El cultivo de arroz (*Oryza sativa* L.) es un cereal de relevante importancia como medio de sobrevivencia y alimentación de la humanidad, cultivándose en agroecosistemas especiales de alta humedad y permanente influencia de factores bióticos y abióticos del medio (Ordeñana, 2012).

Es el cereal más consumido y básico para la alimentación de casi la mitad de la población mundial y representa el 20% del total de energía alimentaria consumida. Contiene el 76.2% de carbohidrato del tipo almidón o fécula, el 9.7% de proteínas y el 0.7% de grasa, lo que equivale a un valor aproximado de 350 calorías por cada 100 gramos de peso crudo. Además, es rico en vitamina B y fibra en estado integral, y es adecuado para los diabéticos siempre y cuando lo consuman en las cantidades recomendadas, debido a que los carbohidratos complejos hacen que el proceso de producción de glucosa sea más lento. Carece de gluten, lo que lo convierte en excelente opción para las personas con celiaquía (intolerancia al gluten) (Alejandro, 2015).

El Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA), estima que la Producción Mundial de Arroz 2016/2017 será de 480.02 millones de toneladas, que podrían significar un incremento de 7.63 millones de toneladas (1.62%), cerca de 1.49 millones de toneladas más de lo estimado hasta diciembre de 2016, que fue de 472.39 millones de toneladas (Producción Mundial del arroz, 2017).

En Ecuador la producción de arroz tiene sus inicios en el siglo XVIII, pero su consumo y comercialización comenzó en el siglo XIX, desarrollándose en un principio en las provincias del Guayas, Manabí y Esmeraldas (Ruiz, 2012).

Según cifras de la Encuesta de Superficie y Producción Agropecuaria Continua (ESPAC), realizada por el Instituto Nacional de Estadísticas y Censos (INEC), en el año 2014, el arroz fue el tercer producto con mayor superficie sembrada, abarcando un 15.34% del área total sembradas. Las áreas arroceras se concentran en las provincias del Guayas (63.85%), Los Ríos (28.19%) y Manabí (4.63%); y debido a las condiciones climáticas y geográficas favorables de las zonas arroceras, se realizan hasta tres ciclos de cultivo anualmente (INEC, 2014). Hasta mayo del 2016 el rendimiento promedio a nivel nacional del arroz en cáscara (20% de humedad y 5 % de impurezas) fue de 4.16 T/Ha, siendo la provincia de Loja la de mayor rendimiento con 8.7 T/Ha, mientras que Los Ríos el más bajo con 3.46 T/Ha (Castro, 2016).

Un ecuatoriano consume en promedio 53,2 kilogramos de arroz al año, lo que equivale a alrededor de 117,04 libras, según cifras del Ministerio de Agricultura, Ganadería, Acuacultura y Pesca (MAGAP). Su alto consumo convierte al sector arrocero en uno de los mayores contribuyentes del Producto Interno Bruto (PIB) agrícola, con el 9,1% de participación (El Telègrafo, 2014)

Para el desarrollo de una agricultura sostenible los Programas de Mejoramiento Genético se han enfocado en el desarrollo de tecnologías y variedades que respondan a las condiciones cambiantes de clima y a las necesidades de cada zona (INIAP, 2012).

Dentro de los sistemas o métodos de mejoramiento genético más utilizados en arroz están: El masal, pedigree y el de retrocruzamiento. Además, de las técnicas de mejoramiento genético ya mencionadas, existen otras, entre las cuales podemos mencionar al cultivo de anteras (Degiovanni, Berrío y Charry, 2010).

El cultivo de anteras es una técnica por medio de la cual es posible producir líneas homocigóticas a partir de segregantes, mediante el doblamiento cromosómico del polen haploide y la regeneración de plantas en un ciclo de cultivo *in vitro*, dando a la formación de un tejido no diferenciado (callo) que culmina en la formación de embriones o plantas, fenómeno conocido como androgénesis. En contraste, por los métodos estándar de fitomejoramiento normalmente se requieren seis generaciones de autofecundación para alcanzar la completa homocigosis en plantas autógamias (Lentini, Reyes, Martínez, Núñez y Roca, 1994).

Lentini, Martínez y Roca (1997) mencionan que al aplicar la técnica del cultivo de anteras se pueden obtener líneas homocigotas en sólo 8-9 meses contabilizados a partir de la siembra de una generación híbrida FI o F2. Mientras que, esta misma estabilidad se logra generalmente en el sistema estándar de mejoramiento después de 5 a 6 generaciones de autopolinización. Por consiguiente, las evaluaciones de rendimiento en los ensayos pueden hacerse mucho antes.

En Ecuador, no se registran antecedentes de mejoramiento genético en función de la subespecie de arroz tipo japonico, siendo de gran importancia por sus propiedades agronómicas y debido a la diversidad genética del arroz para la generación de nuevo germoplasma adaptado a las condiciones agroecológicas de nuestro país.

Por lo expuesto, la presente investigación fue orientada a la generación de líneas homocigóticas de arroz con potencial genético para el desarrollo de germoplasma mejorado a partir de cruces entre poblaciones segregantes F1 de arroz tipo japonico, mediante la técnica de cultivo de anteras, que conlleva a la obtención de nuevas variedades en un menor tiempo, comparado con los métodos convencionales de mejoramiento genético, ahorrando costos, y además; de facilitar el trabajo de selección.

Objetivos

General

- Producir vitroplantas homocigóticas de arroz tipo japonico por inducción de androgénesis en poblaciones segregantes F1.

Específicos

- Obtener vitroplantas de arroz tipo japonico mediante el cultivo *in vitro* de anteras de segregantes F1.
- Determinar el nivel de ploidía de las plantas regeneradas a partir del cultivo *in vitro* de anteras, considerando los caracteres agronómicos.

II. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Descripción taxonómica, morfológica y componentes orgánicos del arroz

Degiovanni *et al.*, (2010) describen que el arroz es una planta perteneciente a la clase de las monocotiledóneas, familias de las gramíneas y al género *Oryza*. Tiene dos clases de raíces: Las seminales o temporales y las adventicias o permanentes. El tallo es una sucesión alterna de nudos y entrenudos, en cada nudo se forma una hoja y yema; esta última da lugar a un hijo o macolla. Las hojas son paralelinérvias alternas y están conformadas de tres partes: La vaina, el cuello y la lámina. La flor contiene seis estambres o filamentos que sostienen las anteras; y el pistilo que contiene el ovario, el estilo y el estigma. La semilla corresponde a un ovario seco e indehiscente que consta de: La cáscara, lemmas estériles y el endospermo.

Según Xu *et al.*, (2008) y Degiovanni *et al.*, (2010), citados por Díaz y Chaparro (2012) los compuestos que constituyen el arroz son esencialmente: almidón, proteínas, grasas, ligninas y cenizas, con trazas de numerosos metales y vitaminas. Con excepción del almidón, todos los demás compuestos se encuentran en las capas externas de la cariósida y en el germen.

2.2. Historia del mejoramiento genético

En la época de la agricultura incipiente, el hombre aprendió a obtener semillas de las plantas silvestres y a sembrarlas para beneficiarse de la cosecha. Poco a poco fue usando algunos procedimientos elementales de selección para mejorar sus cultivos, basados en la simple observación de que los hijos se parecen a los padres. Esa metodología común, aplicada a diferentes formas de producción de las plantas es lo que se denomina “Métodos de

Mejoramiento”. Se sabe que en China desarrollaron variedades mejoradas de arroz hace 6000 años (Camarena, Chura y Blas, 2012).

En los últimos decenios, los mejoradores de plantas han realizado cruzamientos logrando obtener descendencias que proporcionen nuevas características de interés y beneficios para la población mundial (Durzan, 2005).

2.3. Biotecnología aplicada al mejoramiento genético de plantas

La biotecnología puede definirse como el uso integrado de la genética molecular, bioquímica, microbiología y tecnología de procesos, que con aplicaciones de las técnicas de cultivo de tejidos, manipulación y transferencia de genes, tipificación del DNA, selección asistida por marcadores moleculares, selección y clonación de plantas, se puede otorgar resistencia a plagas y enfermedades, sin causar efectos secundarios, en contraste con los efectos perjudiciales que acarrear muchos pesticidas y fertilizantes, además de; incorporarles otras características deseables, tales como: Valor nutritivo, mayor rendimiento y producción de metabolitos secundarios (Camarena *et al.*, 2012).

Durzan (2005) menciona que la biotecnología de plantas ha desarrollado métodos para la introducción de genes exógenos en especies económicamente importantes. Esto comprende todos los métodos de modificación genética, fusión de células, cruzamientos controlados, apomixis y cultivo de tejidos conducentes a la obtención de clones y a la fijación de características ventajosas propias para cada zona, región o país.

Sah, Kaur, Kaur y Cheema (2014) mencionan que el desarrollo de plantas con mayor tolerancia a las tensiones abióticas y bióticas es el reto importante en la investigación de la

biotecnología vegetal. La transformación del arroz es uno de los principales objetivos de la biotecnología de los cereales, ya que el arroz es el cultivo alimenticio más importante del mundo y también se conoce como modelo de genómica de cereales.

2.4. Método genealógico o pedigree

Jennings, Coffman y Kauffman (1981) afirman que el método de pedigree ha sido el más común y exitosamente usado en el mejoramiento del arroz, aunque todavía tiene ciertas desventajas. Este método requiere mucho tiempo para evaluar periódicamente las líneas durante la estación de cultivo y mantener los registros, en los cuales se basa la selección en el momento de la madurez. De todos los métodos de mejoramiento, el de pedigree es el que exige mayor familiaridad con el material y los efectos relativos de genotipo y medio ambiente en la expresión del carácter.

2.5. Método de retrocruzamiento

Jennings *et al.*, (1981) afirman que el retrocruzamiento, es un método por el cual se transfiere un carácter de una variedad mejorada usándola repetidamente como progenitor recurrente. La principal desventaja del retrocruzamiento es que ninguna variedad es tan cercana a la ideal, lo que conduce a mejorar una sola característica. Aunque, los programas de mejoramiento activo están desarrollando continuamente nuevas y mejores variedades para sustituir a las más longevas, ningún programa de arroz tropical ha alcanzado la etapa donde no se ha dado un mejoramiento significativo de la calidad del grano, los rendimientos o la estabilización del potencial de rendimiento.

2.6. Método masal o bulk

Es uno de los métodos de mejoramiento más antiguos, que consiste en la selección de un gran número de individuos, con características fenotípicas similares que luego son mezclados para constituir la generación siguiente. Este método es eficiente en poblaciones heterogéneas, constituidas por mezclas de líneas puras, en especies autóгамas o por individuos heterocigotos en el caso de las 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 (Camarena *et al.*, 2012).

2.7. Cultivo *in vitro* en el mejoramiento genético

Mroginski y Roca (1981) mencionan que el cultivo de tejidos *in vitro* comprende un grupo heterogéneo de técnicas mediante las cuales un explante (parte separada de un vegetal, por ejemplo: Protoplasto, célula, tejido u órgano) se cultiva asépticamente en un medio de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas.

Camarena *et al.*, (2012) mencionan también que las técnicas cultivo *in vitro* se inician a partir de un explante que puede ser un fragmento de tejido u órgano de cualquier parte de la planta (hoja, tallo, raíz, yemas, capítulos florales, anteras, etc.)

El cultivo de tejidos vegetales *in vitro* se ha convertido en el eje sobre el cual giran las nuevas tecnologías del mejoramiento genético de plantas y un mejor conocimiento de los procesos genéticos y fisiológicos de estas. Las condiciones del cultivo *in vitro* (luz, temperatura, hormonas y nutrimentos), favorecen en gran medida esa tendencia, porque son controlables y

facilitan el aprendizaje de los procesos biológicos involucrados en el desarrollo de las plantas (Calderón, Roca y Jaynes, 1991).

Sah *et al.*, (2014) describen que la inducción y regeneración de callos en el cultivo de tejidos de arroz depende de diferentes factores, como el genotipo, el tipo de explante y el suplemento de medios como las sales, el componente orgánico y los reguladores del crecimiento.

2.8. La antera del arroz

Al hacer un corte transversal en la antera, se aprecian los tejidos centrales por donde se conectan al filamento cuatro cavidades denominadas sacos polínicos, dos anteriores y dos posteriores. Cuando ya se han formado los granos de polen, el saco anterior forma una sola cavidad con el respectivo saco posterior, de manera que la antera queda compuesta por sólo dos cavidades, denominadas tecas. La zona más importante de la estructura de la antera es el arqueosporio, parte interna de los sacos en donde se forman los granos de polen (Lentini *et al.*, 1994).

2.9. Genoma del arroz

Puyol (2010) destaca que la secuenciación completa del genoma del arroz fue posible gracias a la participación de centenares de investigadores de 10 países, Japón (aportó el 55% de la secuencia), China (10%) y Estados Unidos (18%). Francia, India, Taiwán, Corea del Sur, Brasil, Tailandia y el Reino Unido, completan la lista de participantes en el Proyecto Internacional para la Secuenciación del Genoma del Arroz IRGSP, un consorcio puesto en marcha en 1998 y que, en apenas cuatro años, seis menos de lo previsto, logró un objetivo comparable por su complejidad a la secuenciación del genoma humano. La secuencia establece que el genoma del

arroz contiene 24 cromosomas con 400 millones de pares de bases químicas (los componentes fundamentales del ADN) y entre 40.000 y 60.000 genes, cifra que podría doblar al número de genes contenido en el genoma humano (entre 30.000 y 40.000 según diversas estimaciones). El grado de confianza o de "cobertura" de la secuencia es, en términos científicos, de "10x" (10 lecturas completas del genoma), nivel que limita la presencia de errores a menos de uno por cada 10.000 bases químicas.

El arroz es la segunda planta en ser decodificada. La primera fue un pequeño y anónimo yuyo llamado *Arabidopsis*, simple y por ende ideal como modelo de laboratorio de investigación biológica (BBC MUNDO, 2002).

En la actualidad, sirve como un genoma de referencia para estudios biológicos, moleculares, y para entender la biología de las plantas, y en especial para proporcionar una mejor visión y entendimiento de las monocotiledóneas (Díaz y Chaparro, 2012).

2.10. Metodologías de generación de plantas haploides y doble haploides

Un "doble haploide" (DH) es un genotipo que se forma cuando las células (n) de un haploide experimentan un proceso espontáneo o inducido artificialmente de duplicación cromosómica (Prasanna, Chaikan y Mahuku, 2013).

Los métodos más ampliamente usados para la creación de haploides duplicados son: La hibridación interespecífica o intergenérica y el cultivo de gametos, sean estos masculinos o femeninos (Camarena *et al.*, 2012).

Entre las diversas técnicas de fitomejoramiento, el cultivo de anteras es útil para desarrollar líneas homocigóticas de poblaciones. Los doble haploides (DH) generados a partir de cultivo de

anteras son una fuente vital de poblaciones homocigóticas permanentes que pueden evaluarse en una amplia gama de entornos (Grewal, Manito y Bartolomé, 2011).

Polci, Conti, Miranda y Gear (2010) mencionan que con el advenimiento de las técnicas biotecnológicas y los avances en biología molecular, han permitido el desarrollo de nuevas herramientas de gran utilidad en el mejoramiento vegetal. Entre éstas; la producción de haploides y doble haploides son herramientas que permiten acortar el tiempo requerido para la obtención de nuevas variedades, siendo un buen complemento para los programas de mejora tradicionales. Al carecer de genotipos heterocigotos, las poblaciones DH necesarias para encontrar genotipos raros pueden ser mucho menos numerosas, especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que éstos no quedan enmascarados por los alelos dominantes.

Los haploides se pueden obtener mediante las siguientes técnicas:

- Ginogénesis: Desarrollo de un gameto femenino no fecundado.
- A partir de alguna célula haploide del saco embrionario distinta del gameto femenino (sinérgidas o antípodas).
- Cruzamientos interespecíficos o intergenéricos con eliminación cromosómica: Interacción núcleo-citoplasma.
- Semigamia: El núcleo del gameto masculino penetra en la ovocélula, pero sin fusionarse con el femenino, ambos núcleos comienzan a dividirse, produciendo un individuo haploide con tejidos de origen materno y paterno.
- Androgénesis: Cultivo de Anteras.

2.11. Cultivo de anteras

Consiste en la siembra de anteras inmaduras en un medio de inducción donde las microsporas originan callos, que luego son transferidos a un medio para la regeneración de plantas. La capacidad de respuesta al cultivo de anteras denominada capacidad androgénica, puede ser evaluada a través de la producción de callos y de plantas verdes (Polci *et al.*, 2010).

Jordan (2005) describe que el cultivo de anteras consiste en que un grano de polen, en una fase temprana de su ontogenia (microspora unicelular o uninuclear, cuya función es fecundar a la megaspóra), cambia de función y constituye un embrión de origen gamético con la reducción de su porción cromosomal (n). Es posible diploidizar tejidos o partes de la planta obteniendo plantas doble haploides, con lo cual se pueden seleccionar directamente pares de genes dominantes o recesivos en una sola generación y haciendo posible emplear este material en cruzamientos posteriores.

Baghery y Jedolar (2008) destacan que, con la técnica de cultivo *in vitro* de anteras en arroz, se logran obtener plantas verdes en dos pasos. El primer paso implica la inducción de callos embriogénicos a partir de microsporas y el paso siguiente trata de la regeneración de las plantas a partir de los callos. La técnica puede ser de uso práctico en programas de mejoramiento genético sólo si puede crear un número suficiente de plantas.

Velásquez, Noguera, Blanca y Mata (2010) establecen que el cultivo se inicia a partir de microsporas en estado uninucleado temprano a medio, donde aún no hay formación de membrana nuclear entre los núcleos en las primeras divisiones mitóticas, lo que hace posible la fusión de dos o más de ellos, originándose así callos diploides o poliploides. Por su parte, cuando

el proceso de cultivo se genera a partir de microsporas en estado uninucleado tardío, se fusionan los núcleos vegetativos y generativos originando un callo diploide.

En caso del arroz, este proceso ocurre a través de la formación de un tejido no diferenciado (callo) que culmina en la formación de embriones y/o plantas, fenómeno conocido como androgénesis. De las plantas producidas aproximadamente, entre 40 y 70% puede ser haploide, triploide o tetraploide; mientras que el otro 60 y 30% es diploide o fértil y de mayor interés para el fitomejorador.

Khush, Brar y Hardy (2003) contribuyen al mencionar que el cultivo de anteras de arroz, es ampliamente utilizado en programas de mejoramiento genético, ya que las plantas DH ofrecen muchas ventajas, debido a sus periodos de desarrollo cortos y una alta eficiencia en la selección de rasgos agronómicos recesivos útiles. El factor más importante a considerar en la aplicación de estas nuevas técnicas, es asegurar plantas regeneradas apropiadas de individuos F1 o F2. Sin embargo, la capacidad de las plantas para regenerarse difiere de genotipo a genotipo. Las variedades indica tienden a ser más recalcitrantes que las variedades japónicas en la inducción de callos y la regeneración de la planta.

Con el cultivo de anteras se acelera el proceso de homocigosis; prácticamente de la generación F1 se pasa directamente al nivel de homocigosis, que se establece en la generación F7, además; se requiere de un menor número de plantas para detectar las combinaciones deseadas (Camarena *et al.*, 2012).

De acuerdo a Torres y Martínez (2010), el procedimiento es el siguiente:

- Las anteras de plantas F1 se colocan en un medio apropiado donde las células del polen haploide producen tejido no diferenciado (callo).

- Se agregan hormonas apropiadas al medio de cultivo, y el callo sostenido en él regenera plántulas.

2.12. Características de las plantas de arroz tipo japonico

Las características más importantes de las plantas de arroz japónicas, se mencionan a continuación: Son de tamaño bajo, con gran color de hojas verdes oscuras estrechas y con macollos a media altura, resistentes al volcamiento y responden mejor al nitrógeno en su rendimiento. Los granos son cortos y redondos, no se rompen con facilidad y tienen bajo contenido de amilosa, haciéndolos húmedos, pegajosos y de un color brillante. Otras características, tales como: La sensibilidad a la temperatura y la tolerancia a la sequía han demostrado que cultivares de arroz tipo japonico crecen predominantemente en regiones templadas, y que las temperaturas bajas de 15-20 °C no afectan la germinación ni el crecimiento vegetativo, lo contrario ocurre con los cultivares índica (McDonald, 1994).

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del ensayo

La investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal de la Facultad de Ciencias Agropecuarias (FACIAG) de la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en el Kilómetro 7 ½ de la vía Babahoyo - Montalvo en las coordenadas geográficas 79° 32' de longitud Oeste y 01° 49' de latitud Sur a 8.0 m.s.n.m. La zona presenta un clima tropical según clasificación de HOLDRIDGE, con temperatura anual de 25.7 °C, una precipitación de 2791.4 mm/año, humedad relativa de 76% y 804.7 horas de heliofanía en promedio anual ^{1/}.

3.2. Material genético

Se utilizaron poblaciones segregantes F1 obtenidas por hibridación a partir de cinco cultivares de arroz tipo japonico que sirvieron como parentales: JP001, JP002, JP003, JP004 y DH.

3.3. Factores estudiados

Fenotipos segregantes F1 de arroz japonico.

3.4. Tratamientos en estudio

El material vegetal utilizado como donante de las anteras, fueron 11 poblaciones segregantes F1 de arroz tipo japonico que fueron cultivadas en invernadero, las cuales son mencionadas en el Tabla 1.

Tabla 1. Poblaciones segregantes F1 de 11 cruces de arroz tipo japonico utilizados en el estudio.

Tratamientos	Cruces F1 ♀/♂	N° de individuos utilizados
1	JP001/ JP002	6
2	JP001/ JP003	6
3	JP001/ JP004	8
4	JP001/ DH	6
5	JP002/ JP001	2
6	JP002/ JP003	7
7	JP002/ JP004	8
8	JP002/ DH	5
9	DH/ JP002	3
10	DH/ JP003	4
11	DH/ JP004	2

3.5. Métodos

Se utilizaron los métodos: Inductivos-Deductivos, Deductivos-Inductivos y el método experimental.

3.6. Análisis Estadístico

Dada la naturaleza de los datos, las variables estudiadas fueron analizadas por medio de estadística descriptiva con la realización de tablas de distribución de frecuencias y gráficos. Adicionalmente, se utilizó estadística no paramétrica (test de Kruskal-Wallis) para el análisis de la variable número de callos formados.

3.7. Materiales y equipos utilizados en laboratorio e invernadero

Los materiales, equipos y reactivos utilizados en este experimento se mencionan en la Tabla 2.

Tabla 2. Materiales, equipos y reactivos utilizados en este experimento.

Materiales	
Cajas Petri	Mascarillas
Cinta blanca	Mechero de alcohol
Erlenmeyer (20, 500, 1000 mL)	Papel aluminio
Espátula	Papel filtro
Filtro 0.5 micrómetro	Papel toalla
Frascos de vidrio con tapa	Papel estéril
Fundas de esterilización	Parafilm
Hielera	Pinzas largas de punta gruesa
Hojas y mangos para bisturí	Pinzas medianas
Macetas plásticas	Plástico de envoltura
Mandil	Probetas (100, 500, 1000 mL)
Marcadores	Regla
Micropipeta	Tarrinas transparentes (250, 500 mL)
Perchas	Vasos graduados (250, 500, 1000 mL)

Reactivos utilizados		
(NH ₄) ₂ SO ₄	Fe ₂ SO ₄ . 7H ₂ O	Myo-Inositol
2,4-D	Glicina	Na ₂ EDTA
Ácido nicotínico	H ₃ BO ₃	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O
AFA	Hidróxido de Sodio	NH ₄ NO ₃
Alcohol	KH ₂ PO ₄	Phytigel
ANA	KI	Piridina – HCl
BAP	KNO ₃	Sacarosa
CaCl ₂ . 2H ₂ O	Maltosa	Soluciones Buffer (4, 7, 10)
Kinetina	MgSO ₄ . 7H ₂ O	Tiamina – HCl
CoCl ₂	MnSO ₄ . H ₂ O	ZnSO ₄ . 7H ₂ O
CuSO ₄ . 5H ₂ O		

Equipos de Laboratorio	
Autoclave	Potenciómetro
Balanzas de precisión	Plato agitador y calentador
Cámara de Flujo Laminar	Destilador de agua
Refrigerador	

3.8. Manejo de los ensayos

3.8.1. Establecimiento de la población F1 en invernadero

Para el manejo del ensayo se dispuso de las siguientes actividades:

3.8.1.1. Pregerminación

Las semillas F1 proveniente de los cruces mencionados, fueron colocadas en platos de Petri para su germinación, con a una lámina de agua de 2 mm, tratados con vitavax, con el objetivo de proteger la semilla de agentes patógenos que indican dañar el proceso de germinación. Las semillas se incubaron durante cinco días a una temperatura de 30 °C.

3.8.1.2. Trasplante de plántulas F1

Se dispuso de macetas con suelo fangueado, después de cinco días de germinadas las semillas, las plantas F1 fueron trasplantadas de manera individual y codificada por cruce.

3.8.1.3. Riego

Esta labor se realizó manteniendo las macetas con una lámina de agua, de acuerdo a los requerimientos hídricos del cultivo, con el objetivo de mantener el suelo a capacidad de campo.

3.8.1.4. Control de malezas

El control de maleza se lo realizó de manera manual, para evitar la competencia por nutrientes y la llegada de plagas y enfermedades.

3.8.1.5. Control de insectos

Se hizo una aplicación de Cypermethrin con una dosis 1,3cc/L, debido a la presencia de insectos barrenadores.

3.8.1.6. Fertilización

El fertilizante edáfico utilizado como fuente de nitrógeno para la nutrición de las plantas fue urea, realizando dos aplicaciones: La primera a los 20 días después del trasplante con dosis de 1,49 g/planta y a los 40 días con dosis de 2,6 g/planta dentro de cada población.

3.8.2. Siembra *in vitro* de las anteras a nivel de laboratorio

3.8.2.1. Formulación de las soluciones madres o stocks para la preparación de los medios de cultivos para inducción de callos y regeneración de plántulas

En la formulación y preparación de medios de cultivo para la inducción de callos y regeneración de plántulas; primeramente se realizaron las soluciones madres o stocks, que consisten en macro y micro elementos, vitaminas y hormonas, que a partir de ellos se preparan los medios utilizados (Figura 1).

En las Tablas 3 y 4 se detallan los componente de las soluciones madres o stocks para la preparación de cultivo de inducción de callos y regeneración de plántulas de arroz.

La dosis y formulación de las soluciones madre para la preparación del medio se detalla en la Tabla 3.

Tabla 3. Soluciones stocks utilizados en la preparación del medio de cultivo NL para inducir callos en arroz.

Solución stock	Componentes	Cantidad (mg)	H ₂ O (mL)	Solución stock/Litro de medio (mL)	Preparación y almacenamiento de soluciones stock
1	(NH ₄) ₂ SO ₄	2320	1000	100	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta un mes.
	KNO ₃	31340			
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	1860			
	CaCl ₂ . 2H ₂ O	1500			
2	H ₃ BO ₃	600	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO ₄ .5H ₂ O se disuelve previamente en 1 mL de agua, de igual forma se disuelve CoCl ₂ antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por 5 meses.
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	1690			
	Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	25			
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1000			
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5			
	CoCl ₂	2.5			
3	TIAMINA - HCl	125	50	1	Disolver en agua destilada y deionizada. Al preparar la solución con Tiamina-HCl, este producto no se disuelve bien y se debe calentar ligeramente. Se puede guardar entre 1 ó 2 meses en refrigeración.
Acido nicotínico	125				
Piridoxina - HCl	125				
Glicina	125				
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	750	100	5	Al preparar las soluciones 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, agitan y se deja enfriar, y luego completar con agua el volumen final. La solución se almacena en un frasco oscuro a temperatura ambiente hasta por 5 meses.
	Fe ₂ SO ₄ . 7H ₂ O	550			

6	2,4-D	50	100	4	La solución 2,4-D se prepara adicionando los 50 mg del compuesto a 5mL de etanol al 50%, calentado levemente en baño de María. Luego se ajusta al volumen de 100 mL con agua a su misma temperatura. Guardar en refrigeración.
7	AFA	100	100	10	Disolver 100 mg de AFA en 50 mL de agua destilada, calentar y ajustar el volumen final a 100 mL con agua, y filtrar a 0.22 micras en cámara de flujo laminar. Almacenar en refrigeración en frasco oscuro.
8	Cinetina	100	100	0,5	La Cinetina se prepara disolviendo los 100 mg en 5 mL de HCl 0.5 N. Se calienta hasta que se disuelva, y 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 hasta por 1 mes.

Preparación de 1 litro de medio NL 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 1L.
5. Ajustar el pH a 5.8.
6. Esterilizar el medio en autoclave a 121 °C de temperatura y 20 psi de presión, durante 15 minutos.

7. Enfriar, adicionar el AFA en cámara de flujo laminar (esterilizado con filtro 0.22 micras), dispensar 10 mL en recipientes de 25 mL y almacenar en un lugar frío, hasta por 2 meses.

Tabla 4. Soluciones stocks para la preparación del medio de cultivo Murashige & Skoog modificado, para la regeneración de callos en arroz.

Solución stock	Componentes	Cantidad (mg)	H ₂ O (mL)	Solución stock/Litro de medio (mL)	Preparación y almacenamiento de soluciones stocks
1	NH ₄ NO ₃	82400	1000	20	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 1 meses
	KNO ₃	95200			
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	18400			
	KH ₃ PO ₄	8400			
2	H ₃ BO ₃	620	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. El CuSO ₄ .5H ₂ O y el CoCl ₂ se disuelven en 1 mL de agua c/u, antes de incorporarse a la solución stock. Mantener en refrigeración hasta por un periodo de 5 meses.
	MnSO ₄ . 4H ₂ O	1692			
	ZnSO ₄ . 7H ₂ O	860			
	CuSO ₄ . 5H ₂ O	2.5			
	CoCl ₂	2.5			
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	
5	Na ₂ EDTA	750	100	5	Al preparar las soluciones 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, se agitan y se deja enfriar para luego completar con agua al volumen final. La solución se almacena en un frasco oscuro a temperatura ambiente hasta por 5 meses.
	Fe ₂ SO ₄ . 7H ₂ O	550			

6	Tiamina - HCl	10	100	1	Disolver en agua destilada y deionizada. 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.
	Ácido nicotínico	50			
	Piridoxina - HCl	50			
	Glicina	200			
7	Myo-Inositol	5000	500	10	Disolver en agua destilada y deionizada. Mantener en refrigeración hasta por 2 meses.
8	ANA	200	200	0.5	La solución de ácido naftalenacético se prepara disolviendo 200 mg en aproximadamente 5 mL de KOH 0,5 N. Luego se calienta a baja temperatura hasta disolver, luego se completa con agua el volumen final a 200 mL. Se aconseja preparar esta solución semanalmente.
9	BAP	500	500	0.5	La solución se prepara disolviendo 200 mg en aproximadamente 5 mL de KOH 0,5 N. Se aconseja preparar esta solución semanalmente.

Preparación de 1 litro de medio MS para la 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 1L.
5. Ajustar el pH a 5.8.

6. Adicionar 1.5 g de Phytigel.
7. Esterilizar en autoclave a 121° C 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



Figura 1. Preparación de soluciones stock (A), soluciones stock en refrigeración (B), autoclavado del medio NL (C) y dispensión del medio de cultivo de cámara de flujo laminar (D).

3.8.2.2. Colecta de macollas para la obtención de anteras en el Laboratorio

Se realizó la colecta de macollas para el cultivo de anteras, que de acuerdo al genotipo y las condiciones ambientales, de 60 días aproximadamente, ya que es el momento del embuchamiento de la planta, donde las flores se encuentran en el interior de las panículas en estado de microsporas uninucleados.

Para reconocer el momento idóneo de la colecta de las macollas, se observó la distancia óptima de la hoja bandera y la última aurícula, los cuales están en el rango de 4 y 8 cm. Se corta la macolla, rotuladas por cruce con cinta adhesiva colocadas dentro de una hielera para evitar su deshidratación y posterior transporte al laboratorio. Este trabajo se lo realizó en las primeras horas de la mañana (Figura 2, A).

3.8.2.3. Esterilización y selección de flores idóneas para la inducción de callos

Se esterilizaron las macollas colectadas de manera superficial sumergiéndolas con etanol al 90% en una probeta de vidrio, para luego pasar a la cámara de flujo laminar, a retirar las flores de las panículas, dejando solo el tercio medio de manera invertida y colocarlas en un recipiente de vidrio con agua destilada estéril para su posterior siembra en el medio de cultivo de inducción (Figura 2, B y C).

3.8.2.4. Siembra de las anteras en medio de cultivo para la inducción de callos

Se tomaron las panículas que estaban dentro del recipiente con agua destilada con ayuda de una pinza pequeña y se las colocó en un plato de Petri, donde fueron cortadas por su base con un bisturí estéril, con el fin de cortar los filamentos que mantienen unidas las anteras con la cariósida

Después con una pinza grande, se tomaron las flores del extremo no cortado y con ligeros golpes al borde del recipiente, permitir que estas caigan y queden inoculadas en 20 mL de medio cultivo, que posteriormente quedan sellados con parafilm. Estos recipientes fueron puestos en un lugar oscuro para promover el proceso de la androgénesis, donde interviene la

división mitótica de las microsporas a una temperatura de 24 °C, por un lapso de 34 días promedio (Figura 2, D).

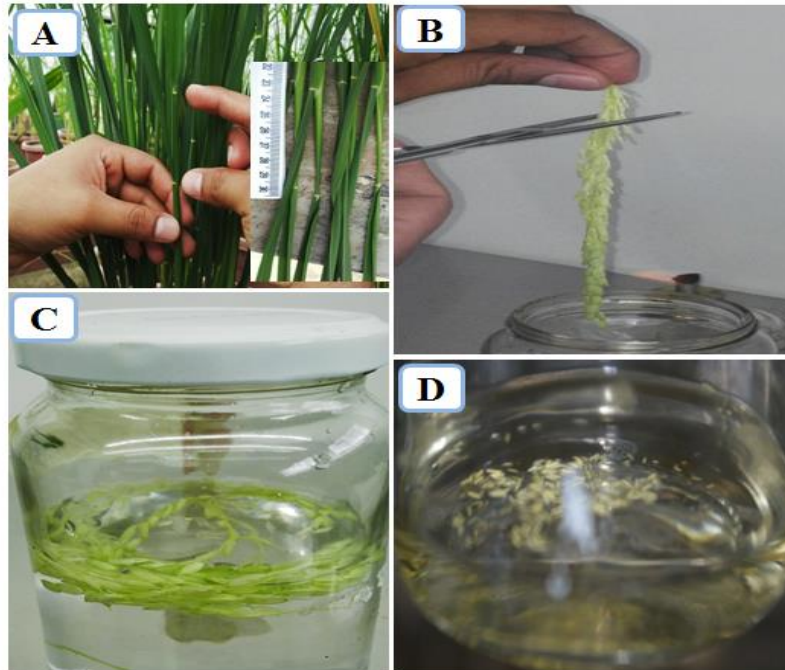


Figura 2. Colecta de macollos y siembra de anteras en el medio de cultivo de inducción. Colecta de macollos (A), selección de las flores optimas (B), desinfección de las panículas (C) y siembra de las anteras a medios de cultivo de inducción (D).

3.8.2.5. Transferencia de callos al medio de regeneración de plantas (MS)

Primeramente se prepararon las soluciones madres para la utilización en el medio de cultivo para la regeneración de los callos, el cual estuvo compuesto como se detalló en la Tabla 4. En el caso de medio de cultivo de regeneración de plantas se dispuso de phytigel, que es un compuesto gelificante que ayuda a mantener semimóvil los callos, y que al momento de la diferenciación de órganos como raíz y hojas, estos se mantengan erguidos para evitar la caída o el choque con las paredes del material en donde se encuentra el medio de cultivo y los órganos diferenciados.

Cuando la gran mayoría de los callos alcanzaron el diámetro óptimo de 2 mm a los 34 días promedio (Figura 3, A), se realizó la siembra en medio de cultivo sólido de regeneración de plantas. Primeramente, se agregó todo el medio de cultivo de inducción de callos dentro un frasco conteniendo el medio de regeneración de plantas (MS), y con una pinza se tomaron los callos y se sembraron en otro recipiente conteniendo medio de cultivo de regeneración de plantas, sembrado entre 5 y 10 callos por recipiente para su diferenciación de órganos como raíces y hojas (Figura 3, B).

Los recipientes fueron puestos en una percha con luz directa de 80 a 100 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ durante 12 horas/día, la cual se logra con lámparas fluorescentes tipo luz día para simular la luz generada por el sol y estimular la diferenciación de órganos (Figura 3, C).

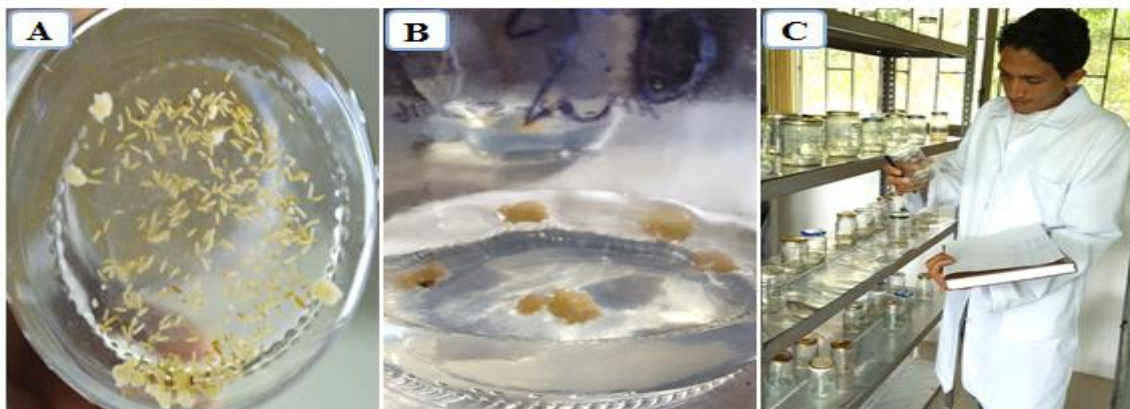


Figura 3. Callogénesis y siembra de callos en medio de cultivo (MS). Callos de 34 días de edad promedio con 2 mm de diámetro (A), callos transferidos a medio (MS) (B) y frascos con callos en medio (MS) puestos perchas con luz fluorescente (C).

3.8.2.6. Transferencia de callos con órganos formados en medio de aclimatación de plantas sin hormonas.

Después que los callos transferidos a medio de regeneración de plantas, desarrollaron pequeños órganos foliares y radicales, estos se los traspasó recipientes plásticos con medio de

cultivo de regeneración, pero sin la suplementación de hormonas para que se produzca la regeneración completa de las plantas R1 para su posterior trasplante en invernadero.

Igualmente, las dosis y preparación del medio es igual a la presentada en la Tabla 4, pero con la diferencia que al final de la preparación del medio no se agrega ningún tipo de hormona (ANA y BAP).

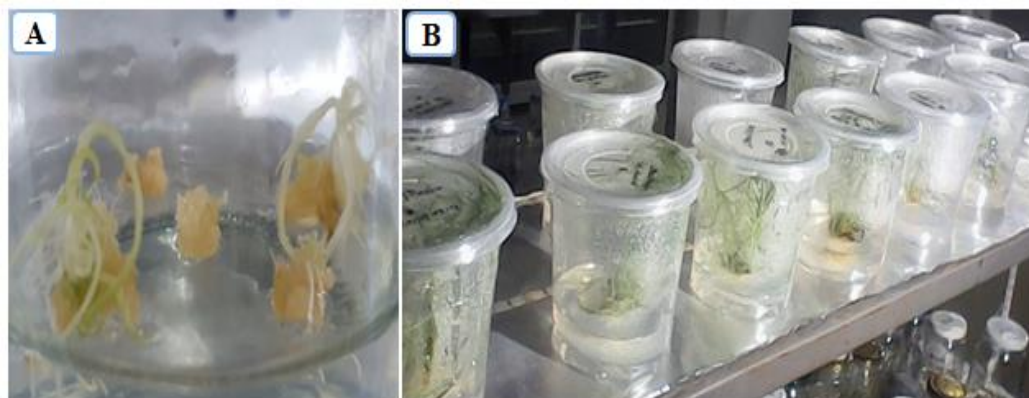


Figura 4. Diferenciación de órganos en medio de cultivo (MS) (A) y plantas R1 en medio de aclimatación sin hormonas (B).

3.8.3. Establecimiento de la población R1 en el invernadero obtenida a partir de cultivo de anteras

Al momento que las plantas desarrollaron un buen sistema radicular y foliar, sus recipientes fueron destapados y dejados por un día dentro de la cámara de flujo laminar. Luego se las llevó al invernadero donde se las dejó por otro día dentro del medio de cultivo en el que estaban. Al siguiente día, las plantas fueron retiradas manualmente del medio y lavadas con agua destilada para eliminar el sobrante del medio de cultivo sólido en el que se encontraban. Finalmente, se las trasplantó en macetas con suelo estéril. La fertilización se la realizó utilizando como enmienda nutricional edáfica 3 g de urea y 3 g de 8-20-20 a los 20 y 40 días de edad después del trasplante

de las plantas R1. Posteriormente, se realizó todo el mantenimiento y evaluaciones respectivas hasta la cosecha de las plantas R1 aclimatadas en invernadero.

3.9. Variables evaluadas

3.9.1. Cultivo *in vitro* de anteras en arroz tipo japonico

3.9.1.1. Número de anteras sembradas

Esta variable se la registró al contar el número de anteras sembradas de todos los tratamientos.

3.9.1.2. Número de callos formados

Se contó el número de callos obtenidos por el total de anteras sembradas, provenientes de los cruces antes mencionados. A partir de estos datos se calculó su callogénesis (porcentaje de generación de callos).

3.9.1.3. Número de plántulas regeneradas

Se registró el total de plantas regeneradas y su porcentaje de regeneración, ya sean estas verdes o albinas, a partir de los tratamientos antes mencionados.

3.9.1.4. Número de plántulas aclimatadas

Se registró el número de plantas verdes de los tratamientos antes mencionados que fueron aclimatadas en invernadero, donde se evaluó todas sus características agronómicas desde su trasplante hasta la cosecha.

3.9.1.5. Días a la formación de callos

Se registró el promedio de los días a la formación de callos, desde que fueron sembradas las anteras en medio de cultivo de inducción de callos.

3.9.1.6. Días a la formación de brotes foliares

Se registró el promedio del número de días a la formación de brotes, desde que los callos fueron sembrados en medio de cultivo de regeneración de plantas.

3.9.1.7. Días a la regeneración de plantas

Se registró promedio del número de días a la regeneración de plantas, desde que las anteras fueron sembradas en medio de cultivo de inducción de callos.

3.9.1.8. Intervalo en días, anteras – plantas R1

Se contó los días que transcurrieron desde la siembra de las anteras, hasta el trasplante de las plantas R1 en invernadero.

3.9.2. Características agronómicas del material genético R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir del cultivo *in vitro* de anteras

3.9.2.1. Días a la floración

En esta variable se registraron desde los días transcurridos de la siembra hasta más del 50% de las panículas estuvieron fuera de la vaina.

3.9.2.2. Ciclo vegetativo

Se contabilizaron los días transcurridos desde la siembra en invernadero hasta la respectiva cosecha de las plantas aclimatadas.

3.9.2.3. Macollos por planta

Se contabilizó el número de macollas que desarrollaron las plantas aclimatadas hasta el momento de su cosecha.

3.9.2.4. Panículas por planta

Se determinó el número de panículas que generaron las plantas aclimatadas al momento de su cosecha.

3.9.2.5. Longitud (cm) y ancho de la hoja bandera (mm)

Se midió la longitud y ancho de la hoja bandera al momento de su floración de las plantas aclimatadas.

3.9.2.6. Altura de planta (cm)

Al momento de la cosecha se midió la longitud existente desde el nivel del suelo, hasta el ápice de la panícula más sobresaliente de las plantas aclimatadas.

3.9.2.7. Longitud de panícula (cm)

Se determinó promediando la distancia existente entre el nudo ciliar y el ápice de 5 panículas maduras de cada planta aclimatada.

3.9.2.8. Granos por panículas

Se promedió el número de granos contenidos en 5 panículas maduras de cada planta aclimatada.

3.9.2.9. Esterilidad de panícula (%)

Se evaluó mediante la contabilización del total de granos contenidos en 5 panículas, relacionando los granos fértiles (llenos) y estériles (vanos) para determinar su porcentaje de esterilidad.

3.9.2.10. Desgrane (%)

Se evaluó el porcentaje de desprendimiento del total de granos contenidos en 5 panículas maduras escogidas aleatoriamente de las plantas aclimatadas; sosteniéndolas y apretándolas levemente cada una con los dedos. Esta acción hace que se desprendan algunos granos que sirven para la realización del cálculo del desgrane. Con este valor se aplicó la escala del sistema de evaluación estándar del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (Muñoz, Giraldo y Fernández, 1993), presentada en la Tabla 5.

Tabla 5. Escala de evaluación estándar para arroz CIAT (desgrane %)

Escala de desgrane		
Difícil	0 – 15%	1
Moderadamente difícil	16 – 30%	3
Intermedio	31 – 45%	5
Moderadamente susceptible	46 – 60%	7
Susceptible	+ de 61%	9

3.9.2.11. Peso de 1000 granos (g)

Se tomaron 1000 granos en óptimas condiciones fitosanitarias; luego fueron pesados en una balanza de precisión expresando su peso en gramos.

3.9.2.12. Longitud de grano descascarado (mm)

Se tomaron 5 granos escogidos al azar, a los que se les quitó la cáscara y se los midió con un escalímetro. Para la determinación de ésta variable, se utilizó la escala del sistema de evaluación estándar para arroz del CIAT (Jennings *et al.*, 1981), presentada en la Tabla 6.

Tabla 6. Escala del sistema de evaluación estándar para arroz CIAT (Longitud y ancho del grano descascarado).

Designación	Longitud (mm)	Escala
Extra largo	7.50 +	1
Largo	6.61 - 7.50	3
Medio	5.51 - 6.60	5
Corto	- de 5.50	7
Extra corto		9

3.9.2.13. Forma del grano

Se determinó la relación largo/ancho de granos enteros, para lo cual se utilizó la escala del sistema de evaluación estándar para arroz del CIAT (Jennings *et al.*, 1981) presentada en la Tabla 7.

Tabla 7. Escala del sistema de evaluación estándar para arroz del CIAT (Forma del grano)

Forma	Longitud: ancho (mm)	Escala
Delgado	3.0 +	1
Medio	2.1 -3.0	3
Ovalado	1.1 - 2.0	5
Redondo	- de 1.1	9

3.9.2.14. Nivel de ploidía en plántulas aclimatadas en invernadero

El nivel de ploidía se evaluó de acuerdo a lo mencionado por (Lentini *et al.*, 1997). Cuando las plantas R1 han alcanzado la madurez se evalúa 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 fértiles con un desarrollo similar al de las plantas derivadas de semilla. Los poliploides son plantas que generalmente muestran un mayor crecimiento, con estructuras florales más desarrolladas, granos con aristas largas y parcialmente estériles.

IV. RESULTADOS

4.1. Cultivo *in vitro* de anteras de arroz tipo japonico

4.1.1. Número de anteras sembradas

Los valores correspondientes a la variable de número de anteras sembradas, muestran que el cruce DH/JP004 obtuvo el mejor resultado con un promedio de 500 anteras, mientras que los cruces JP002/JP001 y JP002/JP003 presentaron el valor más bajo, donde sólo se sembraron 100 anteras por cada cruce correspondiente, presentándose un promedio general de 245 anteras entre todos los cruces (Figura 5). Todos los valores correspondientes a la variable evaluada se presentan en la Tabla 8.

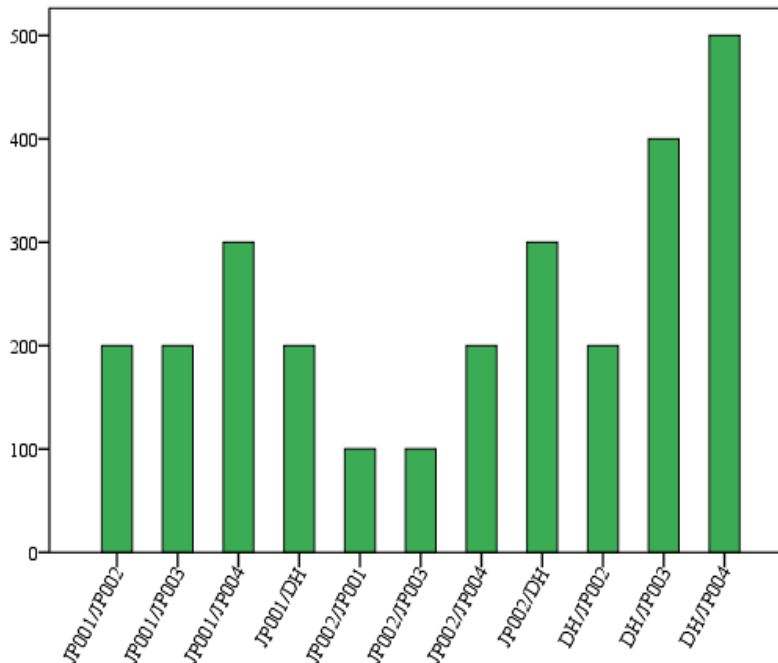


Figura 5. Número de anteras sembradas en medio de cultivo de inducción de callos *in vitro*, provenientes de cruces de arroz tipo japónica. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

Tabla 8. Variables evaluadas desde la siembra de las anteras en medio de cultivo de inducción de callos *in vitro*, hasta la aclimatación en invernadero.

Tratamientos ♀ / ♂	N° Anteras sembradas	N° Callos formados (%)	N° Plantas regeneradas (%) [†]	N° Plantas verdes (%) [‡]	N° Plantas albinas (%) [§]	N° Plantas aclimatadas (%) [¶]
JP001/JP002	200	0 (0) ^{¶¶}	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
JP001/JP003	200	16 (8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
JP001/JP004	300	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
JP001/DH	200	45 (22.5)	15 (33.3)	4 (26.6)	11(73.3)	4 (100)
JP002/JP001	100	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (100)
JP002/JP003	100	16 (16)	5 (31.25)	1 (20)	4 (80)	1 (100)
JP002/JP004	200	49 (24.5)	4 (8.16)	1 (25)	3 (75)	1 (100)
JP002/DH	300	13 (4.3)	3 (23.07)	0 (0)	3 (100)	0 (0)
DH/JP002	200	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
DH/JP003	400	130 (32.5)	3 (2.3)	1 (33.3)	2 (66.6)	1 (100)
DH/JP004	500	8 (1.6)	4 (50)	3 (75)	1 (25)	3 (100)
Total	2700	277(9.94)	34(25)	10 (30)	24(70)	10 (100)
Promedio	245	25.18	6	2	4	2

[†]Porcentaje de regeneración

[§] Porcentaje de plantas albinas

^{¶¶} Porcentaje mostrado entre paréntesis

[‡] Porcentaje de plantas verdes

[¶] Porcentaje de plantas aclimatadas

4.1.2. Número de callos formados

En cuanto a valores correspondientes de la variable número de callos formados (Tabla 8), la mejor respuesta se encontró en el cruce DH/JP003 con la generación de 130 callos, obteniéndose un porcentaje de callogénesis de 33%. Al contrario, la menor respuesta la mostró el cruce DH/JP004 con 8 callos formados y un porcentaje de callogénesis de 1.6%. El promedio general de callos formados fue de 25.18 callos y 9.94% de callogénesis. Se destaca que los cruces JP001/JP002, JP001/JP004, JP002/JP001 y DH/JP002 no formaron callos por lo cual no se pudo calcular su porcentaje de callogénesis (Figura 6).

Tabla 9. Significancia estadística del total callos formados en medio de cultivo de inducción de callos *in vitro*, provenientes de cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

Tratamientos ♀/♂	Medias	Rangos	Significancia
JP001/JP002	0	4	A
JP001/JP004	0	4	A
JP002/JP001	0	4	A B
DH/JP002	0	4	A B
DH/JP004	2	9.5	A B
JP002/DH	4.33	13	A B C
JP001/JP003	8	15.5	A B C
JP002/JP003	16	17	A B C
JP002/JP004	24.5	18.5	B C
DH/JP003	43.33	21.67	B C
JP001/DH	45	22.5	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

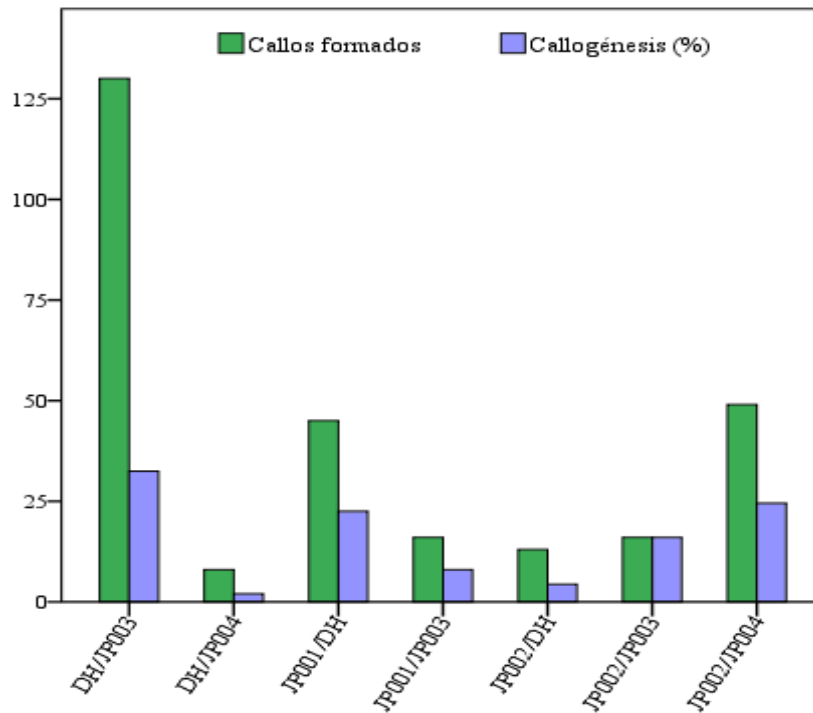


Figura 6. Callos formados y porcentaje de callogénesis obtenidos por cultivo *in vitro* de anteras, en cruces de arroz tipo japónica. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

Se determinó la efectividad de los cruces para formar callos, dada la naturaleza de los datos y su distribución, se encontró que el JP001/DH difiere significativamente ($p > 0.05$) entre todos los demás, resultando ser el más efectivo para la formación de callos. Las diferencias significativas entre los cruces se muestran en la Tabla 9.

4.1.3. Número de plantas regeneradas

En cuanto al número de plántulas regeneradas (Tabla 8), provenientes de los callos formados y cultivados en medio de cultivo de regeneración de plantas, el mejor resultado lo mostró el cruce JP001/DH, generando un total de 15 plantas, representando un porcentaje del 33.33%; a diferencia de los cruces JP002/DH y DH/JP003 que presentaron el valor más bajo (3 plantas) (Figura 7), calculándose un promedio general de 6 plantas. El cruce JP001/JP003 no logró regenerar ninguna planta.

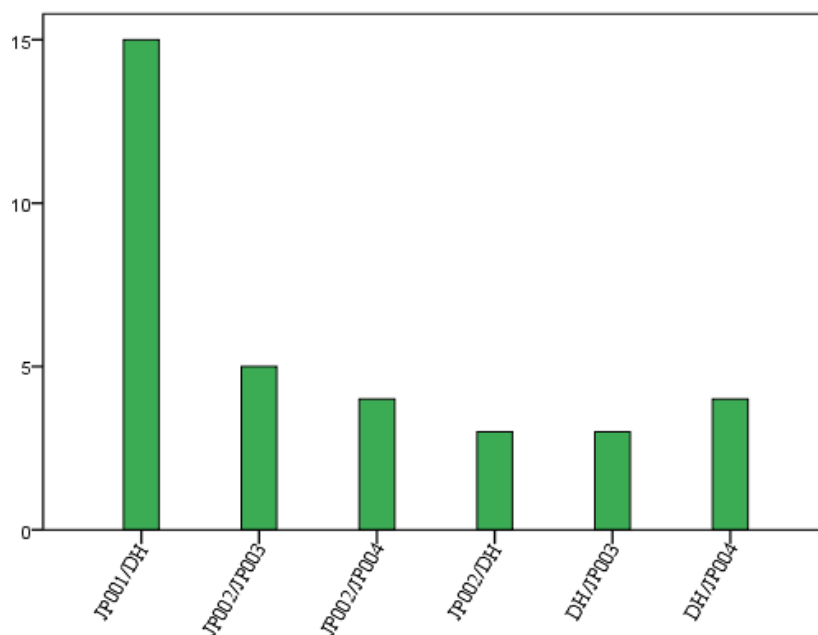


Figura 7. Regeneración de plantas de arroz provenientes de cultivo *in vitro* de anteras en cruces de arroz tipo japónica. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

Del total de plántulas obtenidas, se observaron dos tipos: Plantas albinas y plantas verdes (Tabla 8). El cruce DH/JP004 obtuvo el mayor porcentaje de plantas verdes (75%) y teniendo un 25% de plantas albinas; mientras que en los demás cruces se encontró un porcentaje de plantas albinas superior al 66.6%. El promedio general de plantas albinas y verdes fue de 70 y 30% respectivamente, lo cual indica que hay superioridad de albinismo en la mayoría de los cruces (Figura 8). Las plántulas albinas murieron cuando fueron sometidas a aclimatación.

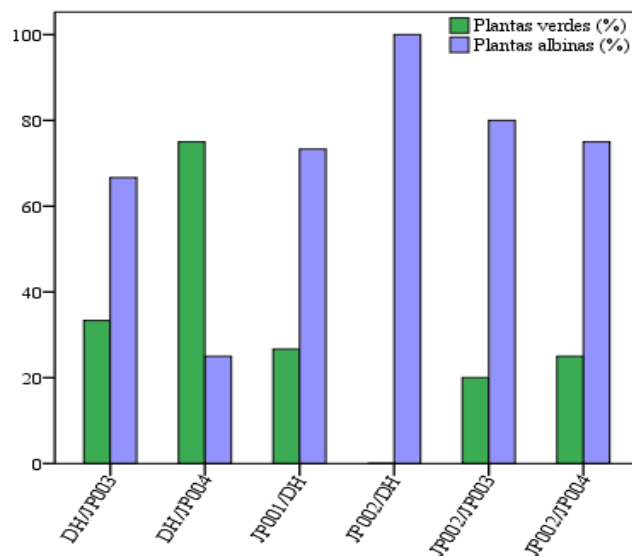


Figura 8. Porcentaje de regeneración de plantas verdes y albinas *in vitro*, obtenidas a partir de callos en cruces de arroz tipo japónica.

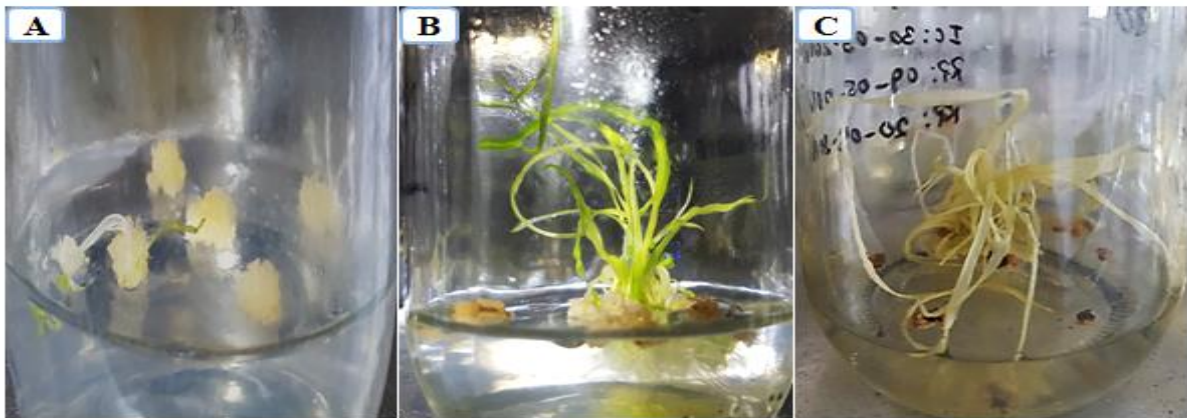


Figura 9. Explantes cultivados en el Laboratorio. Formación de brotes en medio de regeneración obtenido del cruce JP002/JP003 (A), planta verde (B) y albina del cruce JP001/DH (C).

4.1.4. Número de plantas aclimatadas en invernadero

El total plantas verdes regeneradas en laboratorio (10 plantas) (Tabla 8), se llevaron a la fase de invernadero, las cuales correspondían a los cruces JP001/DH (4 plantas), DH/JP004 (3 plantas), JP002/JP004, DH/JP003 y JP002/JP003 (1 planta c/u) (Figura 10). En el invernadero el porcentaje de aclimatación fue de un 100%.

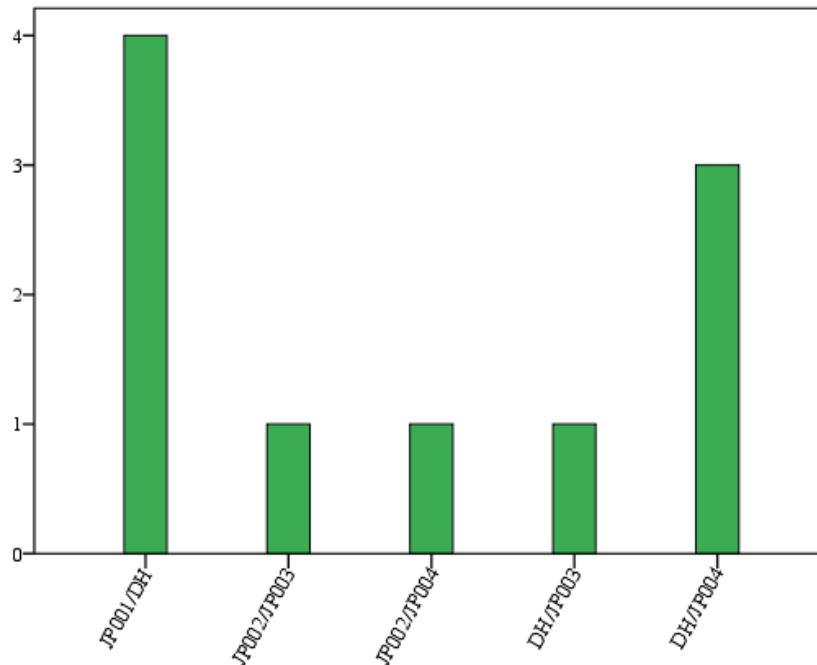


Figura 10. Plantas verdes R1 aclimatadas en invernadero, provenientes de cultivo *in vitro* de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

4.1.5. Días a la formación de callos

La variable correspondiente al promedio de días a la formación de callos (Tabla 10), mostró que los cruces JP001/JP002, JP002/JP004 y JP001/DH presentaron su formación de callos en un promedio de 32 días; mientras que, el que más tardó fue el JP001/JP003 con 43 días. Los callos se presentaron como una masa de células de tejido no diferenciado con un tamaño de 2 mm, que

se observaron después que las anteras fueron sembradas en medio de inducción de callos. En la Figura 11, se observa de manera gráfica los valores obtenidos de esta variable.

Tabla 10. Días transcurridos de la siembra de las anteras en medio de cultivo de inducción de callos *in vitro*, hasta la aclimatación en el invernadero.

Tratamientos ♀/♂	Días (promedio)				
	Formación de callos	Formación de brotes foliares	Regeneración de plantas	Aclimatación de plantas	Anteras - Plantas R1 en invernadero (días)
JP001/JP003	43	-	-	-	-
JP001/DH	32	27	73	19	150
JP002/JP003	32	23	62	19	150
JP002/JP004	32	28	78	19	150
JP002/DH	35	29	71	-	-
DH/JP003	34	29	68	19	150
DH/JP004	35	29	71	19	153
Promedio	34	27	70	19	150

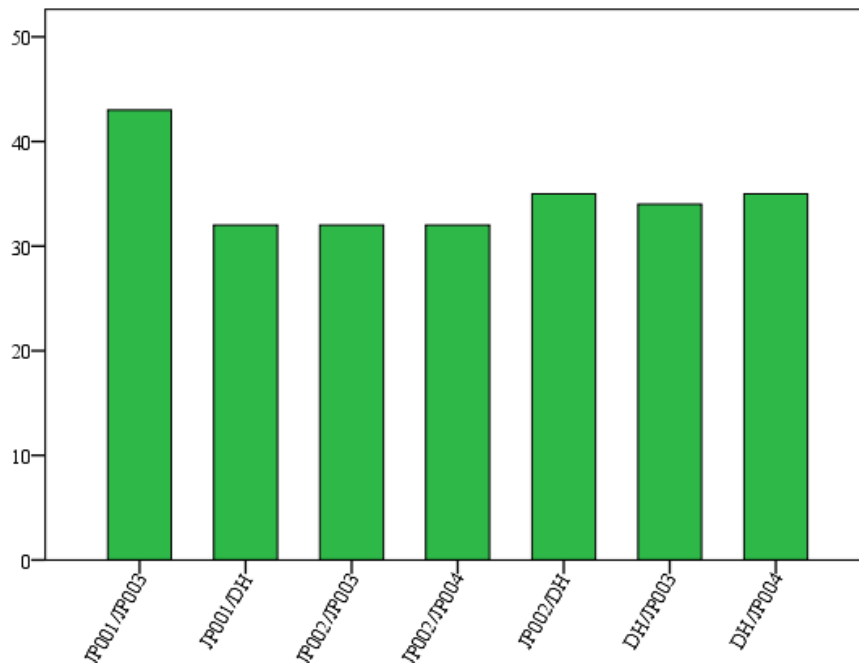


Figura 11. Días promedio a la formación de callos en medio de inducción, provenientes de cultivo *in vitro* de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017

4.1.6. Días a la formación de brotes

En lo correspondiente a los días de formación de brotes (Tabla 10), se encontró que el cruce JP002/JP003 presentó la mejor respuesta a la formación de brotes a los 23 días. Al contrario, los cruces DH/JP003, JP002/DH y DH/JP004 presentaron un promedio de 29 días para ver la respuesta a la diferenciación de sus estructuras foliares (Figura 12). El promedio general fue de 27 días.

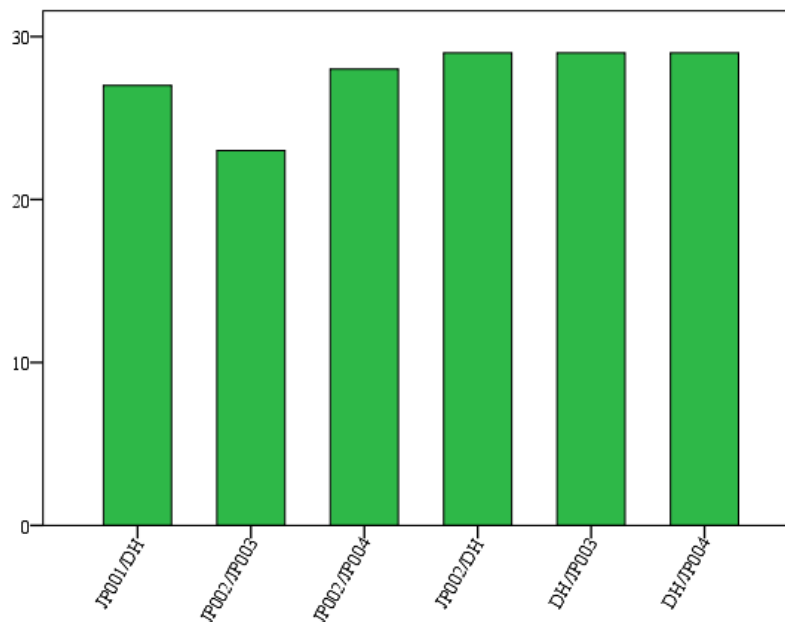


Figura 12. Días a la formación de brotes entre los cruces de arroz tipo japonico en medio de cultivo de regeneración *in vitro*. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017

4.1.7. Días a la regeneración de plantas

En los respecta al promedio de días a la regeneración de plantas (Tabla 10), el cruce JP002/JP003 mostro un menor valor, donde las plántulas se regeneraron a los 62 días; siendo el cruce JP002/JP004 el más tardío con 78 días (Figura 13). El promedio general fue de 70 días.

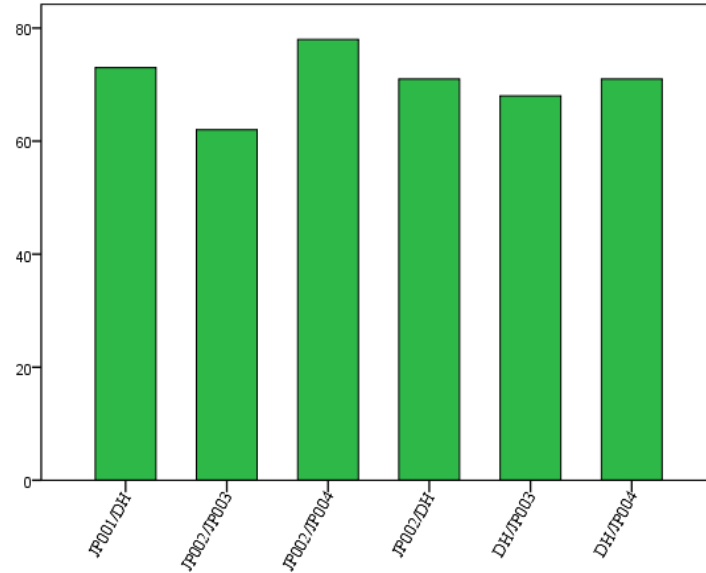


Figura 13. Días a la regeneración de brotes provenientes de cultivo *in vitro* de anteras, en cruces de arroz tipo japonico. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

4.1.8. Intervalo de días, anteras – plantas R1

Los cruces JP001/DH, JP002/JP003, JP002/JP004 y DH/JP003 se trasplantaron a los 150 días y el cruce DH/JP004 se trasplantó a los 153 días (Tabla 10), material que se mantuvo hasta la cosecha de la semilla R1 (Figuras 14 y 15).

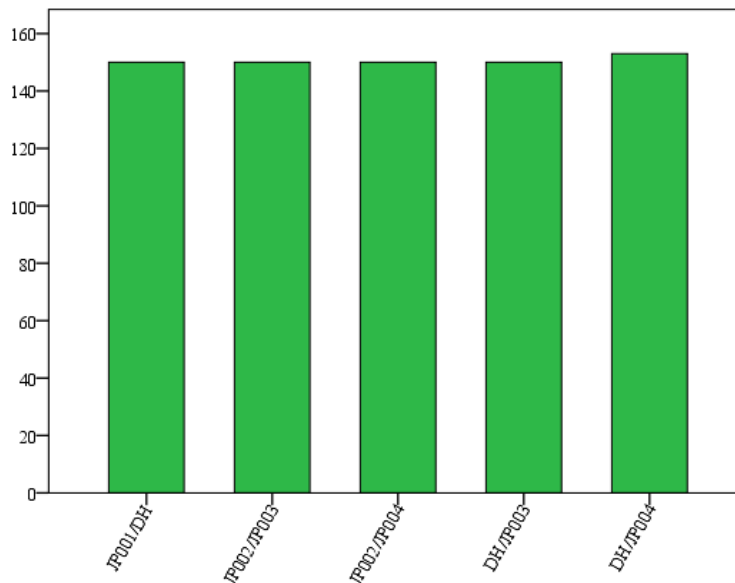


Figura 14. Intervalo de días, anteras - plantas R1 en invernadero. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.



Figura 15. Desarrollo de las plantas verdes regeneradas en el laboratorio: Plántulas listas para ser trasplantadas (A), trasplante en suelo estéril (B) y plantas aclimatadas en invernadero (C).

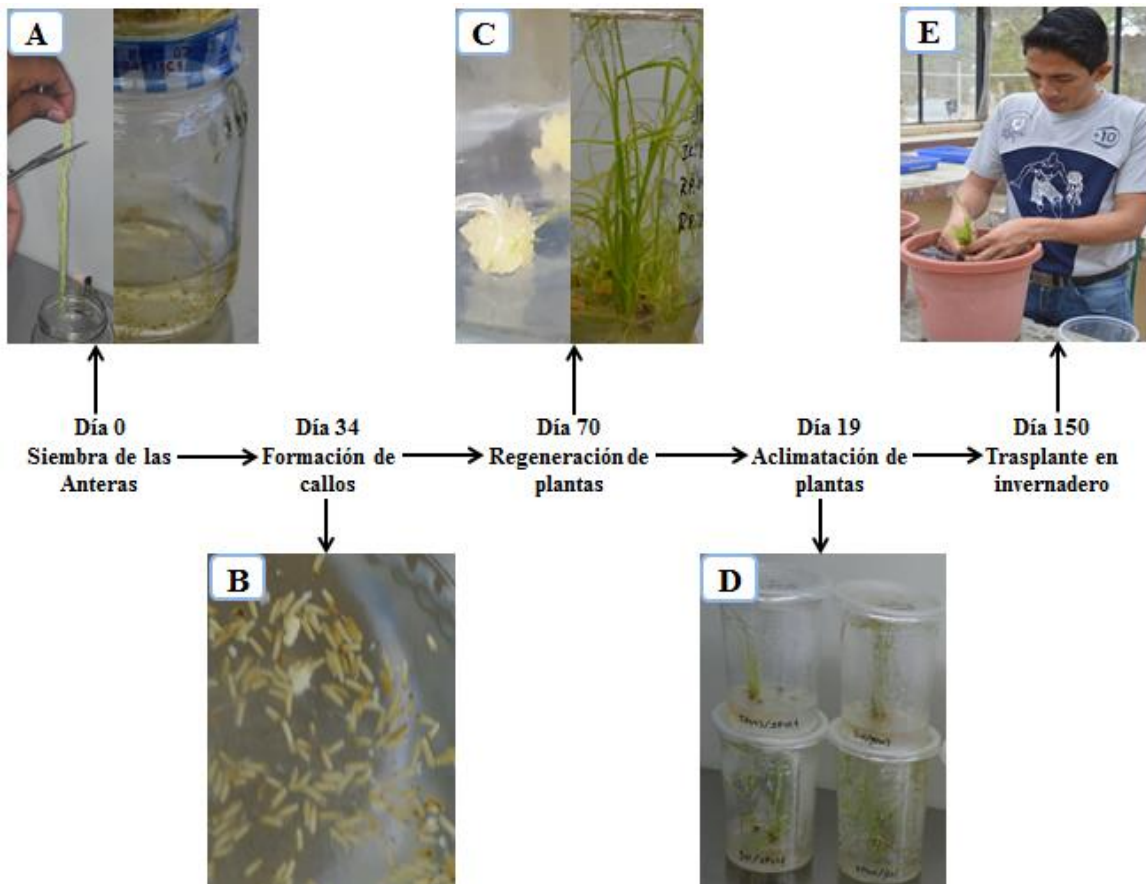


Figura 16. Esquema en tiempo para la obtención de líneas puras homocigóticas por cultivo de anteras en arroz tipo japonico: Siembra de anteras (A), formación de callos (B), regeneración de plantas (C), aclimatación de plantas (D) y trasplante en invernadero (E).

4.2. Caracteres agronómicos del material genético R1, obtenidos a partir del cultivo *in vitro* de anteras en cruces de arroz tipo japonico

4.2.1. Días a la floración

De acuerdo a los resultados obtenidos en esta variable, se observó que el individuo DH/JP004-p3 presentó el menor número de días a la floración con 43 días, mientras que el cruce JP002/JP003 fue el más tardío con 61 días (Tabla 11 – Figura 17).

Tabla 11. Días a la floración, ciclo vegetativo (días), macollos/planta y panículas/planta de poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

Individuos ♀/♂	Días a la floración	Ciclo vegetativo (días)	Macollos/ planta	Panículas/ planta
JP001/DH-p1	54	87	13	10
JP001/DH-p2	47	87	85	80
JP001/DH-p3	50	87	70	68
JP001/DH-p4	54	87	34	24
JP002/JP003	61	106	7	7
JP002/JP004	57	92	54	50
DH/JP003	57	92	40	32
DH/JP004-p1	43	94	15	15
DH/JP004-p2	50	94	34	31
DH/JP004-p3	43	94	20	12

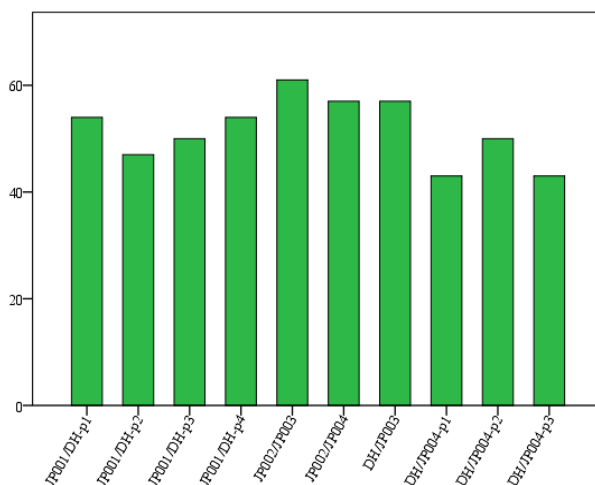


Figura 17. Días a la floración de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

4.2.2. Ciclo vegetativo (días)

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta variable, se observa que el cruce JP002/JP003 obtuvo el mayor valor de días a la cosecha (106), en contraste a los individuos perteneciente al cruce JP001/DH que tuvieron un ciclo vegetativo de 87 días (Tabla 11 – Figura 18).

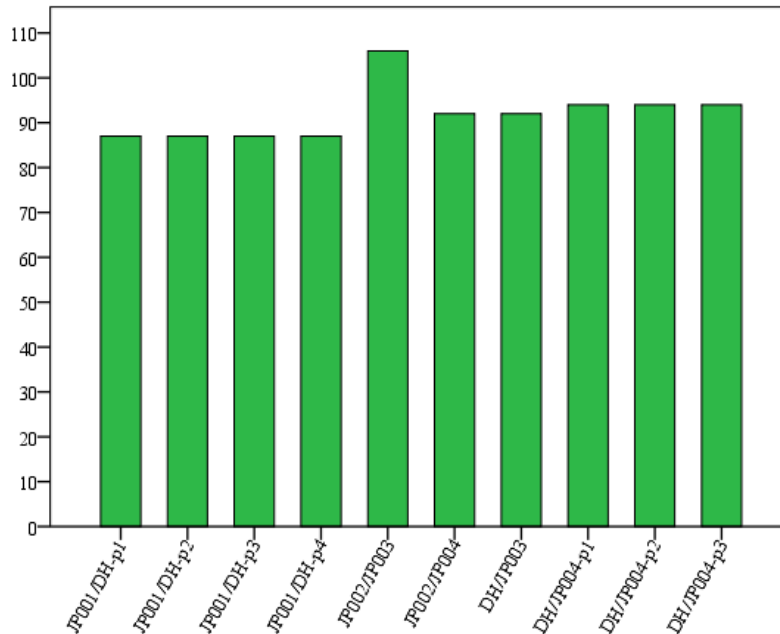


Figura 18. Ciclo vegetativo de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

4.2.3. Número de macollos por planta

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta variable, se observa que el individuo JP001/DH-p2 obtuvo la mayor cantidad de macollas con un valor de 85, lo contrario lo demuestra el individuo JP002/JP003 que solo obtuvo 7 macollas (Tabla 11 - Figura 19).

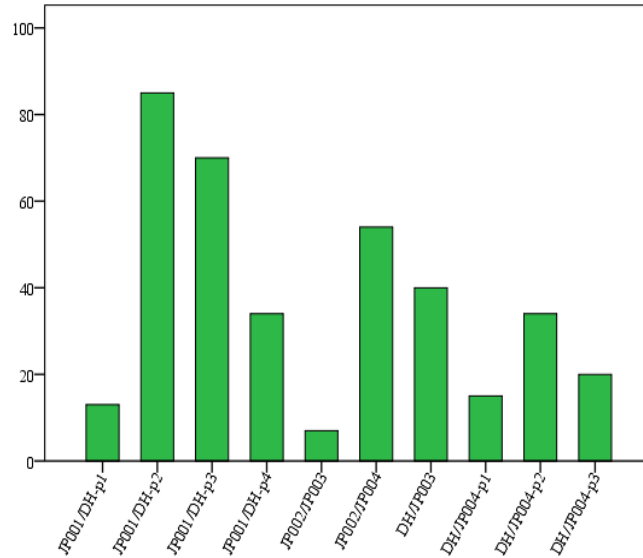


Figura 19. Macollos por planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

4.2.4. Número de panículas por planta

En esta variable se observó que el individuo JP001/DH-p2 obtuvo la mayor cantidad de panículas con un valor de 80. Por consiguiente, el menor valor lo mostró el cruce JP002/JP003 con 7 panículas (Tabla 11 - Figura 20).

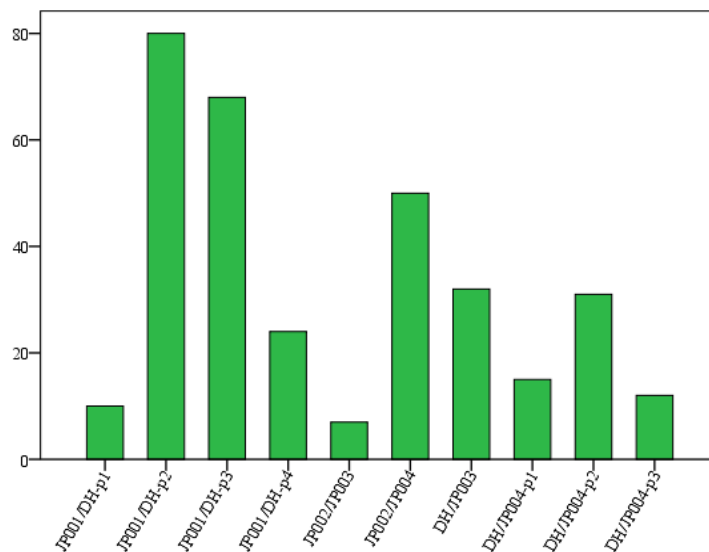


Figura 20. Panículas por planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos – Ecuador, 2017.

4.2.5. Longitud de hoja bandera (cm)

Con los resultados obtenidos de esta variable, se observa que el individuo JP002/JP003 obtuvo la mayor longitud de hoja bandera con un valor de 37 cm; lo contrario lo mostró el individuo JP001/DH-p1 que solo tuvo una longitud de 10 cm (Tabla 12 - Figura 21).

Tabla 12. Long. Hoja de hoja bandera (cm), ancho de hoja bandera (mm) y altura de planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico obtenidas por cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

Individuos ♀/♂	Long. Hoja bandera (cm)	Ancho de hoja bandera (mm)	Altura de planta (cm)
JP001/DH-p1	10	5.9	28.5
JP001/DH-p2	26.5	10.3	80.5
JP001/DH-p3	22.5	6	84
JP001/DH-p4	12	10.25	59.4
JP002/JP003	37	8	102
JP002/JP004	21.2	8	49.8
DH/JP003	32.3	10.5	68.7
DH/JP004-p1	16	6.8	28
DH/JP004-p2	16	10	53
DH/JP004-p3	21	7.8	34

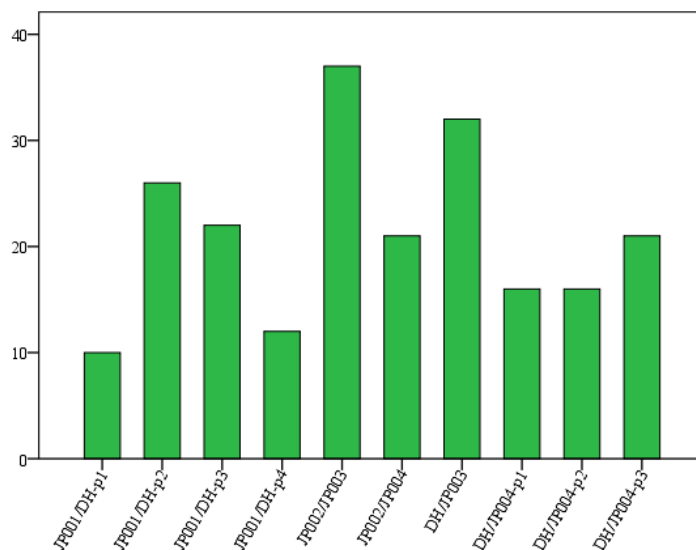


Figura 21. Longitud de hoja bandera (cm) de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.6. Ancho de hoja bandera (mm)

En los resultados obtenidos de esta variable, se observa que el individuo DH/JP003 obtuvo el mayor ancho de la hoja bandera con un valor de 10.5 mm; pero el individuo JP001/DH-p1 obtuvo un ancho de 5.9 mm (Tabla 12 - Figura 22).

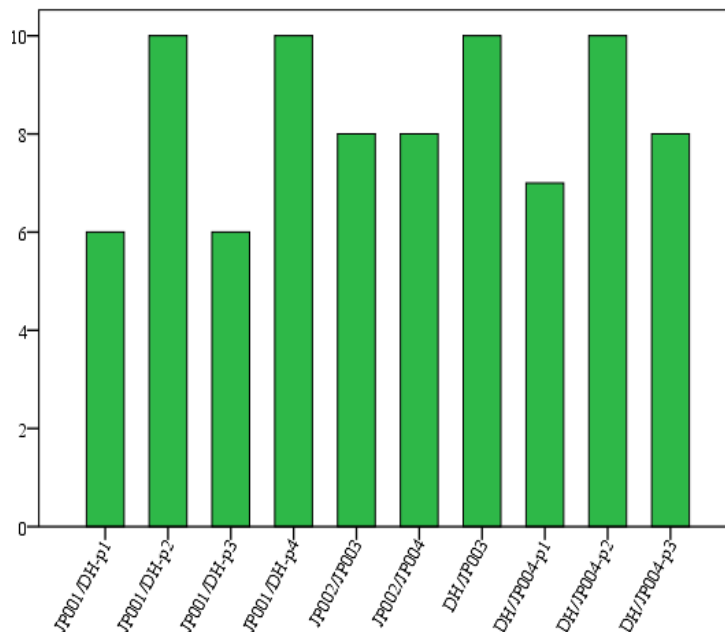


Figura 22. Ancho de hoja bandera (mm) de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.7. Altura de planta (cm)

En los resultados obtenidos de esta variable, se determinó que el individuo JP002/JP003 obtuvo la mayor altura, presentando 102 cm, mientras que; el individuo DH/JP004-p1 obtuvo el menor valor con 28 cm (Tabla 12 - Figura 23).

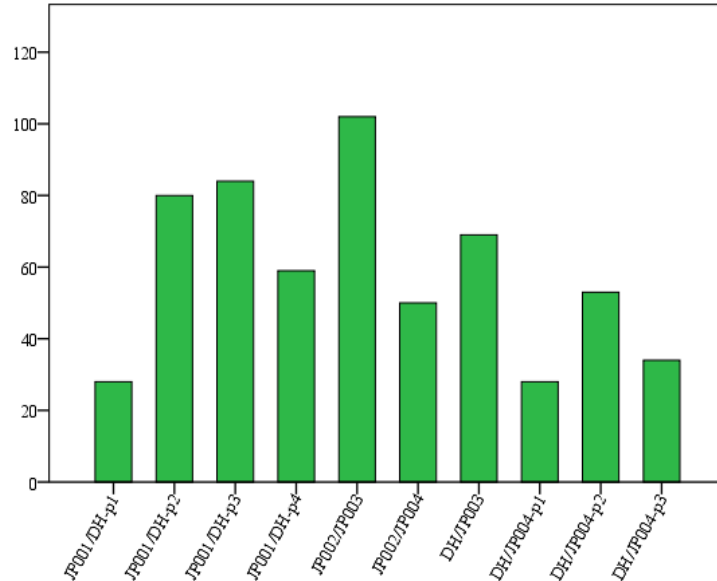


Figura 23. Altura de planta de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

En la Figura 24 se observa a los individuos JP001/DH-p2 (A); JP001/DH-p3 y JP001/DH-p4 desarrollados en condiciones de invernadero.

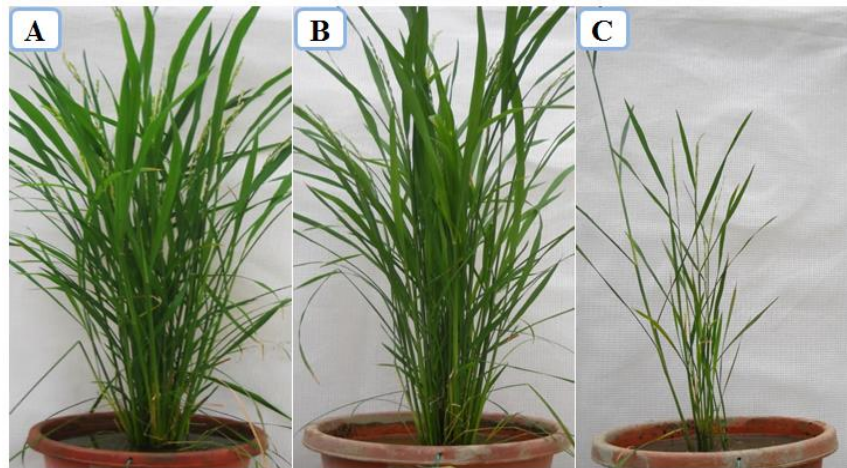


Figura 24. Plantas aclimatas en invernadero. Individuos: JP001/DH-p2 (A), JP001/DH-p3 (B) y JP001/DH-p4 (C).

4.2.8. Longitud de panícula (cm)

Los resultados encontrados de esta variable, muestran que el individuo JP002/JP003 obtuvo la mayor longitud de panícula con un valor de 18.5 cm; lo contrario lo demuestra el individuo DH/JP004-p1 que solo obtuvo una longitud de 7 cm (13 - Figura 25).

Tabla 13. Longitud de panícula (cm), número de granos/panícula y esterilidad (%) de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

Individuos ♀/♂	Long. de panícula (cm)	Granos/panículas (Número)	Esterilidad (%)
JP001/DH-p1	8.5	13.2	100
JP001/DH-p2	19	53.4	99.25
JP001/DH-p3	14.4	42.16	94.46
JP001/DH-p4	11.5	46	93.04
JP002/JP003	18.5	93.5	24.95
JP002/JP004	9.2	31	100
DH/JP003	18	31.6	100
DH/JP004-p1	7	31.4	100
DH/JP004-p2	13	78.4	100
DH/JP004p3	7.3	33.4	100

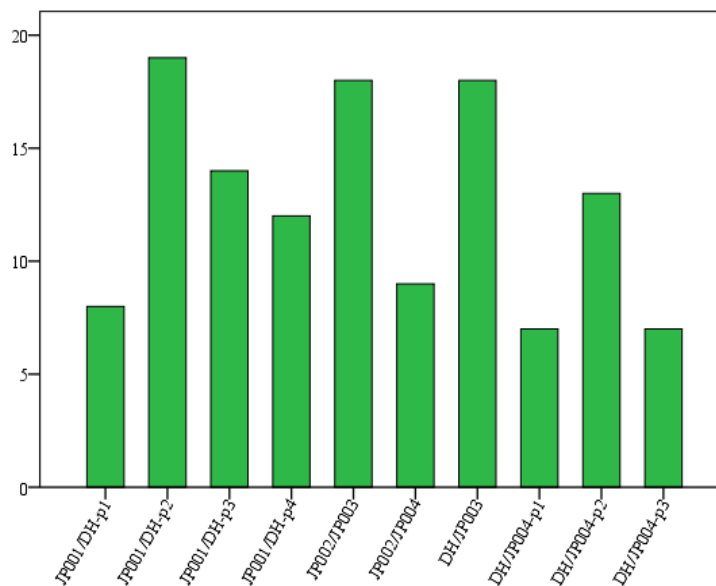


Figura 25. Longitud de panícula de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.9. Número de granos por panícula

Se determinó que el individuo JP002/JP003 obtuvo el mayor número de granos por panícula, presentado un valor de 93.5. En contraste, con el cruce JP001/DH-p1 que solo presentó un valor de 13.2 (Tabla 13 - Figura 26).

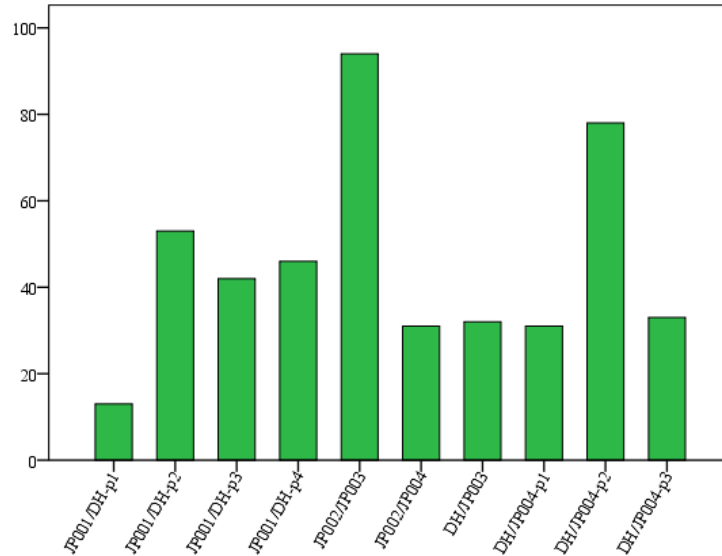


Figura 26. Número de granos por panícula de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.10. Esterilidad (%)

El resultado obtenido de esta variable, mostró que el cruce JP002/JP03 obtuvo el menor porcentaje de esterilidad con un valor de 24.95 %; de lo contrario con los demás cruces que obtuvieron un porcentaje mayor al 93% (Tabla 13 - Figura 27).

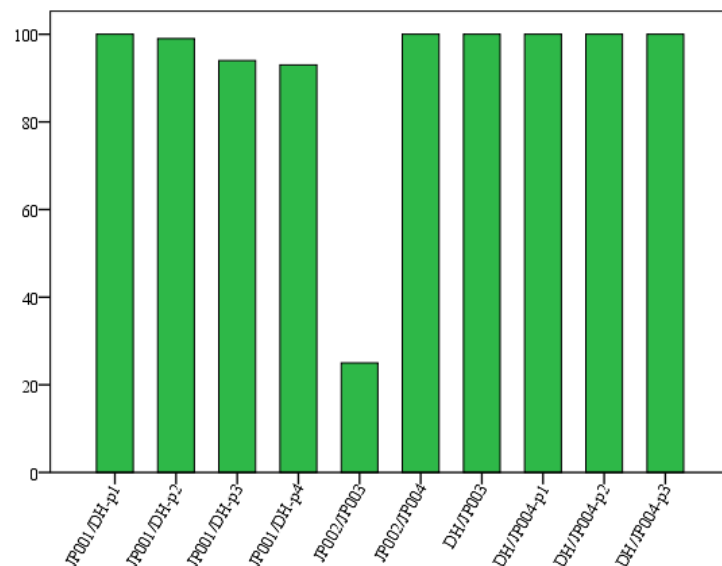


Figura 27. Porcentaje de esterilidad de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.11. Desgrane (%)

De acuerdo a los resultados obtenidos de esta variable, se observa que el cruce JP002/JP003 fue el único cruce al cual se evaluó este dato, donde se obtuvo un de 4.4% y de acuerdo a la escala del CIAT tiene un valor de 1, por lo cual se lo denomina como de difícil desprendimiento (Tabla 14 - Figura 28).

4.2.12. Peso de 1000 granos (g)

El resultado obtenido de esta variable, determina que el individuo JP002/JP003 fue el único al cual se evaluó este dato, al obtener un valor de 18.18 g. No se evaluaron los demás individuos, debido a la presencia de un alto porcentaje de esterilidad (Tabla 14 - Figura 28).

Tabla 14. Desgrane (%), peso 1000 granos (g), longitud de grano descascarado (mm) y forma del grano de las poblaciones R1 de arroz tipo japonico, obtenidas a partir de cultivo *in vitro* de anteras. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

Tratamientos ♀/♂	Desgrane (%)	Peso 1000 granos (g)	Long. Grano desc. (mm)	Ancho (Forma del grano)
JP001/DH-p1	0	0	0	0
JP001/DH-p2	0	0	0	0
JP001/DH-p3	0	0	0	0
JP001/DH-p4	0	0	0	0
JP002/JP003	4.4% (1) [‡]	18.18	4.6 (7)	2.8 (5)
JP002/JP004	0	0	0	0
DH/JP003	0	0	0	0
DH/JP004-p1	0	0	0	0
DH/JP004-p2	0	0	0	0
DH/JP004-p3	0	0	0	0

[‡] Escala mostrada entre paréntesis

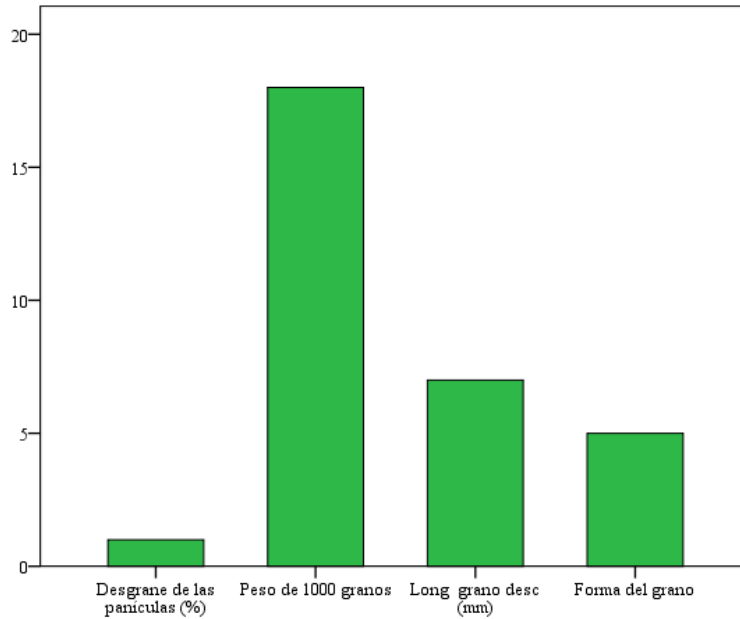


Figura 28. Desgrane de panículas (%) y variables correspondientes al grano en el individuo JP002/JP003. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.13. Longitud de grano descascarado (mm)

El resultado obtenido de esta variable, muestra que el cruce JP002/JP003 obtuvo un valor de 4.6 mm y de acuerdo a la escala del CIAT, se lo califica con un valor de 7, es decir, de grano corto. Consecuentemente, todos los demás cruces no se lograron evaluar, debido al alto porcentaje de esterilidad (Tabla 14 - Figura 28).

4.2.14. Forma del grano

Con el resultado obtenido de esta variable, igualmente se observa que el cruce JP002/JP003 obtuvo un ancho de 2.8 mm, encontrándose una relación de 1.64 y de acuerdo a la escala del CIAT tiene un valor de 5, lo cual lo califica como grano ovalado. No obstante, los demás cruces no se los evaluó debido al gran porcentaje de esterilidad (Tabla 14 - Figura 28).



Figura 29. Diferentes variables de rendimiento, evaluadas en los diferentes individuos R1 aclimatados en el invernadero. FACIAG – UTB. Babahoyo, Los Ríos - Ecuador, 2017.

4.2.15. Nivel de ploidía de las plántulas aclimatadas en invernadero

Por los resultados obtenidos durante esta investigación, de acuerdo a los caracteres agronómicos antes mencionados, calificados de acuerdo a (Lentini *et al.*, 1997), se determinó que los 10 individuos evaluados presentaron características haploides, doble haploides y tetraploides. El individuo JP002/JP003 obtuvo un nivel de ploidía Doble Haploide (DH; $n = 2x$), por lo cual su semilla fue cosechada y servirá para los ensayos de subsiguientes.

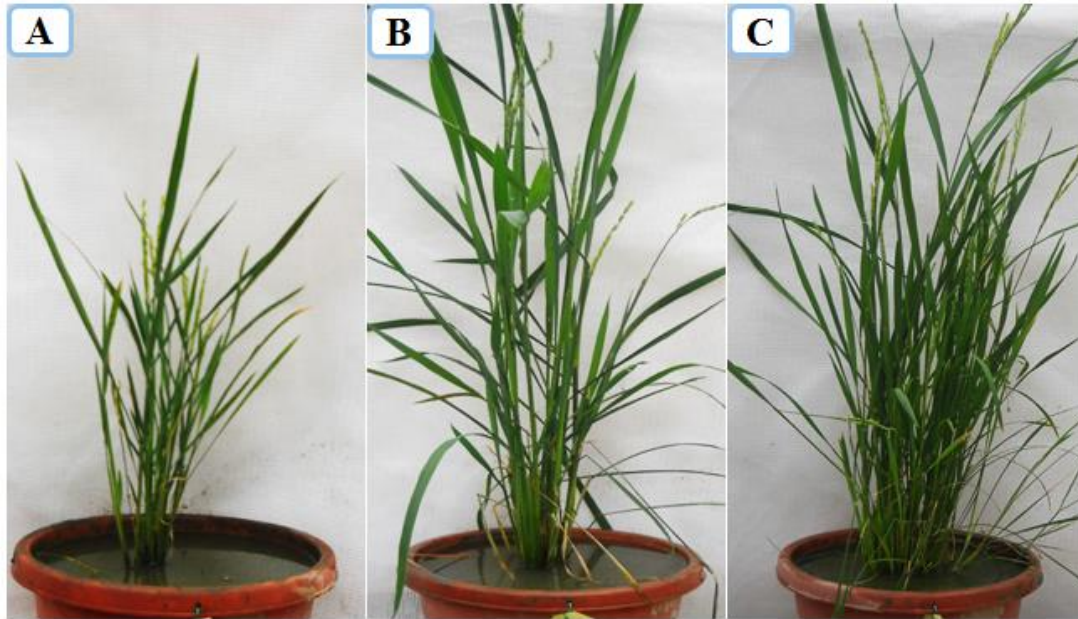


Figura 30. Diferentes niveles de ploidía encontrados en la investigación. Individuo Haploide DH/JP004-p1 (A); individuo Doble Haploide JP002/JP003 (B) y, individuo Poliploide JP001/DH-p3 (C).

Tabla 15. Niveles de ploidía estimados a cada uno de los individuos aclimatados en el invernadero.

Individuos ♀/♂	Ploidía Estimada
JP001/DH-p1	Haploide
JP001/DH-p2	Poliploide
JP001/DH-p3	poliploide
JP001/DH-p4	Haploide
JP002/JP003	Doble Haploide
JP002/JP004	Haploide
DH/JP003	Haploide
DH/JP004-p1	Haploide
DH/JP004-p2	Haploide
DH/JP004-p3	Haploide

En la Tabla 15, se presentan los niveles de ploidía para cada uno de los individuos aclimatados en invernadero, estimados de acuerdo a las características agronómicas presentadas en los resultados.

V. DISCUSIÓN

5.1. Cultivo *in vitro* de anteras de arroz tipo japonico

Los resultados de esta investigación se obtuvieron a partir de cruzamientos entre líneas tipo japónicas. De acuerdo con los resultados del número de anteras sembradas y callos formados, muestra que el total de anteras cultivadas de todos los cruces en medio de inducción de callos fueron de 2700. Sin embargo; a partir de este valor un 99.9% forman callos. Esto contrasta con lo que menciona a Lentini *et al.*, (1997) quienes recomiendan sembrar no menos de 10000 anteras para que se produzca el número suficiente de callos embriogénicos y por ende una mayor cantidad de plantas regeneradas,

En este estudio se logró la regeneración de plantas de algunos cruces utilizados, donde se obtuvieron plantas, tanto verdes como albinas; siendo las albinas las que predominaron, con un 70%. Esto concuerda con lo descrito por Lentini *et al.*, (1994) que mencionan que en arroz, la aparición de plantas carentes de cloroplastos varía con el genotipo; en algunos casos puede obtenerse una alta gama de regeneración de plantas; pero el porcentaje de plantas albinas varía desde un 10 a un 100%. También cabe mencionar que, los callos que no regeneraron plantas se necrosaron, esto lo confirma Tumbaco (2015) quien menciona que los callos que no forman plantas, se observa un crecimiento contínuo de masa callogénica llegando en algunos casos a necrosarse.

La mayoría de los callos se formaron a los 34 días, después de cultivadas las anteras en medio de inducción entre los 32 y 43 días. Estos se aproxima a lo que menciona Lentini *et al.*, (1994) que expresan que los callos empiezan a formarse alrededor de 30 - 50 días dependiendo del genotipo, en este tiempo su tamaño es de 2 mm de diámetro, siendo este el momento idóneo

para transferirlos a medio de regeneración, y además mencionan que; los genotipos japónica tienen mayor respuesta callogénica que los materiales indica.

La formación de los primeros brotes foliares se dio entre los 23 y 29 días después de trasplantados los callos en medio de regeneración de plantas, esto contrasta a lo descrito por Tumbaco (2015) quien alega que los callos presentan sus primeros brotes foliares a los 8 días, después de trasplantados, aunque su trabajo fue realizado en especies indica.

La regeneración de plantas se dió entre los 62 y 78 días. Sin embargo, Khush *et al.*, (2003) mencionan que el factor más importante a considerar en la aplicación de la técnica del cultivo de anteras, es asegurar plantas regeneradas apropiadas, a partir de individuos F1 o F2. Sin embargo, la capacidad de las plantas para regenerarse difiere de genotipo a genotipo.

5.2. Caracteres agronómicos del material genético R1 de arroz tipo japonico, obtenidos a partir de cultivo *in vitro* de anteras

En cuanto a los días a la floración y ciclo vegetativo, se observó que el genotipo JP002/JP003, obtuvo los mayores valores, presentando un valor de 61 días y un ciclo vegetativo de 106 días. Contrarrestando lo establecido por Torres y Martínez (2010) quienes señalan que las variedades sembradas en los trópicos son insensibles al fotoperiodo y su tiempo de maduración fluctúa entre 90 y 160 días.

En esta investigación fue muy variada en los 10 individuos evaluados, variando de 7 a 85 macollos. Degiovanni *et al.*, (2010) mencionan que la principal función de las macollas es llenar los espacios dejados por las pérdidas de población durante el establecimiento del cultivo, y lograr la producción de un alto número de panículas.

Los valores de la altura de planta variaron desde 28.5 a 102 cm entre los individuos evaluados, clasificándose como plantas enanas; de acuerdo a McDonald (1994) quien también menciona que las plantas japónicas son de tamaño baja altura, resistentes al volcamiento y responden mejor al nitrógeno en su rendimiento.

El cruce JP002/JP003 obtuvo la mayor longitud de panícula, con un valor de 18.5 cm ubicándose dentro de un rango corto comparado con otras variedades con panículas más largas, no obstante; Jennings *et al.*, (1981) mencionan que algunas variedades enanas con macollamiento alto tienen panículas intermedias a largas y buena capacidad de rendimiento.

En lo referente a granos por panícula, el estudio demostró que el individuo JP002/JP003 obtuvo el mayor número de granos, con un valor de 93.5. Esto se aproxima a lo mencionado Soto (1991) quien menciona que las variedades mejoradas deben tener más de 100 granos por panícula.

El análisis de esterilidad de panículas reportó que la mayoría de los individuos estudiados presentaron altos porcentajes de esterilidad (> 93%). Sin embargo, el individuo JP002/JP003 presenta una esterilidad del 24.95%. Esto puede deberse a la ploidía de los individuos. Esto se relaciona a lo que menciona Lentini *et al.*, (1994) que de las plantas generadas *in vitro* un 40-70% puede ser haploide, triploide o tetraploide, los cuales presentan un alto porcentaje de esterilidad.

El porcentaje de desgrane indicó que el individuo JP002/JP003 obtuvo un valor de 4.4%, clasificándose como de difícil desgrane. Este valor coincide con Jennings *et al.*, (1981) quienes describen que las variedades japónicas tienen alta resistencia al desgrane, lo cual evita pérdidas en el rendimiento.

El peso de 1000 granos que se determinó en el individuo JP002/JP003, tuvo un valor de 18.18 g. Este valor se aproxima a lo mencionado por Borja (2016) quien describe que el peso de los 1000 granos en variedades japónica fue de 22.9 g en promedio, obtenidos mediante ensayos de campo a partir de semillas F1.

De acuerdo a CIAT (2005) y Degiovanni *et al.*, (2010) el grano descascarado es una "cariósipide" que puede clasificarse según su longitud en: Extralargo (7,6 mm o más); Largo (7,5 a 6,6 mm); Medio (6,5 a 5,6 mm) y Corto (5,5 mm o menos). Los resultados obtenidos en esta investigación, demuestran que el individuo JP002/JP003 presentó una longitud de grano de 4.6 mm calificado como grano corto; y un ancho de 2.8 mm, la relación existente le otorga un valor de 5, clasificándose como medio de acuerdo a la escala estandarizada del CIAT. Estos resultados concuerdan con lo descrito por Borja (2016) que obtuvo resultados similares en su experimento realizado con cultivares de tipo japonico.

VI. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

6.1. CONCLUSIONES

- Los cruces DH/JP003, JP001/DH y JP002/JP004 obtuvieron la mayor formación de callos y por ende una mayor callogénesis, a partir de la anteras cultivadas en medio de inducción
- Los cruces JP001/DH y JP002/JP003 lograron regenerar el mayor número de plantas, tanto verdes como albinas.
- El cruce JP002/JP003 se regeneró a los 62 días después del trasplante de los callos en el medio de regeneración MS, lo cual demuestra la rápida regeneración de los materiales japónicos.
- De las plantas aclimatadas en invernadero se obtuvieron diferentes niveles de ploidía, tales como: Plantas haploides, Poliploides y una planta Doble Haploide (DH).
- El cruce JP002/JP003 fue la única que presentó un nivel de ploidía DH, de la cual se obtuvo la semilla R1 que se utilizara para ensayos y evaluaciones subsiguientes en el campo.

6.2. RECOMENDACIONES

- Cultivar un mayor número de anteras en medio de cultivo de inducción, para obtener una mayor formación de callos y por ende mayor porcentaje de callogénesis.
- Realizar este trabajo utilizando materiales F2 provenientes de los cruces antes mencionados, para comparar las diferencias comprendidas entre las variables evaluadas a nivel de laboratorio.
- Mejorar la producción del número de plantas doble haploides en laboratorio, para obtener una mayor cantidad de semillas R1 en invernadero.

VII. RESUMEN

El presente trabajo de investigación se realizó en la FACIAG de la Universidad Técnica de Babahoyo, ubicada en el km 7 1/2 de la vía Babahoyo – Montalvo. Consistió en la Androgénesis *in vitro* de segregantes F1 para desarrollar líneas homocigóticas entre genotipos de arroz tipo japonico.

Los objetivos de este estudio fueron: Producir vitroplantas homocigóticas de arroz tipo japonico por inducción de androgénesis en poblaciones segregantes F1. Durante esta investigación se realizó la siembra de las anteras provenientes de los materiales japónicos, se indujo a la formación de callos y; a su vez, a la regeneración de plantas verde; además, de realizar la caracterización fenotípica y la estimación de los niveles de ploidía de los individuos evaluados.

Las variables evaluadas a nivel de laboratorio fueron: N° anteras sembradas, N° callos formados, N° plantas regeneradas, N° plantas aclimatadas, formación de callos (días), formación de brotes (días), regeneración de plantas (días) y aclimatación de plantas (días). A nivel de invernadero se evaluaron las variables: Floración (días), ciclo vegetativo (días), N° macollos por planta, N° panículas por planta, longitud hoja bandera (cm), ancho hoja bandera (mm), altura de planta (cm), longitud de panícula (cm), granos/panícula, esterilidad (%), desgrane (%), peso de 1000 granos (g), longitud del grano (mm) y forma del grano. El análisis se realizó mediante estadística descriptiva a excepción de la variable callos formados, la cual se analizó con estadística no paramétrica utilizando el test de Kruskal-Wallis.

Los resultados de los cruces DH/JP003, JP001/DH y JP002/JP004 mostraron la mayor formación de callos en medio NL; los cruces JP001/DH y JP002/JP003 regeneraron el mayor número de plantas en medio MS, del cual, el cruce JP002/JP003 obtuvo un nivel de ploidía doble

haploide (DH), que al final de su ciclo vegetativo se cosecharon sus semillas denominadas R1, con las cuales se realizarán las evaluaciones subsiguientes a nivel de campo.

VIII. SUMMARY

The present research work was carried out in the FACIAG of the Technical University of Babahoyo, located at km 7 1/2 of the Babahoyo - Montalvo road. It consisted of the *in vitro* androgenesis of F1 segregants to develop homozygous lines between japonica rice genotypes. The objectives of this study were: To produce homozygous Japanese-type rice vitroplants by induction of androgenesis in F1 segregant populations. During this investigation the sowing of the anthers from the japonic materials was carried out, it was induced to the formation of calli and; In turn, to the regeneration of green plants; In addition, to carry out the phenotypic characterization and the estimation of the ploidy levels of the evaluated individuals. The variables evaluated at the laboratory level were: Nested anthers, Nods formed, N ° regenerated plants, N ° acclimated plants, callus formation (days), bud formation (days), plant regeneration Acclimatization of plants (days). At the greenhouse level, the following variables were evaluated: Flowering (days), vegetative cycle (days), No. tillers per plant, No. panicles per plant, leaf length (cm) , Panicle length (cm), grain / panicle, sterility (%), grain size (%), weight of 1000 grains (g), grain length (mm) and grain shape. The analysis was performed using descriptive statistics with the exception of the callus variable, which was analyzed using non-parametric statistics using the Kruskal-Wallis test. The results of the crosses DH / JP003, JP001 / DH and JP002 / JP004 showed the highest callus formation in NL medium; Crosses JP001 / DH and JP002 / JP003 regenerated the largest number of plants in MS medium, from which the JP002 / JP003 cross had a haploid double ploidy level (DH), which at the end of its vegetative cycle harvested its seeds R1, with which subsequent evaluations at the field level will be carried out.

IX. BIBLIOGRAFÍA

- Alejandro, S. (enero 2015). El arroz delicioso y saludable. La revista, 561, p. 34. Recuperado de <http://www.larevista.ec/edicion/25-01-2015>
- Arroz, (2017). *Arroz Producción Mundial 2016/2017: Proyección enero 2017*. Recuperado de <https://www.produccionmundialarroz.com/default.asp>
- Bagheri, N., y Jedolar, N. (2008). Combining Ability and Heredability of Callus Induction and Green-Plant Regeneration in Rice Anther Culture. *Biotechnology*, 7(2) 287-292.
- BBC MUNDO, (2002). *Decodificación del Genoma del arroz*. Recuperado de http://news.bbc.co.uk/hi/spanish/science/newsid_1912000/1912715.stm
- Borja, J. (2016). *Identificación de segregantes F1 de arroz japonico (Oryza sativa L.) con características fenotípicas superiores de interés comercial* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Babahoyo, Babahoyo, Ecuador.
- Camarena, F., Chura, J., y Blas, R. (2012). *MEJORAMIENTO GENÉTICO Y BIOTECNOLÓGICO DE PLANTAS*. Lima, Perú: Agrosaber. Recuperado de http://www.agrobanco.com.pe/data/uploads/pdf_cpc/MEJORAMIENTO_GENETICO_Y_BIOTECNOLOGICO_DE_PLANTAS.pdf
- Castro, M. (2016). *RENDIMIENTO DE ARROZ EN CÁSCARA PRIMER CUATRIMESTRE 2016*. Recuperado de http://sinagap.agricultura.gob.ec/pdf/estudios_agroeconomicos/rendimiento_arroz_primer_quatrimestre2016.pdf
- CIAT. (2005). Morfología de la Planta de Arroz. Recuperado de http://www.doc-developpement-durable.org/file/Cultureplantesalimentaires/FICHES_PLANTES/riz/Morfologia_planta_arroz.pdf
- Degiovanni, V., Berrío, L., y Charry, R. (2010). Origen, taxonomía, anatomía y morfología de la planta de arroz (*Oryza sativa L.*). En V. Degiovanni, C. Matínez, y F. Motta, *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina: Tomo I* (pp. 67-80). Cali, Colombia: Publicaciones CIAT no. 370.

- Degiovanni, V., Martínez, C. P., y Motta, F. (Eds.). (2010). *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina*. CIAT.
- Díaz, C., y Chaparro, A. (2012). MÉTODOS Y USOS AGRÍCOLAS DE LA INGENIERÍA GENÉTICA APLICADA AL CULTIVO DEL ARROZ. Recuperado de <http://www.revistas.unal.edu.co/index.php/biotecnologia/article/view/37419>
- El Telègrafo. (2 de Julio de 2014). *Ecuatorianos comen 53,2 kg de arroz al año*. Recuperado de <http://www.eltelegrafo.com.ec/noticias/economia/8/ecuatorianos-comen-532-kg-de-arroz-al-ano>
- Grewal, D., Manito, C., y Bartolomé, V. (2011). Doubled Haploids Generated through Anther Culture from Crosses of Elite Indica and Japonica Cultivars and/or Lines of Rice: Large-Scale Production, Agronomic Performance, and Molecular Characterization. *Crop Sci*, 51, 2544–2553. Doi: 10.2135/cropsci2011.04.0236
- Historia y Bibliografías. (2014). *Historia del arroz Consumo Cultivo Alimentación Producción Arroz*. Recuperado de <http://historiaybiografias.com/arroz/>
- INEC. (2014). *Base de datos: Encuesta de Producción Agropecuaria Continúa (ESPAC) 2003-2014*. Recuperado de <http://www.ecuadorencifras.gob.ec/encuesta-de-superficie-y-produccion-agropecuaria-continuabbd/>
- Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias. (2012). *Informe Ejecutivo 2012*. Obtenido de <http://www.iniap.gob.ec/nsite/images/stories/descargas/Informe%20Ejecutivo%202012.pdf>
- Jennings, P., Coffman, W., y Kaufman, H. (1981). *Mejoramiento de Arroz*. Cali, Colombia: Serie CIAT No. 09SR-3.
- Jordan, M. (2005). Estadios de Cultivo de Tejidos. En H. Prieto, P. Barreto, M. Jordan, M. Cordeiro y D. Durzan (Eds.), *Biotecnología Vegetal* (p.59). Santiago de Chile: INIA
- Khush, G., Brar, D., y Hardy, B. (Eds.). (2003). *Advances in rice genetics: Supplement to Rice genetics IV. Proceedings of the Fourth International Rice Genetics*, Los Baños, Philippines: International Rice Research Institute. 642 p.

- Lentini, Z., Reyes, P., Martínez, C., Núñez, V., y Roca, W. (1994). *Mejoramiento del Arroz con Cultivo de Anteras: Aplicaciones en el desarrollo de Germoplasma Adaptado a Ecosistemas Latinoamericanos y el Caribe*. CIAT, Cali, Colombia.
- Lentini, Z., Roca, W., y Martínez, C. (1997). *Cultivo de anteras de arroz en el desarrollo de germoplasma* (Vol. 293). CIAT, Cali, Colombia.
- McDonald, D. J. (1994). Temperate rice technology for the 21st century: an Australian example. *Australian Journal of experimental Agriculture*, 34, 877-888.
- Mroginski, L., y Roca, W. (Eds.). (1991). Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales *in vitro*. En *Cultivo de Tejidos en la Agricultura: Fundamento y Aplicaciones*. (p. 32). Cali, Colombia: Publicación CIAT No. 151.
- Muñoz, Giraldo, G., y Fernández de Soto, J. (1993). *Descriptores varietales: arroz, frijol, maíz, sorgo*. Cali, Colombia: Centro Internacional de Agricultura Tropical.
- Ordeñana, O. (2012). *ARROZ PRODUCCIÓN, AGRONOMÍA Y CONTROL DE MALEZAS*. Babahoyo, Ecuador: Editora Malena.
- Polci, P., Conti, V., Miranda, R., y Gear, N. (2010). Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal: Obtención de plantas Doblehaploides. En G. Letivus, V. Echenique, C. Rubinstein, E. Hopp, y L. Mroginski (Eds.), *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II* (pp.298- 303). Argentina: INTA.
- Prasanna, B. M., Chaikan, V., y Mahuku, G (Eds.). (2013). *Tecnologías de dobles haploides en el mejoramiento del maíz: Teoría y Práctica*. México, D.F.: CIMMYT.
- Puyol, X. (2010). Secuenciación del genoma del arroz. Recuperado de: <http://www.consumer.es/seguridad-alimentaria/ciencia-y-tecnologia/2002/12/19/4503.php>
- Ruiz, W. (2012). *LA PRODUCCIÓN DE ARROZ EN EL ECUADOR: EDUCÁNDONOS EN ÁMBITO ECONÓMICO*. Recuperado de <http://ambitoeconomico.blogspot.com/2012/10/la-produccion-de-arroz-en-el-ecuador.html>

- Torres, E., y Matínez, C. (2010). Capítulo 9: El mejoramiento del arroz. En V. Degiovanni, C. Matínez, y F. Motta (Eds.), *Producción Eco-Eficiente del Arroz en América Latina* (p. 184). Cali, Colombia: Publicación CIAT No. 370.
- Roca, W. M., y Mroginski, L. A. (Eds.). (1991). *Cultivo de tejidos en la agricultura: fundamentos y aplicaciones* (No. 151). CIAT.
- Sah, S. K., Kaur, A., Kaur, G., y Cheema, G. S. (2014). Genetic Transformation of Rice: Problems, Progress and Prospects. *J Rice Res*, 3(132). doi:10.4172/2375-4338.1000132
- Soto, B. (1991). *Estudio de Observación de 20 variedades USA y 7 líneas promisorias nacionales en comparación con dos testigos comerciales de arroz*. (Tesis de pregrado). Universidad Nacional Agraria. Managua, Nicaragua.
- Tumbaco, D. (2015). *ANDROGÉNESIS INDUCIDA, EN VARIAS POBLACIONES F1 DE ARROZ (Oryza sativa L.) PARA GENERACIÓN DE PLANTAS DOBLE HAPLOIDES* (Tesis de pregrado). Universidad de Guayaquil, Guayaquil, Ecuador.
- Velásquez, R., Noguera, A., Blanca, I., y Mata, J. (2010). *Evaluación de dos metodologías para la determinación del nivel de ploidía en plantas de arroz (Oryza sativa L.) regeneradas por cultivo de anteras*. *Fac. Agro. (UCV)*. 36(1). 1-6.