



Universidad de Concepción  
Dirección de Postgrado  
Facultad de Agronomía - Programa de Magíster en Ciencias Agronómicas

**Ultraestructura de la antera y polen en desarrollo de arroz  
(*Oryza sativa* L. 'Diamante-INIA', 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA')  
sometidos a disminución de temperatura durante la  
etapa reproductiva**

**Tesis para optar al grado de Magíster en Ciencias Agronómicas  
mención Producción Vegetal**

VERÓNICA CECILIA FUENTEALBA SANDOVAL  
CHILLÁN-CHILE  
2013

Profesor Guía: Víctor Lionel Finot Saldías  
Depto. de Producción Animal, Facultad de Agronomía  
Universidad de Concepción

ULTRAESTRUCTURA DE LA ANTERA Y POLEN EN DESARROLLO DE ARROZ  
(*ORYZA SATIVA* L. 'DIAMANTE-INIA', 'BRILLANTE-INIA' Y 'ZAFIRO-INIA')  
SOMETIDOS A DISMINUCIÓN DE TEMPERATURA DURANTE LA ETAPA  
REPRODUCTIVA

Aprobada por:

Víctor L. Finot Saldías  
Licenciado en Biología, Mg. Sc., Dr.

---

Profesor Guía

Rosemarie Wilckens Engelbreit  
Licenciada en Biología, Dr. rer. nat.

---

Evaluador Interno

Patricio López Sepúlveda  
Licenciado en Biología, Dr. rer. nat.

---

Evaluador Externo

Inés Figueroa Cares  
Ing. Agrónomo, Mg. Sc., Dr.

---

Directora de Programa



## AGRADECIMIENTOS

*En estas palabras deseo expresar mi más sincero agradecimiento a mi profesor guía Dr. Víctor L. Finot y asesores Dra. Rosemarie Wilckens y Dr. Patricio López, por la orientación y la supervisión en la realización de la tesis, pero sobre todo por la motivación y apoyo.*

*Al personal del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción, Ricardo Oliva, Julio Pugin y Alexis Stay, por su ayuda en la obtención de las imágenes de la tesis.*

*A la Dra. (c) Karla Cordero, Fernando Saavedra y equipo técnico del programa de mejoramiento genético de arroz de INIA-Quilmapu.*

*Al financiamiento otorgado por CONICYT el año 2011 mediante la Beca de Magíster en Chile.*



## DEDICATORIA

*A Dios, por haberme acompañado y guiado a lo largo de toda mi carrera, por ser mi mayor fortaleza en los momentos de debilidad.*

*A mis padres, Manuel y Jacqueline por apoyarme en todo momento tanto moral como económicamente. Por los valores inculcados, su paciencia y ánimo. Por sobre todo por ser un ejemplo de vida.*

*A mi hermano, por animarme y apoyarme durante todo este proceso.*

*A mis tías, por su valioso apoyo y atención dada en toda la ejecución de mi carrera.*

*A mi Mamy<sup>†</sup> (abuela), por ser una mujer excepcional que me enseñó el valor de la superación y el amor por la agricultura. Por haber creído en mí hasta el último momento.*

*A mis amigos(as) por los valiosos momentos de alegría compartidos.*



**TABLA DE CONTENIDOS**

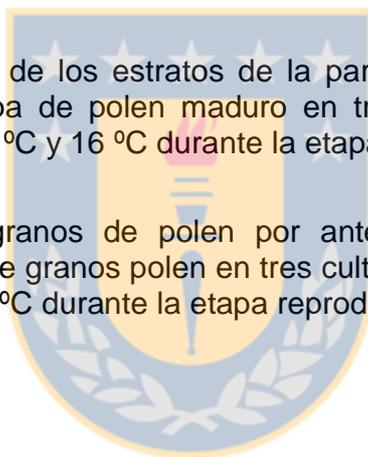
	<b>Página</b>
I. Resumen.....	1
II. Summary.....	1
III. Introducción.....	2
IV. Materiales y Métodos.....	8
V. Resultados .....	12
VI. Discusión.....	28
VII. Conclusiones.....	37
VIII. Referencias.....	37



## INDICE DE FIGURAS Y TABLAS

		<b>Página</b>
Figura 1	Estructura de la antera de arroz 'Diamante-INIA' en etapa de tétrada.....	5
Figura 2	Estratificación de la pared en un grano de polen típico de angiosperma.....	7
Figura 3	Microfotografías (MO) del desarrollo de la pared de la antera y grano de polen en arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva .....	14
Figura 4	Microfotografías (MO) del desarrollo de antera de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva.....	15
Figura 5	Microfotografías (MO) del desarrollo de antera de arroz a 30/20 °C durante la etapa reproductiva.....	16
Figura 6	Microfotografías (MET) de la pared de la antera y exina de tres cultivares de arroz a 30/20 °C durante la etapa reproductiva.....	17
Figura 7	Microfotografías (MET) de la pared de la antera y exina en etapa de polen vacuolado, de tres cultivares de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva.....	18
Figura 8	Microfotografías (MET) de tapete en etapa de vacuolado, de tres cultivares de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva.....	20
Figura 9	Microfotografías (MET) de la pared de la antera y exina en etapa de polen maduro, de tres cultivares de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva.....	23
Figura 10	Tinción con tetrazolio de granos de polen de tres cultivares de arroz en etapa de anthesis a 30/20 °C y 16°C	27

Figura 11	Germinación en medio artificial de granos de polen de tres cultivares de arroz en etapa de antesis a 30/20 °C y 16 °C.....	28
Tabla 1	Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared de la antera en etapa de polen vacuolado en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.....	19
Tabla 2	Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared de la antera en etapa de polen maduro en tres cultivares arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.....	22
Tabla 3	Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared del grano de polen en etapa de polen vacuolado en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva....	25
Tabla 4	Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared del grano de polen en etapa de polen maduro en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva....	26
Tabla 5	Número de granos de polen por antera, viabilidad y germinación de granos polen en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.....	27



## ULTRAESTRUCTURA DE LA ANTERA Y POLEN EN DESARROLLO DE ARROZ (*ORYZA SATIVA* L. 'DIAMANTE-INIA', 'BRILLANTE-INIA' Y 'ZAFIRO-INIA') SOMETIDOS A DISMINUCIÓN DE TEMPERATURA DURANTE LA ETAPA REPRODUCTIVA

## ULTRASTRUCTURE OF THE DEVELOPING ANTHHER AND POLLEN OF RICE (*ORYZA SATIVA* L. 'DIAMANTE-INIA', 'BRILLANTE-INIA' AND 'ZAFIRO-INIA') CULTIVATED UNDER TEMPERATURE DECREASE DURING THE REPRODUCTIVE STAGE

### I. RESUMEN

Se estudió a nivel ultraestructural el efecto de la disminución de temperatura de 30/20 °C (temperatura óptima) a 16 °C (temperatura baja) durante la etapa reproductiva en el desarrollo de la antera y el polen en tres cultivares de arroz 'Diamante-INIA', 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA'. Los objetivos fueron determinar daños causados por stress térmico a nivel celular y determinar la tolerancia relativa de los cultivares a la baja temperatura. Se cultivaron plantas en macetas a 30/20 °C (día/noche) y al iniciarse la formación de la panícula parte de éstas se mantuvieron a 16 °C, permaneciendo allí hasta antesis. Se recolectaron espiguillas en etapa de tétrada, polen vacuolado y polen maduro, y se realizaron cortes para microscopía óptica y electrónica de transmisión. A temperatura de 30/20 °C se observó un desarrollo normal de los cuatro estratos de la pared de la antera (epidermis, endotecio, capa media y tapete) y de los granos de polen, mientras que a 16 °C se observaron daños como hipertrofia tapetal, lóculos atrofiados, granos malformados, retraso de la antesis y disminución de la viabilidad. 'Diamante-INIA' se presentó como el cultivar menos tolerante a 16 °C y 'Zafiro-INIA' como el más tolerante, demostrando así que existe un comportamiento diferente entre los cultivares.

**Palabras índice adicionales:** tolerancia a baja temperatura, tapete, microscopía electrónica, viabilidad de polen.

### II. SUMMARY

The ultrastructural effect of decreasing temperature from 30/20 °C to 16 °C during the

reproductive stage on the development of the anther and pollen in rice 'Diamante-INIA', 'Brillante-INIA' and 'Zafiro-INIA', was studied. The objectives were to determine the relative tolerance of cultivars to low temperature and to describe cellular damages caused by temperature stress. Plants were grown at optimum temperature (30/20 °C, day/night), and at panicle initiation some of these were moved to 16 °C until anthesis. Spikelets were obtained at tetrad, vacuolated pollen and mature pollen stage, and sections were prepared for light microscopy and transmission electron. A normal development was observed at 30/20 °C in the four layers of the anther wall (epidermis, endothecium, middle layer and tapetum) and pollen grains, while at 16 °C damages as tapetal hypertrophy, stunted locules, malformed grains, delayed anthesis and reduced pollen viability were observed. 'Diamante-INIA' was the less tolerant cultivar at 16 °C and 'Zafiro-INIA' as the most tolerant, showing that there is a different behavior among cultivars.

**Key words:** tolerance to low temperature, tapetum, electronic microscopy, pollen viability.

### III. INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L., Poaceae) es uno de los principales cultivos alimenticios, situándose en el segundo lugar de importancia entre los cereales a nivel mundial, después del trigo (IRRI, 2002).

Se cultiva en regiones tropicales así como en zonas de clima templado. En zonas templadas, las bajas temperaturas nocturnas (< 20 °C) pueden afectar la germinación de la semilla así como el desarrollo de los órganos reproductivos (Castillo & Alvarado, 2002; Díaz *et al.*, 2006; Barrios, 2010), siendo la fase reproductiva la más sensible y donde se produce el mayor daño, lo que provoca reducción del rendimiento (Imin *et al.*, 2006; Gothandam *et al.*, 2007). Esta limitación de los rendimientos de arroz en las áreas templadas afecta especialmente a Corea, Japón, Australia, EE.UU y Chile (Alvarado & Grau, 1991; Shimono *et al.*, 2002; Ortega, 2007). En Chile, la reducción de rendimiento por bajas temperaturas fluctúa entre un 5 y 10 % en promedio. Sin embargo, períodos impredecibles de bajas temperaturas, que se producen cada 3 ó 4 años, pueden provocar pérdidas de 20 a 40 % y en casos extremos hasta un 60 % (Ortega, 2007).

La producción de arroz en Chile se localiza entre las regiones del Maule y Bío - Bío (35 - 36 °S). Así, Chile y en particular la provincia del Ñuble, representan la distribución más austral del mundo donde se cultiva este cereal (Barrios, 2010). Por esta razón, existe una alta probabilidad que disminuya el rendimiento producto de las condiciones climáticas en que se desarrolla el cultivo. En relación con esto, el International Rice Research Institute (IRRI) ha generado seis patrones de temperatura donde el tipo I corresponde a países con temperaturas entre 25 – 30 °C, valor considerado óptimo y el tipo VI a países con temperaturas menores a 25 °C, consideradas subóptimas para el cultivo. Chile pertenece al patrón tipo VI, ya que presenta valores mínimos de 12 - 20 °C durante el período de crecimiento entre octubre y marzo (IRRI, 1983). A pesar del riesgo existente, dados los altos niveles de radiación presentes en la región del cultivo del arroz, en años libres de eventos de bajas temperaturas en la etapa reproductiva los potenciales de rendimiento de grano llegan a cerca de 13 t ha<sup>-1</sup> con variedades tolerantes al frío en las etapas tempranas de desarrollo (Ortega, 2007).

En el arroz cultivado se reconocen tres subespecies (subsp. *indica* S. Kato, subsp. *japonica* S. Kato y subsp. *javanica* S. Kato) (Acevedo *et al.*, 2006). En Chile se utiliza sólo la subsp. *japonica*, que se desarrolla en climas templados y presenta mayor tolerancia a las bajas temperaturas, respecto a las otras subespecies (Cruz *et al.*, 2006; Jagadish *et al.*, 2007; Kellog, 2009). A ésta pertenecen los cultivares Diamante-INIA, Brillante-INIA y Zafiro-INIA (Barrios, 2010), obtenidos en el programa de mejoramiento genético de arroz (PMGA) de INIA-Quilamapu, cuyo objetivo principal fue mejorar la tolerancia al frío, entre otros parámetros, la cual se manifiesta en un menor porcentaje de esterilidad floral (Cordero, 2012). Existen evaluaciones de campo que indican que estos cultivares presentan distintos niveles de tolerancia al frío, expresada como porcentaje de granos vanos en la panícula, determinando que 'Zafiro-INIA' presenta menor esterilidad floral que 'Brillante-INIA' y éste menor que 'Diamante-INIA' (Alvarado *et al.*, 1997; Ortega, 2007).

El desarrollo reproductivo es sensible al estrés abiótico, no sólo en arroz, sino también en otros cultivos de cereales, como trigo y maíz (Saini & Westgate, 2000; Cruz *et al.*, 2008). La etapa reproductiva comienza con la iniciación de la panícula 50 - 70 días después de la germinación de la semilla, siendo la diferenciación del polen la etapa más sensible a las bajas temperaturas. Ésta se reconoce a simple

vista cuando se alinea el nudo de la hoja bandera y la hoja anterior, es decir están en el mismo nivel o posición 0. La disminución de la temperatura durante la etapa de inicio de panícula o mientras ocurre la diferenciación del polen o anthesis puede producir malformaciones a nivel de la pared de la antera y causar esterilidad de polen (Alvarado & Grau, 1991). Entre las alteraciones que aparecen en el cultivo, producto de la exposición a bajas temperaturas, se encuentran: deformación de las células de la antera, hipertrofia de células tapetales, retraso del estado de bota o embuchamiento, degeneración de las espiguillas, menor producción de granos, crecimiento reducido y deformación de los granos de polen, ejerción incompleta de la panícula, retraso de la anthesis y esterilidad de los granos de polen (Díaz *et al.*, 2006; Acevedo *et al.*, 2008).

En Chile la esterilidad de polen en arroz se ha investigado en términos de medición de granos vanos por panícula, causada ya sea por bajas temperaturas y/o asociada a factores de manejo agronómico como fertilización nitrogenada, fechas de siembra y alturas de agua en los cuadros de cultivo (Ortega, 2007). Sin embargo, faltan investigaciones de los cultivares chilenos a nivel celular de la estructura reproductiva masculina, representada por la antera y grano de polen. Por lo cual sería de gran utilidad obtener información que permita conocer lo que ocurre tanto con los estratos de la pared de la antera como del grano de polen y determinar cuál es la causa, a nivel celular, de la esterilidad del polen en los cultivares creados por el PMGA de INIA y si existe diferencia en la tolerancia al frío a este nivel entre los cultivares. El estudio a nivel celular cobra importancia debido a que se considera una herramienta poderosa para validar los síntomas visibles a nivel macroscópico tales como rendimiento en grano, porcentaje de esterilidad de espiguilla (granos vanos) y ejerción de la panícula, producto de las bajas temperaturas en la etapa reproductiva. A su vez, esta evaluación podría contemplarse como una herramienta adicional, al momento de seleccionar genotipos para mejorar la tolerancia al frío.

### **Desarrollo de la pared de la antera**

Inicialmente, en el lóbulo meristemático ocurren divisiones periclinales en el primer estrato celular bajo la protodermis, originando la capa arquesporrial de la que luego internamente derivan las células esporógenas primarias. La capa arquesporrial, a su

vez, origina externamente la capa parietal primaria, la cual mediante divisiones periclinales forma dos capas parietales secundarias. La capa más externa de éstas se divide periclinalmente constituyendo, en total, tres capas parietales, que son: endotecio, capa media y tapete (Esau, 1977; Itoh *et al.*, 2005). Finalmente, después de estas divisiones celulares, en la pared de la antera se observan cuatro estratos celulares estériles, epidermis, endotecio, capa media y tapete (Esau, 1977; Raghavan, 1988; Raghavan, 2000).

En la Figura 1 se observa un corte transversal de antera de arroz 'Diamante-INIA' cultivado en condiciones de temperatura óptima durante la etapa reproductiva.

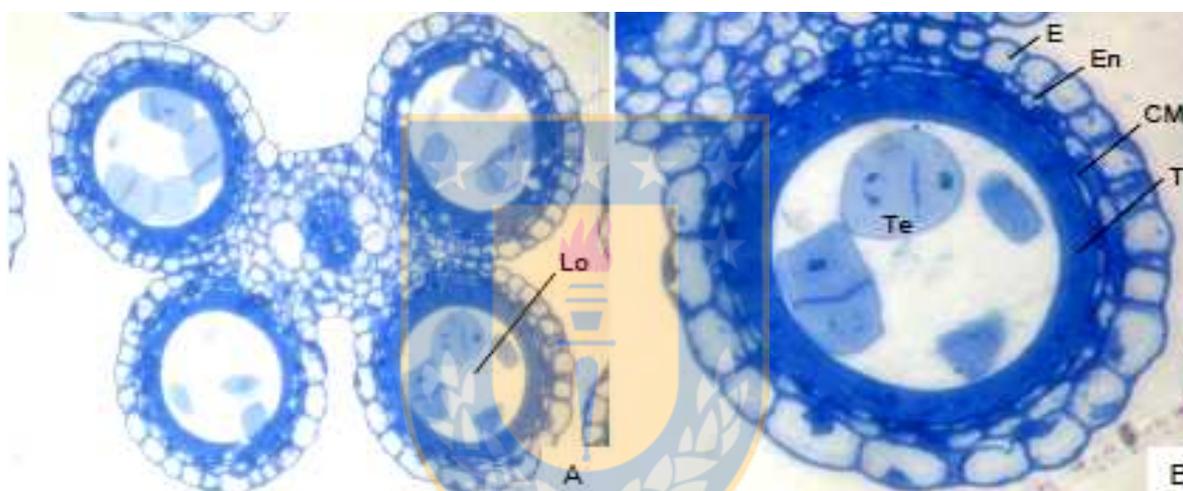


Figura 1. Estructura de la antera de arroz 'Diamante-INIA' en etapa de tétrada. A. Microfotografía de cuatro lóculos. B. Microfotografía de un lóculo, indicando los estratos de la pared de la antera. Lo, lóculo; E, epidermis; En, endotecio; CM, capa media; T, tapete; Te, tétrada. Fuente: Original.

De los cuatro tejidos que conforman la pared de la antera, el tapete se encuentra en estrecho contacto con las microsporas (Figura 1) y es el más importante durante el desarrollo de los granos de polen. Existen dos tipos de tapete, el secretor o glandular y el ameboide o plasmodial. El tipo secretor se presenta en la mayoría de las angiospermas y corresponde al que se encuentra en arroz. En este caso las células que lo conforman son estáticas y no migran hacia el interior de los lóculos de la antera, como ocurre con el plasmodial (Steer, 1977; Furness & Rudall, 2001; Wang *et al.*, 2003; Nakamura *et al.*, 2010). El tapete cumple múltiples funciones, entre las que destacan transporte de nutrientes a las microsporas, degradación de la calosa

que rodea a las tétradas y conformar el pollenkitt o “cemento polínico” (Pacini *et al.*, 1985; Raghavan, 1988; Graça *et al.*, 2005). En el desarrollo del tapete es posible observar dos etapas, una de síntesis y otra de degradación. Así, cuando los meiocitos están en profase, en las células del tapete secretor se desarrolla e incrementa la cantidad de retículo endoplásmico y vesículas derivadas de dictiosomas, mientras que en la etapa final de la microsporogénesis, el tapete comienza a desintegrarse, se lisan sus paredes, los restos de citoplasma se liberan en el lóculo y se condensan conformando el pollenkitt, que se deposita sobre los granos de polen (Esau, 1977). Dada la importancia del tapete en el desarrollo del polen se considera, en general, que cualquier problema en este tejido está relacionado con las anomalías observadas en los granos de polen. Observaciones citológicas de anteras muestran que este estrato es el más sensible al estrés por bajas temperaturas, manifestándose una hipertrofia del tejido asociada a pérdida funcional del mismo y, con ello a esterilidad del polen (Gothandam *et al.*, 2007). Se sugiere que esta anomalía tiene relación con la forma o arreglo del retículo endoplásmico. Así, el arreglo en pilas de sacos aplanados es considerado un patrón normal, mientras que la forma circular se asocia a esterilidad de polen (Imin *et al.*, 2006; Mamun *et al.*, 2006; Gothandam *et al.*, 2007).

La capa media se presenta como un estrato único tanto en monocotiledóneas como en dicotiledóneas, se degenera tempranamente, comprimiéndose entre el tapete y el endotecio inmaduro y, eventualmente, puede ser absorbido por las células adyacentes (Esau, 1977).

Inmediatamente bajo la epidermis está el endotecio (Figura 1), cuya característica más destacable son los engrosamientos de la pared secundaria, comúnmente en forma de estrías o bandas, por lo cual a menudo es llamado capa fibrosa. En la zona de abertura de la antera (estomio), no se desarrollan engrosamientos. En el desarrollo de la antera, el endotecio alcanza la madurez tardíamente, las células aumentan en extensión y los engrosamientos en la pared ocurren poco tiempo antes de que el polen se libere (Esau, 1977).

### **Desarrollo de la pared del grano de polen**

La pared del grano de polen consiste típicamente de exina (esporopolenina) e intina

(celulosa) (Figura 2). La exina puede ser un estrato único, uniforme, o bien se puede subdividir en dos estratos, uno externo “sexina” y otro interno “nexina”. La sexina está compuesta de tectum y columela, mientras que la nexina corresponde a la porción de capa basal y endexina. La intina es la porción más interna de la pared de la pared de la antera y corresponde a un estrato único, que da origen a la pared del tubo polínico (Figura 2). Walker & Doyle (1975), en angiospermas reconocen cuatro tipos de estratificación de la exina según la distribución relativa ectexina/endexina:

Tipo I: ectexina= sexina

endexina= nexina

Tipo II: ectexina = sexina + capa basal

endexina = porción interna de la nexina

Tipo III: exina completamente ectexinosa

Tipo IV: exina completamente endexinosa

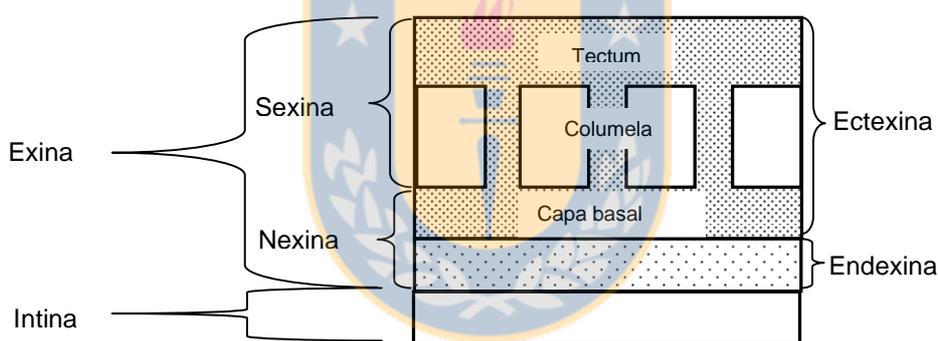


Figura 2. Estratificación de la pared en un grano de polen típico de angiosperma. Fuente: Walker & Doyle, (1975).

La biosíntesis de la exina es llevada a cabo tanto por las células tapetales como por las microsporas. Las microsporas secretan la primexina, mientras que las células tapetales secretan esporopolenina (Bedinger, 1992). Inicialmente, las microsporas carecen de exina y su plasmalema está en contacto con la calosa. La primera pared que se forma es la primexina. Luego, mientras las microsporas aún están envueltas por la calosa o después que son liberadas desde la tétrada, incrementan su tamaño y se deposita la exina. La exina se distribuye alrededor del grano estando ausente sólo en las regiones de abertura, donde sólo está presente la intina. La intina en estos sectores aumenta de espesor y se extiende más allá de las regiones de abertura, y el

plasmalema deja una protuberancia, que corresponde al *annulus*. En la etapa de polen maduro, en la superficie de éste se agregan sustancias de recubrimiento derivadas del tapete (Esau, 1977; Zhang *et al.*, 2008; Wilson & Zhang, 2009).

En base a lo anteriormente expuesto, el objetivo general de esta investigación fue evaluar la tolerancia al frío de tres cultivares chilenos de arroz, expuestos a baja temperatura (16 °C) durante la etapa reproductiva a nivel ultraestructural de la pared de la antera y grano de polen. Los objetivos específicos fueron: 1) describir y comparar el desarrollo de la pared de la antera, 2) describir y comparar el desarrollo del grano de polen en los cultivares de arroz 'Diamante-INIA', 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA' a nivel anatómico y ultraestructural, utilizando microscopía óptica (MO) y electrónica de transmisión (MET) y 3) evaluar el porcentaje de germinación y viabilidad de granos de polen en el período de antesis en los cultivares 'Diamante-INIA', 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA'.

#### **IV. MATERIALES Y MÉTODOS**

##### **Material vegetal y condiciones de crecimiento**

Se utilizaron semillas de tres cultivares chilenos de arroz 'Diamante-INIA', 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA', proporcionadas por el Programa de Mejoramiento Genético de Arroz (PMGA) de INIA Quilamapu.

Las semillas fueron germinadas utilizando recipientes plásticos de 250 mL conteniendo como sustrato arena gruesa esterilizada, los cuales fueron perforados en la base. Se dispusieron en una bandeja con agua potable con el objetivo de humedecer la arena para proceder a la siembra. En estos se procedió a sembrar 100 semillas de cada uno de los cultivares. Finalmente, los recipientes dispuestos en la bandeja con agua se colocaron en una cámara de crecimiento a 25 - 30 °C, fotoperiodo 12:12 h (luz:oscuridad) y humedad relativa entre 50 - 70 %.

Una vez que las plántulas presentaron 2 a 3 hojas verdaderas (21 - 28 días después de la siembra), se trasplantaron a macetas de 2 L de capacidad (23 cm de diámetro y 19 cm de alto) a las cuales, antes de agregar el suelo, se les introdujo una bolsa de polietileno, ya que presentaban la base perforada y de esta manera evitar la pérdida de agua de riego y mantener el suelo saturado. Posteriormente se agregó suelo arcilloso de aptitud arroceras (serie Quella, Thermic Aquic Durixererts) (Stolpe,

2006), proveniente del campo experimental de arroz de INIA Quilamapu. Se colocaron cinco plántulas por maceta, disponiendo de 3 macetas por cultivar y por tratamiento de temperatura.

Las macetas se trasladaron a invernadero a  $30 \pm 5$  °C y  $20 \pm 5$  °C (día y noche, respectivamente) considerada óptima para el cultivo, fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad) y humedad relativa 50 - 60 %, sin limitaciones de nutrientes ni de riego (Satake & Shibata, 1992). La fertilización consistió en aplicar N, P y K, utilizando como fuentes Urea (46 % N), Súper Fosfato Triple (46 % de  $P_2O_5$ ) y Cloruro de Potasio (60 %  $K_2O$ ), en dosis equivalente a  $100 \text{ kg N ha}^{-1}$ ,  $50 \text{ kg P}_2\text{O}_5 \text{ ha}^{-1}$  y  $50 \text{ kg K}_2\text{O ha}^{-1}$ . La fertilización nitrogenada se parcializó aplicando 50 % de la dosis en el trasplante y 50 % en la macolla, mientras que el fósforo y potasio se aplicaron 100 % en el trasplante. El nivel de agua en la maceta se mantuvo hasta la parte superior de ella, simulando las condiciones de campo del cultivo, correspondiente a suelo inundado.

#### **Tratamiento de 16 °C durante la etapa reproductiva**

Una vez que las plantas cultivadas en invernadero a 30/20 °C se encontraron en estado de inicio de panícula, alrededor de 40 días después del trasplante (6 a 8 hojas), con el cual se comienza la etapa reproductiva, tres macetas de cada cultivar se sometieron al tratamiento de 16 °C (constante). Éstas se trasladaron a una cámara de crecimiento (Lab-Line, modelo 850-1) y fueron cultivadas desde inicio de panícula hasta anthesis a 16 °C, fotoperíodo de 12:12 h (luz: oscuridad), 50 - 70 % de humedad relativa, sin limitaciones de nutrientes ni de riego (Satake & Hayase, 1970; Gothandam *et al.*, 2007), mientras que las plantas restantes de los tres cultivares permanecieron en invernadero.

Durante la etapa reproductiva, tanto en las plantas cultivadas en condiciones de 16 °C como a 30/20 °C, se realizaron tres muestreos para obtener material que posteriormente se utilizó en los estudios de microscopía. Éstos se realizaron considerando los parámetros definidos por Counce *et al.*, (2000):

1. R0: corresponde a inicio de panícula (IP). En éste la panícula no supera 1 - 2 mm de longitud y ocurre 50 - 70 días después de la germinación.

2. R2: corresponde a diferenciación del polen (DP). Éste ocurre cuando se alinea el nudo de la hoja bandera y la hoja anterior.
3. R4: corresponde a antesis. Ocurre alrededor de 30 días después de IP y en la panícula del tallo principal se observan una o más espiguillas en antesis.

### **Obtención y fijación de anteras**

Los muestreos de panícula se realizaron: 1. diez días después R0 (antes de DP); 2. veinte días después de R0 (después de DP) y 3. alrededor de treinta días después de R0 (antesis). En ellos se recolectó una panícula de cada maceta correspondiente a cada cultivar, en los dos tratamientos de temperatura. Luego, se extrajo 5 espiguillas del tercio medio de cada panícula, obteniéndose así 15 espiguillas por cada cultivar y tratamiento de temperatura.

En el primer muestreo, dado el tamaño reducido de las espiguillas (4,0 - 7,0 mm), fue difícil extraer las anteras, por lo que se fijaron íntegramente en solución de Karnovsky (glutaraldehído al 2,5 %, paraformaldehído al 2 % y buffer fosfato 0,1 M (pH 7,4)) (Gothandam *et al.*, 2007). En el segundo y tercer muestreo se extrajeron las anteras de las espiguillas mediante remoción de la lema y la pálea, y posteriormente se fijaron en solución de Karnovsky. Con el objetivo de mejorar la penetración del fijador en el tejido, en los tres muestreos se hizo vacío a los contenedores con muestras. Posteriormente, todas las muestras fueron almacenadas en refrigerador (4 - 5 °C) hasta continuar con su preparación y obtener los cortes en que se efectuaron las observaciones microscópicas.

### **Post-fijación e inclusión de anteras**

Una vez fijadas las anteras fueron postfijadas en tetróxido de osmio ( $\text{OsO}_4$ ) al 1 % (p:v) en buffer fosfato de sodio 0,07 M (pH 7,4) durante 2 h a 4 °C (Gothandam *et al.*, 2007). Posteriormente, fueron deshidratadas usando una serie de acetona (30, 50, 70, 90 y 100 % (v:v)) por 30 minutos cada una. A continuación fueron secadas e incluidas en Araldita utilizando una estufa a 60 °C durante 12 h (Bozzola & Russell, 1999).

### **Obtención de cortes para microscopía**

Los cortes semifinos de anteras (90 a 100 nm de espesor) fueron realizados empleando un ultramicrotomo Sorvall MT 2-B. Las secciones obtenidas se depositaron sobre portaobjetos y se tiñeron con azul de toluidina.

Los cortes ultrafinos de anteras (40 a 50 nm de espesor), fueron realizados empleando un ultramicrotomo Sorvall MT 5000. Estos fueron recogidos en rejillas de cobre y teñidos con acetato de uranilo al 2,5 % (p:v) por 20 min. Luego, las rejillas fueron lavadas con agua destilada y se tiñeron con citrato de plomo por 7 min a temperatura ambiente.

Los cortes semifinos de anteras se observaron y fotografiaron con un microscopio óptico Zeiss modelo Axiostar Plus, equipado con una cámara fotográfica digital Cannon Powershot A-620. Se obtuvieron microfotografías con aumentos de 10x, 40x y 100x.

Por otro lado, las observaciones de los cortes ultrafinos se realizaron utilizando el microscopio electrónico de transmisión (MET) JEOL/JEM 1200 EX II, del Laboratorio de Microscopía Electrónica de la Universidad de Concepción. Las mediciones en las imágenes obtenidas con el MET se llevaron a cabo con el programa de morfometría geométrica TPSDig, versión 2.0, considerando como valor de referencia la escala de medida presente en la imagen.

### **Test de viabilidad de granos de polen**

La viabilidad de los granos de polen en las condiciones experimentales se determinó en el momento de la antesis, utilizando una panícula por maceta de cada cultivar y tratamiento de temperatura. Se extrajo dos espiguillas del tercio medio de la panícula y de éstas se obtuvieron cuatro anteras (Ortega *et al.*, 2011), las cuales fueron teñidas con tetrazolio. Para ello, las anteras se depositaron en placas Petri con una solución acuosa de 1 % (p:v) cloruro de 2,3,5 trifeniltetrazolio y 50 % (p:v) de sacarosa, luego se mantuvieron a 28 °C en oscuridad por 1 h (Gothandam *et al.*, 2007). Las anteras se observaron utilizando un microscopio óptico y se consideró polen viable aquel que se tiñó de color rojo y no viable el que no logró teñirse (Gothandam *et al.*, 2007; Peterson *et al.*, 2010). La determinación del porcentaje de viabilidad se realizó con el objetivo de 40x y se consideró un tamaño de muestra de

200 - 250 granos de polen. Se evaluaron las cuatro anteras y se calculó el promedio, el cual correspondió al porcentaje de viabilidad de cada cultivar.

### **Test de germinación de granos de polen**

Se realizó germinación *in vitro* empleando el método de Khatun & Flowers (1995), en un medio de germinación artificial en solución acuosa, conteniendo 20 g de sacarosa y 0,02 g de ácido bórico en 100 mL de agua destilada. En un portaobjetos cóncavo se agregó una alícuota del medio y se depositaron granos de polen procedentes de las anteras restantes de las espiguillas utilizadas en el test de viabilidad. Éstos se llevaron a una cámara de crecimiento a 20 °C por 24 h, para posteriormente con un microscopio óptico con el objetivo de 5x, observar 5 campos visuales y calcular el porcentaje de granos germinados. Así, se obtuvo un valor promedio el cual representó el porcentaje de germinación. Se consideró germinados aquellos en que el tubo polínico presentó una longitud igual o mayor al diámetro del grano de polen.

## **V. RESULTADOS**

### **Estados de desarrollo del polen durante la etapa reproductiva**

En las observaciones de los cortes provenientes de plantas cultivadas tanto a temperatura de 30/20 °C como a 16 °C, se determinó que en el primer muestreo (diez días después de estado R0) el polen se encontraba en la etapa de tétrada (Figura 3A - F); en el segundo muestreo (veinte días después de estado R0) en la etapa de polen vacuolado (Figura 3G - L); y en el tercer muestreo (estado de R4) en la etapa de polen maduro (Figura 3M - R).

### **I) Desarrollo de la pared de la antera a 16 °C durante la etapa reproductiva**

#### **Etapa de tétrada**

Las anteras de los tres cultivares sometidos a 16 °C presentaron una estrangulación que tiende a dividir en dos cada uno de los cuatro lóculos (Figura 4A-C, punta de flecha), variando de esta manera la forma esférica del lóculo desarrollada en condiciones de 30/20 °C (Figura 5A-C). En la pared de la antera sólo se distinguieron tres de los cuatro estratos celulares presentes a 30/20 °C (epidermis, endotecio, capa media y tapete) (Figura 3A, C, E), debido a la ausencia de la capa media y, a su vez, presentaron un aspecto contraído (Figura 3B, D, F). En ambas condiciones de

temperatura se observaron microsporas en estado de tétrada en el interior de los lóculos (Figura 3A-F).

Debido a que en las observaciones con MO en la etapa de tétrada sólo se observó daño en la forma del lóculo, el cual desapareció en las etapas posteriores, no se realizaron observaciones de dicha etapa utilizando MET, y se le dió prioridad a las etapas de polen vacuolado y maduro, donde el daño causado por la disminución de temperatura en la pared de la antera y en los granos de polen fue más evidente.

### **Etapa de polen vacuolado**

En condición de 30/20 °C, en la antera se encuentran presentes los cuatro estratos de la pared (Figura 5D – F y Figura 6A-C) y en el interior del lóculo se visualizan microsporas esféricas con apariencia normal, mientras que a 16 °C en ‘Diamante-INIA’ y ‘Brillante-INIA’ se observaron tres estratos, los cuales, al igual que en la etapa de tétrada, aún se presentan contraídos. Este daño se presenta en la mayor parte de los lóculos. En ellos se observó granos de polen atrofiados o deformes, con forma de medialuna (Figura 4D, E, asterisco y Figura 7J-K). ‘Diamante-INIA’ fue el cultivar con mayor daño, con tres de los cuatro lóculos de la antera con desarrollo anormal asociado a un menor tamaño, los cuales presentaron casi la totalidad de sus granos atrofiados (Figura 4D). En los tres cultivares, en algunos sectores del estrato tapetal se observó protuberancias o abultamientos del tejido hacia el interior del lóculo (Figura 4D, E, F, flechas) asociados a la ausencia de granos o deformación de éstos. En ‘Brillante-INIA’ se observó un lóculo totalmente dañado, tanto a nivel de los estratos que conforman la pared como en su contenido (Figura 4E) el cual se presentó contraído y sin granos de polen, ya que su interior estaba ocupado en su totalidad por el tapete. Otro de los lóculos se presentó relativamente normal en relación a su pared (Figura 4E, estrella). Sin embargo, todos sus granos estaban atrofiados y con forma de medialuna (Figura 4E, asterisco). A diferencia de ‘Diamante-INIA’ y ‘Brillante-INIA’, ‘Zafiro-INIA’ presentó un desarrollo normal de los cuatro lóculos de la antera, tanto en forma como en los estratos que conforman la pared. Los granos de polen, en su mayoría, presentaron aspecto normal, aunque se observó algunos sectores con granos deformes o de menor tamaño en las zonas en que el estrato tapetal presentó abultamientos (Figura 4F, flechas).

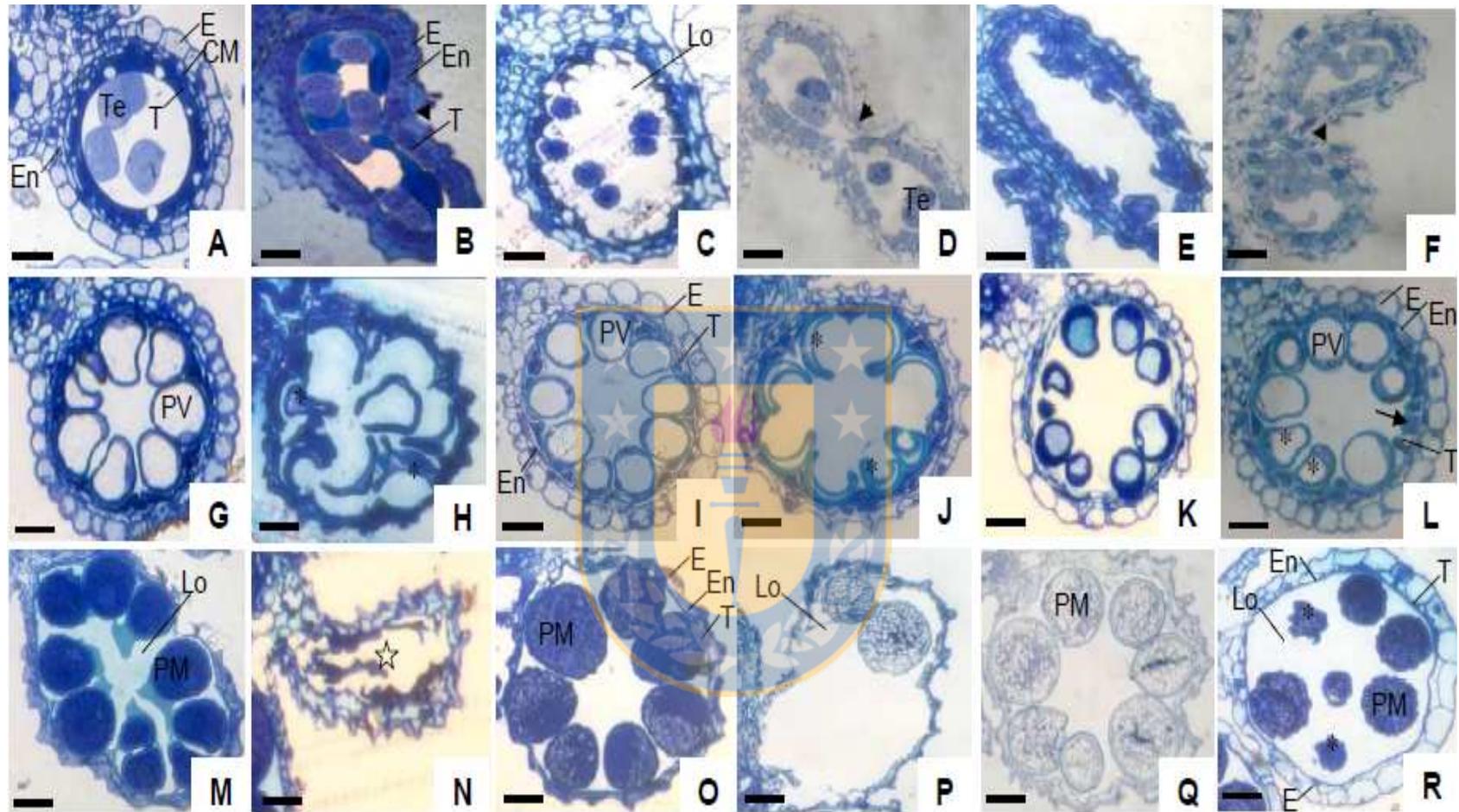


Figura 3. Microfotografías (MO) del desarrollo de la pared de la antera y grano de polen en arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva. 30/20 °C: ‘Diamante-INIA’, A, G, M; ‘Brillante-INIA’, C, I, O; ‘Zafiro-INIA’, E, K, Q. 16 °C: ‘Diamante-INIA’, B, H, N; ‘Brillante-INIA’, D, J, P; ‘Zafiro-INIA’, F, L, R. Etapa de tétrada, A – F; polen vacuolado, G – L; polen maduro, M – R. E, epidermis; En, endotecio; CM, capa media; T, tapete; Te, tétrada; Lo, lóculo; PV, polen vacuolado; PM, polen maduro; ☆, lóculo atrofiado; \*, grano deforme. Escala: 20 µm.

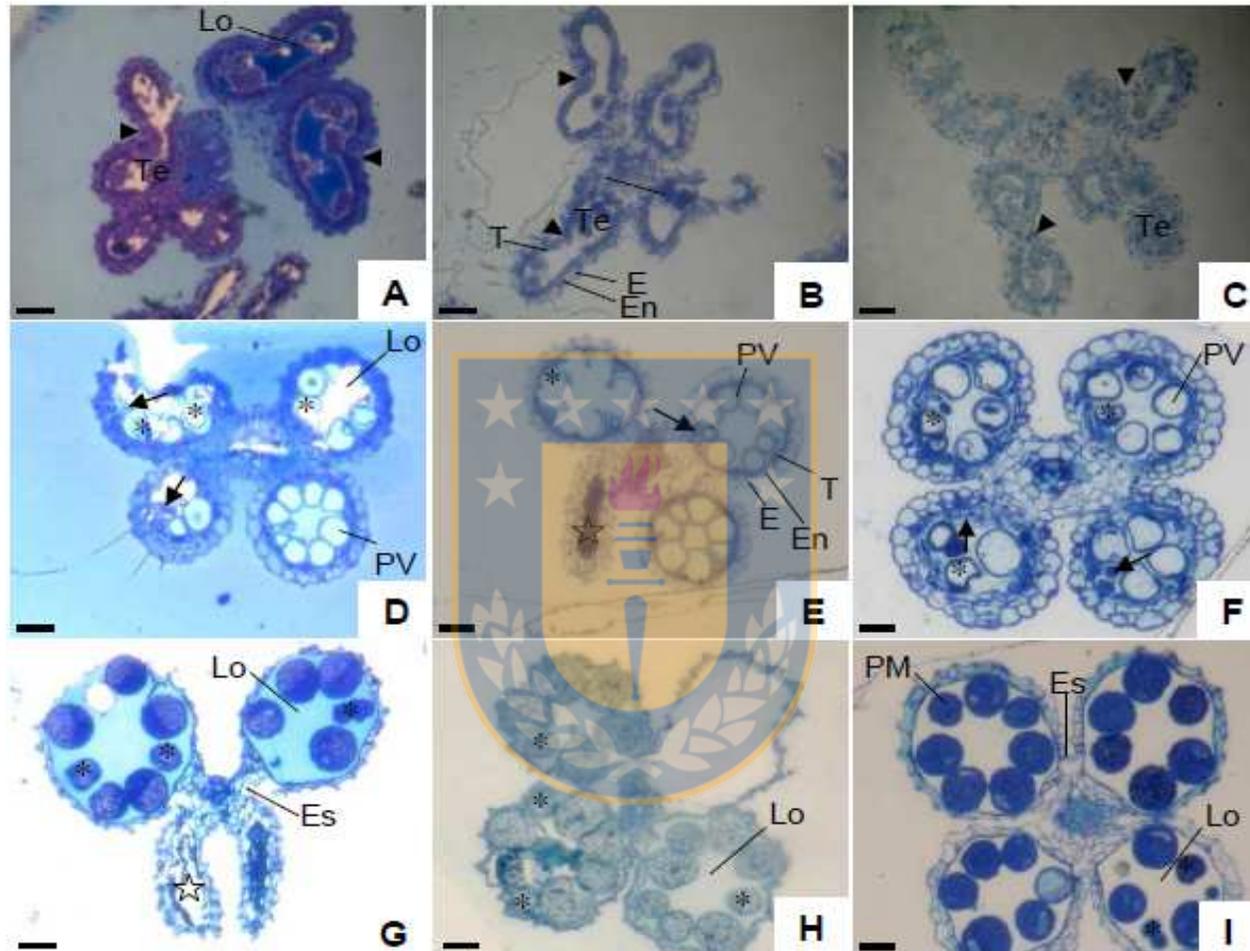


Figura 4. Microfotografías (MO) del desarrollo de antera de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva. A, D, G. 'Diamante-INIA'. B, E, H. 'Brillante-INIA'. C, F, I. 'Zafiro-INIA'. A – C, etapa de tétrada; D – F, polen vacuolado; G – I, polen maduro. E, epidermis; En, endoteco; CM, capa media; T, tapete; Te, tétrada; Lo, lóculo; PV, polen vacuolado; PM, polen maduro; Es, estomio. Flecha indica protuberancia del tapete; punta de flecha indica estrangulación de lóculo; ☆, lóculo atrofiado; \* , grano deforme. Escala: 20 µm.

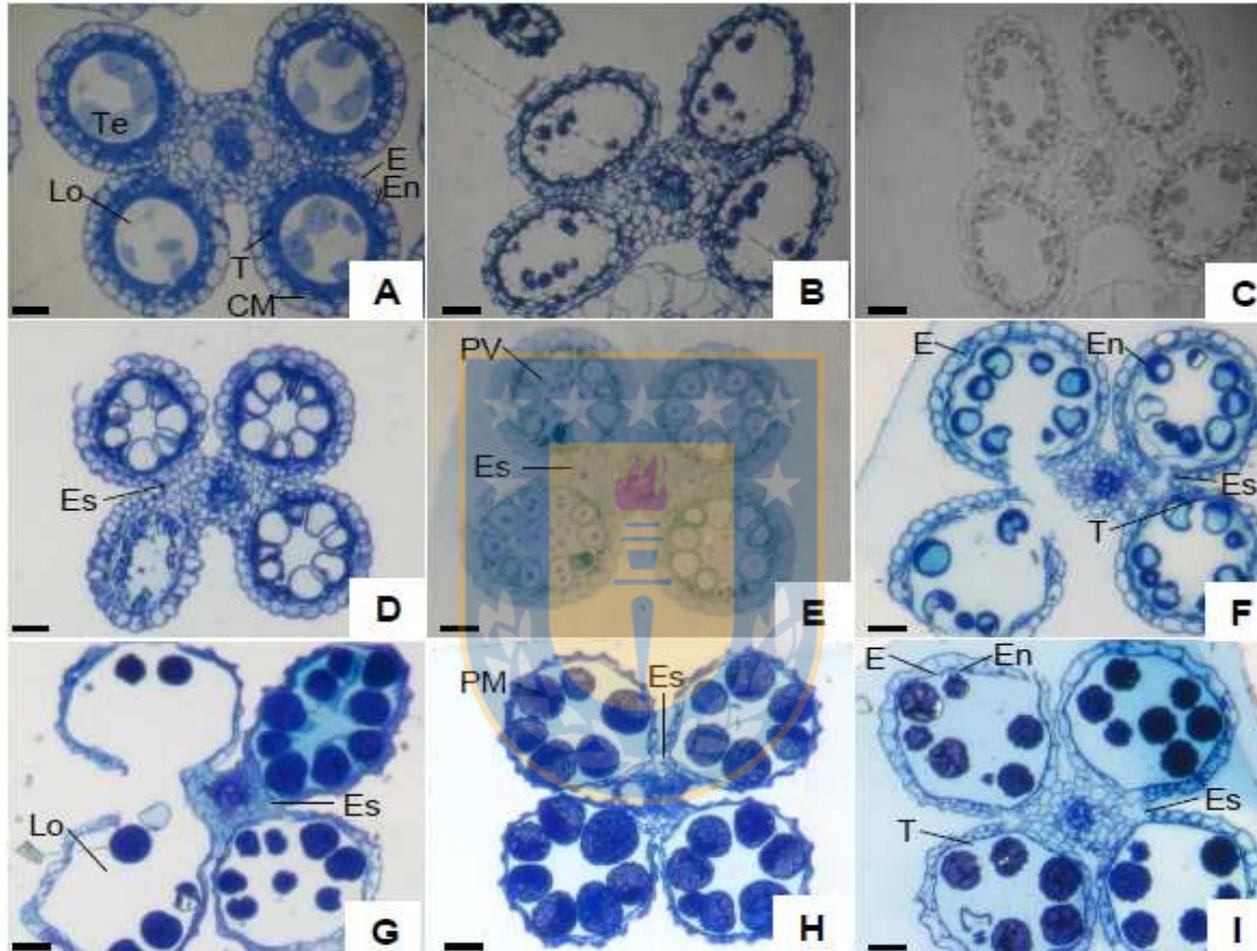


Figura 5. Microfotografías (MO) del desarrollo de antera de arroz a 30/20 °C durante la etapa reproductiva. A, D, G. 'Diamante-INIA'. B, E, H. 'Brillante-INIA'. C, F, I. 'Zafiro-INIA'. A – C, etapa de tétrada; D – F, polen vacuolado; G – I, polen maduro. E, epidermis; En, endotecio; CM, capa media; T, tapete; Te, tétrada; Lo, lóculo; PV, polen vacuolado; PM, polen maduro; Es, estomio. Escala: 20  $\mu$ m.

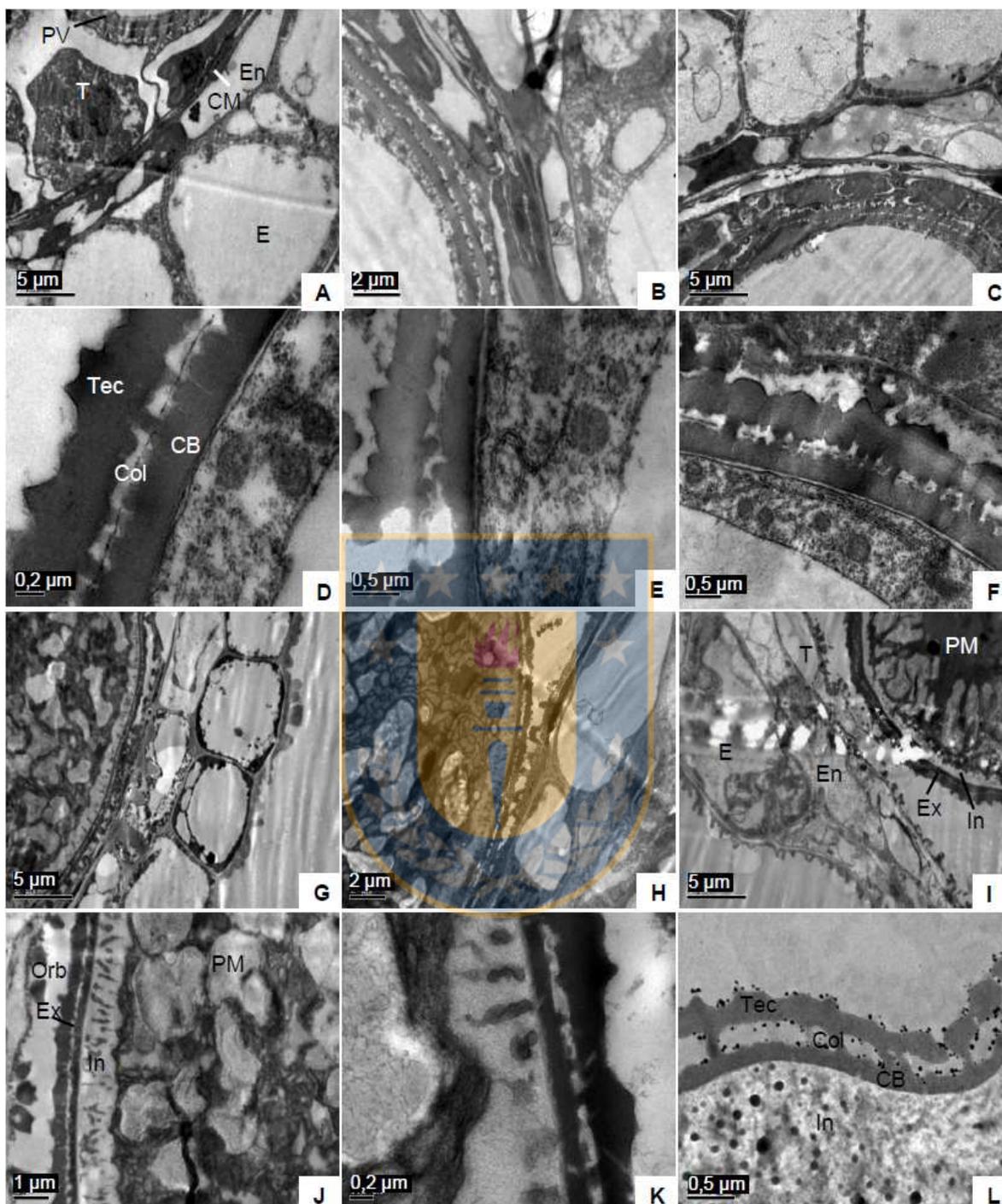


Figura 6. Microfotografías (MET) de la pared de la antera y exina de tres cultivares de arroz a 30/20 °C durante la etapa reproductiva. A, D, G, J. 'Diamante-INIA'. B, E, H, K. 'Brillante-INIA'. C, F, I, L. 'Zafiro-INIA'. A – F, polen vacuolado; G – L, polen maduro. E, epidermis; En, endotocio; CM, capa media; T, tapete; Orb, orbículos; PV, polen vacuolado; PM, polen maduro; Ex, exina; Tec, tectum; Col, columela; CB, capa basal; In, intina.

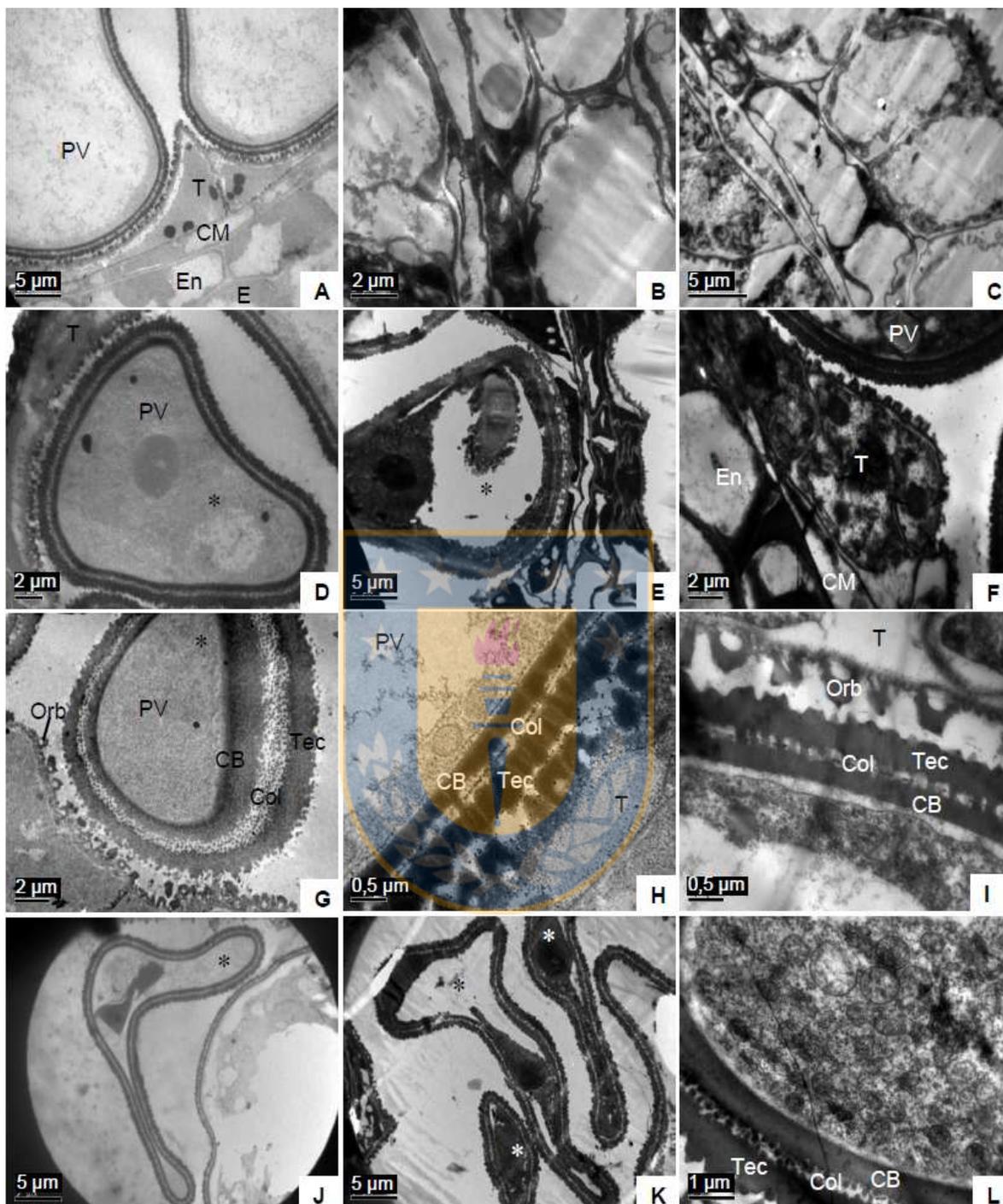


Figura 7. Microfotografías (MET) de la pared de la antera y exina en etapa de polen vacuolado, de tres cultivares de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva. A, D, G, J. 'Diamante-INIA'. B, E, H, K. 'Brillante-INIA'. C, F, I, L. 'Zafiro-INIA'. E, epidermis; En, endotecio; CM, capa media; T, tapete; Orb, orbículos; PV, polen vacuolado; Tec, Tectum; Col, columela; CB, capa basal; \* , grano deforme.

Los estratos de la pared de la antera a 30/20 °C presentaron las siguientes características: epidermis uniestratificada y con células redondeadas; endotecio uniestratificado con células rectangulares y aplanadas; la capa media como un estrato delgado formado por células efímeras, que colapsa una vez que la pared del grano está completamente formada; tapete, que corresponde al estrato más interno en contacto directo con el tejido esporógeno, constituido por una capa de células de espesor irregular (Figura 6A, B, C), ya que en los sectores en contacto directo con los granos está muy reducido y en las zonas entre granos presenta mayor desarrollo.

Producto de la exposición de las plantas de arroz a 16 °C se observó variaciones en el espesor de los estratos tanto a nivel de la pared de la antera como del grano de polen. El espesor de los estratos de la pared de la antera en la etapa de polen vacuolado en los cultivares 'Diamante-INIA' y 'Brillante-INIA' disminuyó, siendo mayor en 'Diamante-INIA', mientras que en 'Zafiro-INIA' aumentó el espesor de todos los estratos, siendo esto más notorio en el tapete (Tabla 1).

Tabla 1. Espesor (µm) de los estratos de la pared de la antera en etapa de polen vacuolado en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.

ETAPA POLEN VACUOLADO	'DIAMANTE-INIA'	'BRILLANTE-INIA'	'ZAFIRO-INIA'
<u>30/20 °C</u>			
Epidermis	9,0 - 12,0	7,5 - 9,5	9,5 - 10,5
Endotecio	2,0 - 4,0	2,0 - 3,0	3,5 - 4,0
Capa media	1,0 - 2,0	1,0 - 2,0	1,0 - 2,0
Tapete (contacto con grano)	2,0 - 4,5	2,0 - 4,0	2,5 - 3,0
Tapete (entre granos)	6,0 - 10,0	6,0 - 8,5	4,0 - 5,0
<u>16 °C</u>			
Epidermis	4,0 - 5,5	4,5 - 7,0	10,0 - 12,0
Endotecio	1,5 - 2,5	2,0 - 3,0	4,5 - 5,5
Capa media	1,0 - 1,5	1,2 - 1,6	1,0 - 2,5
Tapete (contacto con grano)	1,3 - 1,6	1,5 - 1,8	4,0 - 4,5
Tapete (entre granos)	5,0 - 6,0	4,0 - 8,0	6,5 - 8,0

El tapete fue el estrato más afectado por la exposición de plantas de arroz a 16 °C, manifestando cambios en el espesor y zonas con protuberancias con tendencia a invadir el lóculo. En las zonas en que el tapete presentó desarrollo anormal se observó un retículo endoplásmico (RE) con variaciones de la forma típica presente a 30/20 °C, la cual corresponde a forma o arreglo en pilas de sacos aplanados, que se considera un patrón normal. De esta manera, 'Diamante-INIA' presentó forma circular (Figura 8A), 'Brillante-INIA' forma serpenteada-ondulada (Figura 8B) y 'Zafiro-INIA' forma ondulada con tendencia a formar pilas de sacos aplanados (Figura 8C). En las zonas cercanas al RE se observó la presencia de otros organelos como plastidios, mitocondrias y cuerpos de lípidos, los cuales mostraron apariencia normal (Figura 8D, E, F).

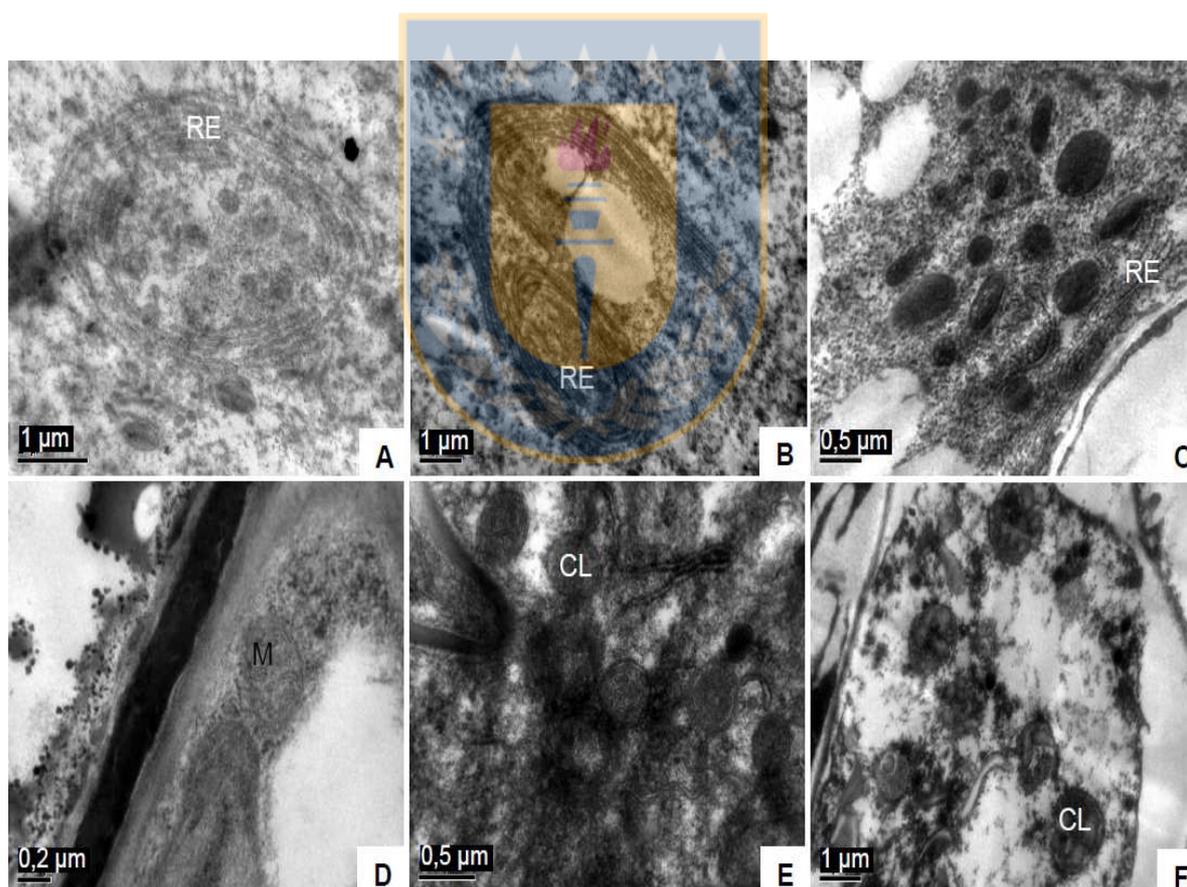


Figura 8. Microfotografías (MET) de tapete en etapa de polen vacuolado de tres cultivares de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva. A, D. 'Diamante-INIA'. B, E. 'Brillante-INIA'. C, F. 'Zafiro-INIA'. RE, retículo endoplásmico; CL, cuerpos de lípidos; M, mitocondria.

### **Etapa de polen maduro**

En condiciones de temperatura 30/20 °C los estratos se reducen a tres, siendo éstos la epidermis, endotecio y tapete, ya que la capa media sufre un colapso, considerado normal, entre el endotecio y tapete. Este último, a su vez, se presenta como una delgada capa recubriendo el interior del lóculo (Figura 6G-I). Los lóculos mantienen la forma circular normal y en su interior contienen granos de polen maduros (Figura 5G-I), que se caracterizan por formación completa de la pared (Figura 6J-L). La epidermis está formada por células redondeadas a aplanadas, y externamente fue posible distinguir un borde irregular. Debajo de este estrato se observó el endotecio, con células regulares de forma rectangular. En el tapete ya no fue posible distinguir la zona entre granos, como ocurrió en la etapa de polen vacuolado, ya que sólo está presente la zona en contacto con el grano (Figura 6G-I). En la cara interna del tapete se observaron depósitos correspondientes a orbículos o cuerpos de Ubisch (Figura 6J), de forma esférica a sub-esférica y con espículas superficiales dando un aspecto dentado.

A 16 °C siguieron presentes los mismos tres estratos de la etapa anterior (polen vacuolado). Sin embargo, se puede apreciar que en 'Diamante-INIA' dos de los cuatro lóculos de la antera están totalmente atrofiados, mostrándose contraídos y con ausencia total de granos (Figura 4G, estrella), mientras que en los lóculos con desarrollo normal se observó algunos granos de polen deformes, de menor tamaño (Figura 4G, asterisco). Así, al igual que en la etapa de polen vacuolado, este cultivar continúa siendo el más afectado por la exposición a 16 °C durante la etapa reproductiva. En 'Brillante-INIA' también se observó daño a nivel del lóculo, aunque en menor medida que 'Diamante-INIA', presentándose como una deformación que modifica la forma circular típica, adoptando con ello un aspecto irregular. Este daño se acompaña de una ausencia total de granos (Figura 4H) o presenta un contenido mínimo. Por otro lado, en 'Zafiro-INIA' se observó desarrollo casi normal tanto a nivel de lóculo como de grano de polen. En éste dos lóculos presentaron menor tamaño y algunos granos de polen con tamaño reducido (Figura 4I).

Los estratos que conforman la pared de la antera a 16 °C presentaron un menor espesor respecto a 30/20 °C, siendo en el cultivar 'Zafiro-INIA', donde esto fue más

notorio, en el cual disminuyó entre 40-60% (Tabla 2). El espesor de la epidermis en los tres cultivares disminuyó entre 30-40% y no se presentó como un estrato formado por células redondeadas, ya que producto de la disminución de temperatura adquirieron una forma más bien aplanada y contraída. A su vez, el borde externo del estrato epidérmico fue más irregular y pronunciado, siendo más notorio en 'Diamante-INIA' (Figura 9A, B, C). En éste las protuberancias fueron más frecuentes y agudas respecto a 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA' (Figura 9A, B, C). El endotecio, disminuyó entre 60-70% en los cultivares 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA' (Tabla 2), mientras que en 'Diamante-INIA' se mantuvo el espesor. El tapete presentó un espesor reducido, siendo el menor de todos los estratos. Al exponer las plantas de arroz a 16 °C el espesor de éste disminuyó entre 50-60 %. Por otro lado, en este estrato destacó la presencia de orbículos los cuales fueron más abundantes en 'Diamante-INIA' (Figura 9A).

Tabla 2. Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared de la antera en etapa de polen maduro en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.

ETAPA POLEN MADURO	'DIAMANTE-INIA'	'BRILLANTE-INIA'	'ZAFIRO-INIA'
<u>30/20 °C</u>			
Epidermis	6,5 - 7,0	5,0 - 8,0	3,5 - 4,0
Endotecio	4,0 - 4,5	3,5 - 4,0	3,0 - 3,5
Tapete (contacto con grano)	2,0 - 3,0	1,5 - 2,0	1,0 - 1,5
Tapete (entre granos)	Ausente	Ausente	Ausente
<u>16 °C</u>			
Epidermis	4,5 - 6,0	3,0 - 5,0	2,0 - 3,5
Endotecio	4,0 - 4,5	1,0 - 1,5	1,0 - 1,5
Tapete (contacto con grano)	1,0 - 1,3	0,5 - 1,0	0,5 - 0,6
Tapete (entre granos)	2,0 - 4,0	Ausente	Ausente

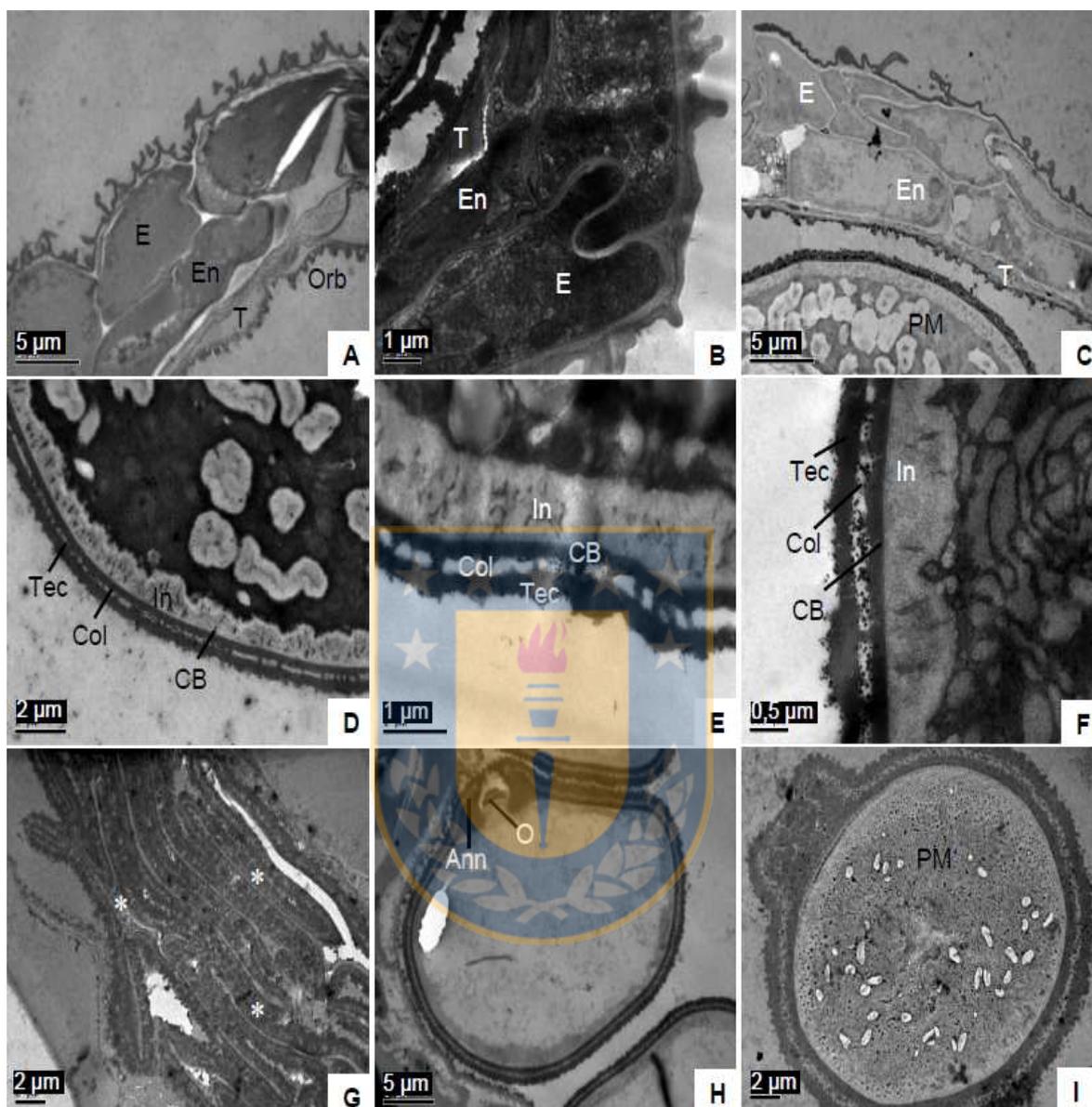


Figura 9. Microfotografías (MET) de la pared de la antera y exina en etapa de polen maduro, de tres cultivares de arroz a 16 °C durante la etapa reproductiva. A, D, G. 'Diamante-INIA'. B, E, H. 'Brillante-INIA'. C, F, I. 'Zafiro-INIA'. E, epidermis; En, endotecio; T, tapete; Orb, orbículos; PM, polen maduro; Tec, Tectum; Col, columela; CB, capa basal; I, intina; Ann, *annulus*; O, opérculo; \*, grano deforme.

## II) Desarrollo de la pared del grano de polen a 16 °C durante la etapa reproductiva

### Etapa de polen vacuolado

En esta etapa, tanto a 16 °C como a 30/20 °C, el grano de polen presentó un citoplasma ocupado casi en su totalidad por una gran vacuola (Figura 4D-F y Figura 5D-F) y la presencia de exina (Figura 6A-F y Figura 7A-L). La pared del grano, presentó una exina diferenciada en tectum, columela (infratectum) y capa basal (Figura 6D-F y 7G-I). En ambas condiciones de temperatura el tectum se observó ondulado, continuo y granular, mientras que la columela infratectal sufrió daño producto de la exposición a 16 °C, cambiando la conformación de báculos simples, cortos y delgados (Figura 6D-F) a una forma desorganizada y con aspecto granular. Este cambio fue más evidente en 'Diamante-INIA' (Figura 7G). La capa basal o foot-layer se observó continua, granular y con un espesor similar al tectum (Figura 6D-F y Figura 7G-I).

Dado que en la exina se reconoció la presencia de tectum, columela y capa basal, con ausencia de endexina, se determinó que la exina presente en los tres cultivares de arroz estudiados es completamente ectexinosa (Walker & Doyle, 1975).

Al exponer las plantas a 16 °C ocurrió deformación del grano del polen, ya sea en su totalidad o parcialmente, afectando la porción correspondiente a la pared, siendo más notorio en los cultivares 'Diamante-INIA' y 'Brillante-INIA' (Figura 4D-E, asterisco). Mientras que el daño en 'Zafiro-INIA' se relacionó con granos de menor tamaño (Figura 4F, asterisco). La variación en la forma de los granos se manifestó como un cambio desde la forma esférica, observada a 30/20 °C (Figura 5D-F), a granos deformes, con hendiduras en sus costados, adquiriendo así forma de medialuna, triangular o aspecto contraído (Figura 4D-F y Figura 7J, K). A su vez, el espesor de la pared del grano de polen aumentó en los tres cultivares, siendo en el cultivar 'Zafiro-INIA' donde esto fue más notorio, ya que la porción de la pared correspondiente a la exina varió entre 60-80 % respecto a la condición de 30/20 °C (Tabla 3). En las zonas donde se presentaron granos deformes, el tapete manifestó

un cambio de espesor, asociado a un abultamiento o protuberancia con tendencia a invadir el lóculo de la antera.

Tabla 3. Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared del grano de polen en etapa de polen vacuolado en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.

ETAPA POLEN VACUOLADO	'DIAMANTE-INIA'	'BRILLANTE-INIA'	'ZAFIRO-INIA'
<u>30/20 °C</u>			
Exina	0,55 - 0,80	0,80 - 1,00	0,85 - 1,00
<i>Tectum</i>	0,20 - 0,40	0,40 - 0,45	0,45 - 0,55
Columela	0,20 - 0,30	0,20 - 0,30	0,20 - 0,30
Capa basal	0,30 - 0,45	0,40 - 0,45	0,3 - 0,35
<u>16 °C</u>			
Exina	1,00 - 1,30	1,00 - 1,50	1,50 - 1,80
<i>Tectum</i>	0,60 - 0,80	0,40 - 0,60	0,60 - 0,65
Columela	0,25 - 0,40	0,40 - 0,50	0,30 - 0,40
Capa basal	0,20 - 0,25	0,30 - 0,40	0,50 - 0,60

### Etapa de polen maduro

El grano de polen de los tres cultivares fue el típico de Poaceae, es decir esférico, monoporado, con poro provisto de *annulus* y opérculo (Figura 9H, I). Tanto a 16 °C como a 30/20 °C se observó exina e intina completamente formada (Figura 9D-F y Figura 6J-L). La exina se presentó estratificada en tectum, columela y capa basal, mientras que la intina se presentó a continuación de ésta como un estrato único, cuyo espesor fue equivalente entre 30-50 % de la exina y de aspecto translúcido. Al cultivar plantas a 16 °C se observó que el espesor de la exina disminuyó entre 20-50 % en los tres cultivares estudiados (Tabla 4). A su vez, la intina redujo su espesor alrededor de 20% en 'Diamante-INIA' y 'Brillante-INIA'. En contraste 'Zafiro-INIA' aumentó entre 50 a 80 %.

Tabla 4. Espesor ( $\mu\text{m}$ ) de los estratos de la pared del grano de polen en etapa de polen maduro en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.

ETAPA POLEN MADURO	'DIAMANTE-INIA'	'BRILLANTE-INIA'	'ZAFIRO-INIA'
<u>30/20 °C</u>			
Exina	0,75 - 0,85	0,85 - 1,00	1,00 - 1,50
<i>Tectum</i>	0,50 - 0,60	0,30 - 0,50	0,45 - 0,55
Columela	0,10 - 0,15	0,25 - 0,30	0,30 - 0,35
Capa basal	0,15 - 0,20	0,20 - 0,25	0,30 - 0,45
Intina	1,00 - 1,20	1,15 - 1,30	0,80 - 1,00
<u>16 °C</u>			
Exina	0,60 - 0,80	0,65 - 0,80	0,70 - 0,80
<i>Tectum</i>	0,25 - 0,30	0,20 - 0,25	0,25 - 0,30
Columela	0,20 - 0,30	0,15 - 0,20	0,10 - 0,15
Capa basal	0,20 - 0,30	0,10 - 0,15	0,15 - 0,20
Intina	0,80 - 1,00	0,90 - 1,20	1,20 - 1,80

Respecto a la forma del grano de polen, en 'Diamante-INIA' se observó presencia de granos completamente atrofiados en el interior del lóculo, manifestándose como una contracción severa de éstos (Figura 4G y Figura 9G, asterisco). En 'Brillante-INIA' existió deformación a la forma de hendiduras leves en el contorno del grano (Figura 4H y Figura 9H). En 'Zafiro-INIA' sólo hubo daño a nivel de pared, principalmente en el estrato correspondiente a la columela, la cual se presentó de tipo granular (Figura 9F, I) a diferencia de la organización bacular presente en condiciones de 30/20 °C (Figura 6L).

### **Viabilidad y germinación de polen en antesis**

Al evaluar la viabilidad de polen en los tres cultivares, se observó que al someter las plantas de arroz a 16 °C disminuyó la producción de granos de polen por antera entre 30-40 % (Tabla 5). A su vez, el porcentaje de viabilidad disminuyó entre 25 y 43 %, siendo visible una menor cantidad de granos teñidos de color rojo intenso

con la tinción con tetrazolio (Figura 10D, E, F), respecto a lo observado en anteras de plantas de arroz sometidas a 30/20 °C (Figura 10A, B, C).

En el test de germinación de polen, el promedio de granos observados por campo visual varió entre 5 y 15. En los tres cultivares a 16 °C se observó menor cantidad de granos germinados (Figura 11D, E, F), obteniendo valores de porcentaje de germinación entre 33 y 55%, mientras que a 30/20 °C los valores estuvieron entre 68 y 80 % (Tabla 5). El cultivar 'Diamante-INIA' fue el más afectado, ya que presentó el menor porcentaje de germinación de polen con un valor de 33 %.

Tabla 5. Número de granos de polen por antera, viabilidad y germinación de granos de polen en tres cultivares de arroz a 30/20 °C y 16 °C durante la etapa reproductiva.

CULTIVAR	GRANOS/ANTERA		VIABILIDAD (%)		GERMINACIÓN (%)	
	30/20 °C	16 °C	30/20 °C	16 °C	30/20 °C	16 °C
'Diamante-INIA'	832	563	82	46	68	33
'Brillante-INIA'	897	596	86	54	75	41
'Zafiro-INIA'	915	685	91	68	80	55

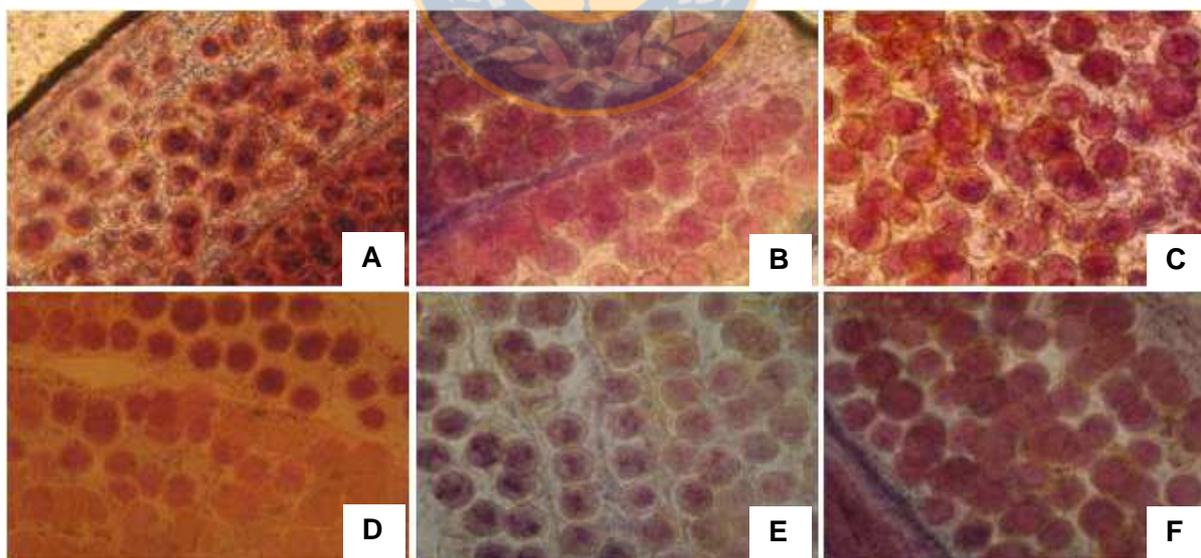


Figura 10. Tinción con tetrazolio de granos de polen de tres cultivares de arroz en etapa de antesis a 30/20 °C y 16 °C. A – C: 30/20 °C. D – F: 16 °C. A, D. 'Diamante-INIA'. B, E. 'Brillante-INIA'. C, F. 'Zafiro-INIA'.

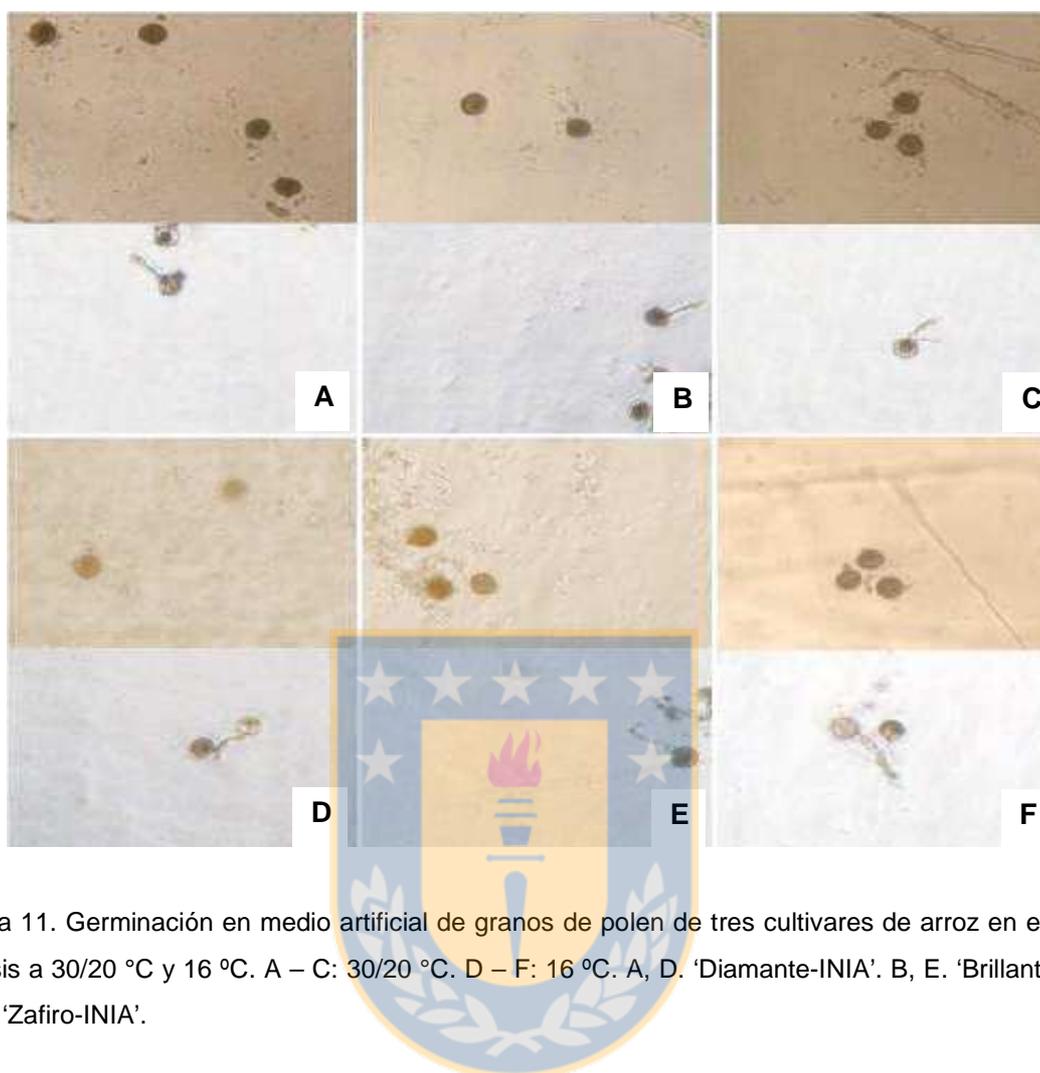


Figura 11. Germinación en medio artificial de granos de polen de tres cultivares de arroz en etapa de antesis a 30/20 °C y 16 °C. A – C: 30/20 °C. D – F: 16 °C. A, D. 'Diamante-INIA'. B, E. 'Brillante-INIA'. C, F. 'Zafiro-INIA'.

Otro antecedente que cabe mencionar es que al cultivar plantas a 16 °C, se retrasó el crecimiento del cultivo, lo cual generó un desfase en los momentos de muestreo. Así, el primer muestreo (diez días después de estado R0) se debió realizar alrededor de 30 días después que en las plantas cultivadas en invernadero a 30/20 °C. El segundo muestreo (veinte días después de estado R0) se realizó 30 días después que a 30/20 °C. Finalmente, el tercer muestreo (estado de R4) se realizó 40 días después que en las plantas cultivadas a 30/20 °C.

## VI. DISCUSIÓN

El rendimiento de grano en arroz, así como también en otros cultivos de cereales, es afectado por la exposición de las plantas a estrés térmico, ya sea frío o calor, durante

la etapa reproductiva. Estas condiciones provocan daño, principalmente, a nivel de las estructuras reproductivas masculinas, representadas por la antera y el grano de polen. La baja temperatura está asociada directamente con esterilidad de polen, afectándose con ello la polinización y, por lo tanto, la formación del fruto (Zinn *et al.*, 2010; Dolferus *et al.*, 2011).

Las temperaturas mínimas extremas que causan daño por frío durante la estación cálida son el principal desastre agrometeorológico en las zonas de clima templado a nivel mundial, siendo los cultivos de arroz, sorgo, maíz y soya los más vulnerables al daño por frío (Fengjin & Lianchun, 2011). Entre éstos destaca el cultivo de arroz, el cual es muy sensible durante la etapa reproductiva, ocasionando esterilidad de espiguillas. En otros cultivos, como garbanzo (*Cicer arietinum* L.), las bajas temperaturas causan abscisión floral y con ello reducen la formación de vainas. En el trigo (*Triticum aestivum* L.) afectan la fenología y el llenado del grano, prolongando el tiempo necesario para completar la fase de pre-floración (Thakur *et al.*, 2010).

En las observaciones realizadas en este estudio, tanto con microscopía óptica como electrónica de transmisión, se demostró que al exponer plantas de los cultivares de arroz Diamante-INIA, Brillante-INIA y Zafiro-INIA a 16 °C durante la etapa reproductiva, ocurre daño tanto a nivel de la pared de la antera como del grano de polen, siendo la etapa de polen vacuolado (Figura 4D-F) donde el daño fue más notorio y, en general, repercute en la etapa siguiente de polen maduro (Figura 4G-I), observándose pérdida de viabilidad de polen (Tabla 5). La determinación en este estudio de la etapa de polen vacuolado como la más dañada por la disminución de contrasta con lo reportado por Satake & Hayase (1970) y Gothandam *et al.* (2007), quienes al evaluar arroz subsp. *japonica* mencionan la etapa de tétrada como la más sensible a la disminución de temperatura (12-16 °C) durante el desarrollo del polen.

Por otro lado, en condiciones de alta temperatura, una etapa que es determinante corresponde a la antesis. Específicamente en lo que se refiere a la dehiscencia de la antera, ya que la alta temperatura provoca incremento del déficit de presión de vapor, promoviendo la evaporación desde las anteras, privando así de la humedad necesaria para el aumento de volumen del grano de polen, lo cual es imprescindible para la dehiscencia de la antera (Matsui & Omasa, 2002; Wassmann *et al.*, 2009).

En los tres cultivares expuestos a 16 °C se observó daño en la antera en los tres estados de desarrollo del polen, ya sea a nivel de la pared y/o atrofia total de lóculo, siendo los cultivares 'Diamante-INIA' y 'Brillante-INIA' los más afectados (Figura 4A-I). El daño a nivel locular también fue mencionado por Shi *et al.* (2010) en anteras estériles de rábano (*Raphanus sativus* L.), observando distintos niveles de degeneración de los lóculos. Sin embargo, éste ocurrió en la etapa de tétrada y estuvo acompañado del hinchamiento o protuberancia de las células tapetales.

En las observaciones de anteras de los tres cultivares expuestos a 16 °C, en la etapa de polen vacuolado, se observó que el estrato más afectado corresponde al tapete, el cual presentó abultamientos o protuberancias del tejido con tendencia a invadir el lóculo. Estos sectores se encuentran acompañados por la presencia de granos deformes o, en algunos casos, de ausencia de ellos (Figura 4D, E, F, flechas). Similares observaciones fueron realizadas por Gothandam *et al.* (2007), al evaluar anteras de plantas de arroz subsp. *japonica* sometidas a disminución de temperatura (16, 18 y 20 °C) durante la etapa reproductiva. Ellos encontraron que el tapete fue el tejido más sensible al estrés por baja temperatura, provocando esterilidad masculina debido a la pérdida funcional del tejido, manifestándose desde la etapa de tétrada hasta polen vacuolado.

Respecto a la hipertrofia en el tapete Mamun *et al.* (2006) mencionan que la dilatación tapetal puede deberse a un incremento de la concentración de azúcar y presión de turgor en el tejido. El incremento anormal del volumen y vacuolación de las células tapetales en plantas con esterilidad masculina sería causado por retención de moléculas que normalmente son utilizadas por las microsporas en desarrollo o por reabsorción de azúcares derivados de la degradación prematura de la pared de calosa, en las células tapetales. A su vez, se relaciona con acumulación de almidón en los plastidios, la cual podría deberse a interrupción del transporte de carbono hacia el lóculo, incrementándose la concentración de azúcares en los estratos celulares externos y estimulando la acumulación de almidón en los plastidios de los tejidos de la pared de la antera (Mamun *et al.*, 2006). La inducción de esterilidad de polen por frío involucra la interrupción del transporte de azúcar hacia las anteras, debido a la imposibilidad de transportar azúcar vía apoplasto en el tapete (Oliver *et al.*, 2007).

Al realizar observaciones detalladas del tapete en los tres cultivares en la etapa de polen vacuolado, el retículo endoplásmico (RE) en anteras de plantas cultivadas a 16 °C presentó variaciones respecto al patrón normal de la forma o arreglo presente en condiciones de 30/20 °C. Considerando que el patrón normal corresponde a pilas de sacos aplanados, las variaciones producto de la exposición a 16 °C fueron circular, serpenteada-ondulada y ondulada con tendencia a formar pilas (Figura 8A, B, C). Este daño en el RE también fue observado por Gothandam *et al.* (2007) quienes mencionan que los diferentes patrones de arreglo del RE en el tapete, que se generan producto del estrés por baja temperatura, pueden afectar su rol fisiológico en el desarrollo del polen, provocando con ello esterilidad masculina. La importancia del RE radica en que es el responsable de la síntesis y maduración de proteínas que posteriormente serán secretadas, y a nivel del metabolismo celular, participa en la síntesis de calasa y celulosa, lípidos y regulación del calcio (Gothandam *et al.*, 2007). El cultivar 'Diamante-INIA' fue el más afectado por la disminución de temperatura. Éste presentó RE con forma circular (Figura 8A). En relación a esto se considera que la forma circular o concéntrica es el resultado del estrés por disminución de temperatura, siendo observada en anteras estériles y se asocia a un bajo nivel de energía celular. Esto ocasiona una falla en la actividad secretora de las células tapetales, provocando con ello esterilidad masculina (Gothandam *et al.*, 2007; Shi *et al.*, 2010).

Otro daño observado en la etapa de polen vacuolado, producto de la exposición a 16 °C, fue la presencia de granos de polen de menor tamaño o deformes, con forma de medialuna. En 'Diamante-INIA' y 'Brillante-INIA' estos fueron más abundantes (Figura 4D, E). A su vez, ambos cultivares presentaron un menor porcentaje de viabilidad y germinación de polen, asociando así la forma de los granos de polen con la viabilidad de éstos. En este sentido, Graça *et al.* (2005) observaron presencia de granos de polen estériles con forma de medialuna en Bromeliaceae, lo cual también estuvo relacionado con hipertrofia tapetal.

En la etapa de polen maduro en los tres cultivares evaluados, en el estrato de la pared correspondiente a la epidermis se observó deformación en la porción externa de ésta, mostrándose más irregular y pronunciada. Esto fue más notorio en

'Diamante-INIA' (Figura 9A), en el cual aumentó la frecuencia de protuberancias más agudas respecto a 'Brillante-INIA' y 'Zafiro-INIA' (Figura 9B, C). Este tipo de daño también fue observado por Mamun *et al.* (2006) quienes, al evaluar el efecto del frío (22/12 °C, día/noche) en arroz, encontraron alteraciones tanto a nivel de la pared de la antera como del grano de polen, causadas por la exposición a disminución temperatura durante el período de desarrollo reproductivo.

Otro de los estratos de la pared de la antera que presentó alteraciones en la etapa de polen maduro a causa de la disminución de temperatura, fue el tapete. En 'Diamante-INIA' se observó presencia de tapete, ya sea en contacto directo con el grano donde el espesor fue mayor respecto a los otros cultivares estudiados, o en la zona entre granos (Figura 9A), la cual sólo estuvo presente en este cultivar. Por lo tanto, es evidente que existe un retraso en la muerte celular del estrato (Tabla 3). El tapete a su vez, se encuentra acompañado por orbículos recubriendo la cara interna, los cuales se encontraron en una frecuencia mayor en el cultivar Diamante-INIA (Figura 9A). Li *et al.* (2011) mencionan que existe una relación entre el retraso en la muerte celular del tapete y la pérdida de viabilidad del polen. Ellos señalan que la ausencia de muerte celular programada del tapete y, por ende, la persistencia de este estrato en la etapa avanzada del desarrollo del polen, desencadena en una proliferación descontrolada de las células tapetales e hinchamiento de éstas, acumulación de orbículos y desarrollo anormal de la pared del polen, provocando pérdida de viabilidad, que se manifiesta en esterilidad masculina (Li *et al.*, 2011). Los orbículos son partículas de esporopolenina y están presentes sólo en especies que tienen tapete secretor (Lazarova, 2003; Wang *et al.*, 2003). Estos representan un mecanismo de transporte de esporopolenina entre el tapete y las microsporas en desarrollo, teniendo un rol activo en la formación de la pared del grano, específicamente la exina (Huysmans *et al.*, 1998; Lovisolo & Galati, 2012).

Dolferus *et al.* (2011) mencionan que la sensibilidad del desarrollo del gametofito masculino al estrés abiótico puede estar relacionada con las propiedades únicas de la capa más interna de la pared de la antera, correspondiente al tapete. Durante la meiosis y en la etapa de microspora joven el tapete se caracteriza por ser metabólicamente muy activo (Oliver *et al.*, 2007). Éste secreta precursores para la

síntesis de exina e intina de la pared del polen y fluidos hacia el interior del lóculo que contienen nutrientes que sirven para el desarrollo de los granos (Steer, 1977; Pacini *et al.*, 1985; Bedinger, 1992). Después de cumplir con su función, se produce la muerte celular programada en el tapete y su contenido celular es absorbido por las microsporas, depositándose como pollenkitt sobre el grano de polen maduro. Tanto el estrés por frío como por sequía han mostrado ser la causa de muerte celular prematura del tapete, sugiriendo que el estrés abiótico interfiere con funciones importantes de éste. Por lo tanto, el momento en que ocurre la muerte de este tejido es crítica para la viabilidad del polen. Así, las variadas alteraciones metabólicas que conducen a la muerte celular prematura o retrasada del tapete causan esterilidad masculina (Oliver *et al.*, 2007). Estos mismos autores atribuyen al ácido abscísico (ABA) un rol esencial en el control de la muerte celular programada, generando la degradación natural del tapete. Al evaluar cultivares australianos de arroz subsp. *japonica*, uno sensible al frío y otro tolerante, expuestos a 12 °C durante la etapa reproductiva, observaron que el ABA podría ser la señal para inducir esterilidad de polen. Esto, porque se incrementó los niveles de ABA en la antera del cultivar sensible respecto al cultivar tolerante. En este último el nivel de ABA fue significativamente inferior en condiciones normales y después del tratamiento con frío. Por otro lado, Westgate *et al.* (1996) observaron que el ABA en espiguillas de trigo expuesto a condiciones de estrés por sequía, también indujo esterilidad de polen.

Zinn *et al.* (2010) indican que tanto el estrés por frío o calor induce la producción de especies de oxígeno reactivas (ROS), las cuales a elevadas concentraciones pueden causar daño oxidativo y, potencialmente, la muerte celular, especialmente en las etapas de desarrollo del polen y la floración. Por otro lado, Julia & Dingkuhn (2013) mencionan que plantas tolerantes al frío en la etapa reproductiva tienen más enzimas antioxidantes que protegen a los tejidos.

En las observaciones de la pared del grano de polen en etapa de polen maduro, procedente tanto de plantas cultivadas a 30/20 °C como a 16 °C, se observó que la pared carece de endexina y corresponde al tipo III según la clasificación de Walker & Doyle (1975). Esto concuerda con observaciones de granos de polen de otras

especies de cereales, tales como *Triticum aestivum* L., *Secale cereale* L., *Zea mays* L. y *Avena sativa* L. (Diethart *et al.*, 2007).

En la etapa de polen maduro, producto de la exposición de las plantas de arroz a 16 °C, el espesor de la pared del grano de polen en los tres cultivares disminuyó con respecto a las plantas cultivadas a 30/20 °C durante la etapa reproductiva. Según Mamun *et al.* (2006) los cambios en la ultraestructura celular en plantas expuestas a baja temperatura se visualizan en microsporas con insuficiente formación de la pared del grano de polen, asociada a una pérdida funcional del tejido tapetal, causando finalmente la esterilidad de polen.

Al evaluar la viabilidad y germinación de polen se observó que los valores de estos parámetros disminuyeron al someter las plantas de los tres cultivares a 16 °C (Tabla 5). Esto podría indicar que el mayor daño causado por la disminución de temperatura ocurre en la etapa de antesis. Sin embargo, mediante las observaciones utilizando microscopía, se determinó que el mayor daño fue en la etapa de polen vacuolado (Figura 4D, F y Figura 7A-L). En general, la esterilidad del polen se observó en la última etapa de desarrollo reproductivo, correspondiente a la antesis, en la cual el polen está maduro. Pero esto no significa que el daño por estrés abiótico haya ocurrido en dicha etapa, sino que muchas veces es consecuencia de estrés en etapas anteriores de desarrollo. En este sentido, Dolferus *et al.* (2011) mencionan que, en situaciones prolongadas de estrés, que abarcan tanto la etapa de microspora joven como la antesis, se espera observar el efecto acumulativo del daño de ambas etapas. Por lo tanto, la esterilidad que se atribuye a estrés en antesis en realidad puede haber sido causada en la etapa de microspora joven.

La evaluación de la viabilidad del polen en el momento de la antesis permite estimar a futuro cuanto será la pérdida de rendimiento, producto de la esterilidad de espiguillas como consecuencia de esterilidad de polen. Además, conocer el potencial de viabilidad de polen sirve para la selección de material en los programas de mejoramiento y para determinar qué factores de manejo pueden influir en la vanazón o esterilidad floral (Ortega *et al.*, 2011).

La disminución de viabilidad y germinación de polen, producto del estrés térmico, no sólo se ha observado en la subsp. *japonica* expuestas a condiciones de baja

temperatura, sino que también en la subsp. *indica* bajo condiciones de alta temperatura. En este sentido Chakrabarti *et al.* (2010) evaluaron el efecto de alta temperatura (28 - 34 °C) sobre la viabilidad de polen de diferentes variedades de arroz de la subsp. *indica* y observaron que el aumento de temperatura incrementó la esterilidad de polen y redujo la germinación de los granos sobre el estigma. A la vez, existió diferencia entre cultivares en el porcentaje de daño, tanto en la esterilidad como en la germinación del polen, demostrando que la germinación del polen en arroz no sólo es sensible al frío sino que también al calor, como también se ha observado en cultivos de *Arachis hypogaea* y *Glycine max* (Wassmann *et al.*, 2009).

La observación de un desfase en la duración de la etapa reproductiva, considerando como etapa final la antesis, causado por exposición a disminución de temperatura (16 °C), concuerda con Subedi *et al.* (1998) quienes, al estudiar el efecto de las bajas temperaturas (< 10 °C) desde inicio de la etapa reproductiva hasta antesis en cultivares de trigo de invierno con diferente susceptibilidad al frío, encontraron que la baja temperatura en la etapa reproductiva incidió sobre el período de desarrollo del cultivo y la formación del grano de polen. Los cultivares sensibles al frío tardaron más tiempo en alcanzar la etapa antesis. A nivel del grano de polen impidió la normal formación de éstos, observándose menor viabilidad de ellos. A su vez, en este último parámetro el comportamiento entre cultivares fue diferente. Estos autores destacan que un período más corto entre inicio de la etapa reproductiva y antesis, reduce la probabilidad de coincidir con menores temperaturas durante el período crítico de sensibilidad a la baja temperatura en pre-antesis y con ello disminuye la probabilidad de observar esterilidad del polen, mientras que con una mayor duración de este período aumenta la exposición de las plantas a condiciones de temperaturas desfavorables, provocando una mayor esterilidad de polen.

La mayor duración de la etapa reproductiva, producto de la exposición de las plantas a disminución de temperatura, contrasta con lo observado por Mohammed & Tarpley (2009), quienes evaluaron plantas de arroz subsp. *japonica* a alta temperatura nocturna (> 27 °C), y observaron un acortamiento del período de crecimiento. Sin embargo, existe coincidencia en una menor viabilidad y germinación de polen y, por ende, mayor esterilidad de espiguillas. Por otro lado, en arroz la

esterilidad de espiguillas inducida por alta temperatura se relaciona con disminución de la dehiscencia de la antera, menor dispersión del polen, reducida germinación de los granos de polen sobre el estigma y disminución de la elongación del tubo polínico (Prasad *et al.*, 2006).

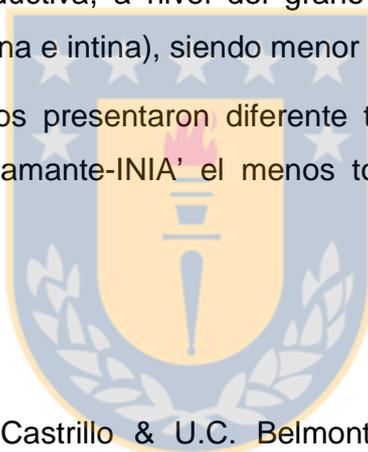
En arroz, tanto el estrés por alta como por baja temperatura inducen esterilidad de polen y son indistinguibles a simple vista, ya que ambos producen esterilidad de espiguillas. Sin embargo, la esterilidad producida por frío es la principal y afecta mayormente durante la etapa de microsporogénesis. El frío que afecta el primordio de espiguilla durante la etapa de microsporogénesis se asocia con la baja temperatura del aire y, particularmente, del agua en arroz cultivado en condiciones de inundación (Ortega, 2007).

El comportamiento diferente entre cultivares, al ser expuestos a 16 °C durante la etapa reproductiva, se relaciona con lo reportado por Julia & Dingkuhn (2013), quienes mencionan que la respuesta a la exposición a menor temperatura depende del genotipo, temperatura del ambiente y del momento de la etapa de desarrollo del polen en que ocurre este período de baja temperatura.

El diferente nivel de daño observado en los tres cultivares expuestos a 16 °C posiciona a 'Diamante-INIA' como el más afectado, tanto a nivel de la pared de la antera y del grano de polen, como en la viabilidad y germinación de polen, mientras que 'Zafiro-INIA' fue el menos afectado, ya que sólo se observó algunos sectores del tapete con abultamientos que tendieron a invadir el lóculo, acompañados de un reducido número de granos deformes y/o de menor tamaño. Este comportamiento diferente frente a la disminución de temperatura concuerda con los objetivos del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz (PMGA) en el cual estos cultivares fueron creados, ya que uno de los parámetros relevantes en dicho programa es aumentar la tolerancia al frío. Teniendo en cuenta que 'Diamante-INIA' es el cultivar más antiguo (década del 70) creado en el PMGA, y 'Zafiro-INIA' el más reciente (2010), se explica la mayor tolerancia al frío, expresada como un menor daño en el cultivar más reciente a nivel de la pared de la antera y grano de polen al ser expuesto a 16 °C durante la etapa reproductiva.

## VII. CONCLUSIONES

1. Durante el desarrollo del polen, la etapa de polen vacuolado fue la más sensible a 16 °C durante la etapa reproductiva en los tres cultivares.
2. El tapete, estrato de la pared de la antera en los tres cultivares estudiados fue el más afectado por la disminución de temperatura, manifestándose como una hipertrofia del tejido.
3. A nivel del tapete la ultraestructura que determina la fertilidad del polen es la forma o arreglo del retículo endoplásmico, asociando el ordenamiento concéntrico con esterilidad de polen.
4. El daño causado por la exposición de las plantas de los tres cultivares a 16 °C durante la etapa reproductiva, a nivel del grano de polen se relaciona con el espesor de la pared (exina e intina), siendo menor en granos de polen dañados.
5. Los cultivares estudiados presentaron diferente tolerancia a la disminución de temperatura, siendo 'Diamante-INIA' el menos tolerante y 'Zafiro-INIA' el más tolerante.



## VIII. REFERENCIAS

1. Acevedo, M.A., W.A. Castrillo & U.C. Belmonte. 2006. Origen, evolución y diversidad del arroz. *Agron. Trop.* 56(2): 151-170.
2. Acevedo, R., M. Gaju, P. Tobar, M. Toro, M. Zerene, J. Lacy, R. Mutters y G. Cobo. 2008. Rice check Chile: Manual de recomendaciones 2007/2008. Fundación Chile. Santiago, Chile. 32p.
3. Alvarado, J.R. & P. Grau. 1991. Mejoramiento del arroz en Chile por tolerancia a frío. En: J.P. Puignau (Ed.) *Diálogo XXXIII. Mejoramiento de arroz. Reunión sobre mejoramiento de arroz en el Cono Sur. 17-21 Julio, 1989.* IICA. PROCISUR. Montevideo, Uruguay. pp. 105 - 114.
4. Alvarado, R., S. Hernaiz, A. Gómez & F. Saavedra. 1997. Brillante INIA, nueva variedad de arroz con grano largo y translúcido. *Agric. Téc. (Chile)* 57(4): 221-222.
5. Barrios, B. 2010. Características del arroz chileno. [en línea]. Oficina de estudios y políticas agrarias (ODEPA). Santiago, Chile. [www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones](http://www.odepa.gob.cl/odepaweb/publicaciones) [Consulta: 10 junio 2010].
6. Bedinger, P. 1992. The remarkable biology of pollen. *Plant Cell* 4: 879-887.

7. Bozzola, J. & L. Russell. 1999. Electron microscopy: principles and techniques for biologists. (2nd. ed.). Jones & Bartlett publishers. London, UK. 670p.
8. Castillo, D. & R. Alvarado. 2002. Caracterización de germoplasma de arroz para tolerancia a frío en la etapa de germinación. *Agríc. Téc. (Chile)* 62(4): 596-603.
9. Cordero, K. 2012. Temperate rice in Chile. pp. 29 – 31. In: Jena, K.K & B. Hardy (Ed.). *Advances in temperate rice research*. International rice research institute (IRRI). Los Baños, Philippines. 105 p.
10. Counce, P.A., T.C. Keisling & A.J. Mitchell. 2000. A Uniform, objective, and adaptive system for expressing rice development. *Crop Sci.* 40: 436 - 443.
11. Cruz, R. da., S. Milach & L. Federizzi. 2006. Rice cold tolerance at the reproductive stage in a controlled environment. *Sci. Agríc.* 63(3): 255-261.
12. Cruz, R. da, S. Milach & L. Federizzi. 2008. Inheritance of panicle exertion in rice. *Sci. Agríc.* 65(5): 502-507.
13. Chakrabarti, B., P.K. Aggarwal, S.D. Singh, S. Nagarajan & H. Pathak. 2010. Impact of high temperature on pollen germination and spikelet sterility in rice: comparison between basmati and non-basmati varieties. *Crop & Pasture Science* 61: 363-368.
14. Díaz, S., R. Morejón, R. Castro & N. Pérez. 2006. Comportamiento de genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.) seleccionados para tolerancia a las bajas temperaturas en siembra temprana de frío. *Cultivos Tropicales* 27(2): 71-75.
15. Diethart, B., S. Sam & M. Weber. 2007. Walls of allergenic pollen: Special reference to the endexine. *Grana* 46: 164-175.
16. Dolferus, R., X. Ji & R. Richards. 2011. Abiotic stress and control of grain number in cereals. *Plant Sci.* 181: 331-341.
17. Esau, K. 1977. The flower: reproductive cycle. pp. 403 – 415. In: Esau, K. (Ed.). *Anatomy of seed plants*. (2nd. ed.). Wiley & Sons. New York.
18. Fengjin, X. & S. Lianchun. 2011. Analysis of extreme low-temperature events during the warm season in Northeast China. *Nat. Hazards* 58: 1333-1344.
19. Furness, C.A. & P.J. Rudall. 2001. Pollen and anther Characters in monocot systematic. *Grana* 40: 17-25.
20. Gothandam, K., E. Kim & Y. Chung. 2007. Ultrastructural study of rice tapetum under low-temperature stress. *J. Plant Biol.* 50(4): 396-402.
21. Graça, M., C. A. Furness, C. J. Prychid & P.J. Rudall. 2005. Microsporogenesis and anther development in Bromeliaceae. *Grana* 44(2): 65-74.
22. Huysmans, S., G. El-Ghazaly & E. Smets. 1998. Orbicules in Angiosperms: morphology, function, distribution, and relation with tapetum types. *Bot. Rev.* 64: 240-272.
23. Imin, N., T. Kerim, J. Weinman & B. Rolfe. 2006. Low temperature treatment at the young microspore stage induces protein changes in rice anthers.

- Mol. Cell. Proteomics. 5(2): 274-292.
24. Itoh, J., K. Nonomura, K. Ikeda, S. Yamaki, Y. Inukai, H. Yamagishi, H. Kitano & Y. Nagato. 2005. Rice Plant Development: from Zygote to Spikelet. *Plant Cell Physiol.* 46(1): 23-47.
  25. International Rice Research Institute (IRRI). 1983. Final report of the seventh international rice cold tolerance nursery. International rice research institute, Los Baños, Philippines. 34 p.
  26. International Rice Research Institute (IRRI). 2002. Rice Almanac: source book for the most important economic activity on earth. (3rd. ed.). CABI publishing. Oxon, UK.
  27. Jagadish, S.V.K, P.Q. Craufurd & T.R. Wheeler. 2007. High temperature stress and spikelet fertility in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Exp. Bot.* 58(7): 1627-1635.
  28. Julia, C. & M. Dingkuhn. 2013. Predicting temperature induced sterility of rice spikelets requires simulation of crop-generated microclimate. *Eur. J. Agron.* 49: 50-60.
  29. Khatun, S. & T.J. Flowers. 1995. The estimation of pollen viability in rice. *J. Exp. Bot.* 46(282): 151-154.
  30. Kellog, E.A. 2009. The evolutionary history of Ehrartoideae, Oryzeae and *Oryza*. *Rice* 2: 1-14.
  31. Lazarova, N. 2003. Ultrastructure and function of barley anther tapetum. *Comptes Rendus de l'Academie Bulgare des Sciences* 56(3): 81-84.
  32. Li, H., Z. Yuan, G. Vizcay-Barrena, C. Yang, W. Liang, J. Zong, Z.A. Wilson & D. Zhang. 2011. Persistent tapetal cell1 encodes a PHD-finger protein that is required for tapetal cell death and pollen development in rice. *Plant Physiol.* 156: 615-630.
  33. Lovisolo, M.R. & B.G. Galati. 2012. Diversidad de orbículas en Poaceae. *Bol. Soc. Argent. Bot.* 47(1-2): 87-96.
  34. Mamun, E., S. Alfred, L. Cantrill, R. Overall & B. Sutton. 2006. Effects of chilling on male gametophyte development in rice. *Cell Biol. Int.* 30: 583-591.
  35. Matsui T. & K. Omasa. 2002. Rice (*Oryza sativa* L.) cultivars tolerant to high temperature at flowering: anther characteristics. *Ann. Bot.* 89: 683-687
  36. Mohammed, A. R. & L. Tarpley. 2009. High nighttime temperatures affect rice productivity through altered pollen germination and spikelet fertility. *Agr. Forest Meteorol.* 149: 999-1008.
  37. Nakamura, A.T., H.M Longhi-Wagner & V. L. Scatena. 2010. Anther and pollen development in some species of Poaceae (Poales). *Braz. J. Biol.* 70(2): 351-360.
  38. Oliver, S., E. Dennis & R. Dolferus. 2007. ABA regulates apoplastic sugar

- transport and is a potential signal for cold-induced pollen sterility in rice. *Plant Cell Physiol.* 48(9): 1319-1330.
39. Ortega, R. 2007. Analysis of factors affecting spikelet sterility in flooded rice under field conditions in Chile. *Arch. Agron. Soil Sci.* 53(2): 183-192.
  40. Ortega, R., M. Aresti & I. Pereira. 2011. Implementation and evaluation of an image analysis system for determining viability of pollen grains in temperate rice. *Chil. J. Agr. Res.* 71(1): 16-22.
  41. Pacini, E., G. Franchi & M. Hesse. 1985. The tapetum: its form, function and possible phylogeny in Embryophyta. *Plant Systemat. Evol.* 149: 155-185.
  42. Peterson, R., J.P. Slovin & C. Chen. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *Int. J. Plant Biol.* 1(13): 66-69.
  43. Prasad, P.V.V., K.J. Boote, L.H. Allen, J.E. Sheehy & J.M.G. Thomas. 2006. Species, ecotype and cultivar differences in spikelet fertility and harvest index of rice in response to high temperature stress. *Field Crops Res.* 95:398–411.
  44. Raghavan, V. 1988. Anther and pollen development in rice (*Oryza sativa*). *Amer. J. Bot.* 75(2): 183-186.
  45. Raghavan, V. 2000. *Developmental biology of flowering plants.* (1st ed.). Springer-Verlag, New York. 354p.
  46. Saini, H. & M. Westgate. 2000. Reproductive development in grain crops during drought. *Adv. Agron.* 68: 59-96.
  47. Satake, T. & H. Hayase. 1970. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: V. Estimations of pollen developmental stage and the most sensitive stage to coolness. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 39: 468-473.
  48. Satake, T. & M. Shibata. 1992. Male sterility caused by cooling treatment at the young microspore stage in rice plants: XXXI. Four components participating in fertilization. *Proc. Crop Sci. Soc. Jpn.* 61(3): 454-462.
  49. Shi, S., D. Ding, S. Mei & J. Wang. 2010. A comparative light and electron microscopic analysis of microspore and tapetum development in fertile and cytoplasmic male sterile radish. *Protoplasma* 241: 37-49.
  50. Shimono, H., T. Hasegawa & K. Iwama. 2002. Response of growth and grain yield in paddy rice to cool water at different growth stages. *Field Crops Res.* 73: 67-79.
  51. Steer, M. 1977. Differentiation of the tapetum in *Avena*: I. The cell surface. *J. Cell Sci.* 25: 125-138.

52. Stolpe, N. 2006. Descripciones de los principales suelos de la VIII región de Chile. (1a. ed.). Departamento de Suelos y Recursos Naturales, Universidad de Concepción, Chile. 84p.
53. Subedi, K. D., C.N. Floyd & C.B. Budhathoki. 1998. Cool temperature-induced sterility in spring wheat (*Triticum aestivum* L.) at high altitudes in Nepal: variation among cultivars in response to sowing date. *Fields Crop Res.* 55: 141-151.
54. Thakur, P., S. Kumar, J.A. Malik, J.D. Berger & H. Nayyar. 2010. Cold stress effects on reproductive development in grain crops: An overview. *Environ. Exp. Bot.* 67: 429-443.
55. Walker, J.W. & J.A. Doyle. 1975. The bases of angiosperm phylogeny: Palinology. *Ann. Missouri Bot. Gard.* 62(3): 664-723.
56. Wang, A., Q. Xia, W. Xie, R. Datla & G. Selvaraj. 2003. The classical Ubisch bodies carry a sporophytically produced structural protein (RAFTIN) that is essential for pollen development. *Plant Biol.* 100(24): 14487-14492.
57. Wassmann, R., S. V. K. Jagadish, S. Heuer, A. Ismail, E. Redona, R. Serraj, R. K. Singh, G. Howell, H. Pathak & K. Sumfleth. 2009. Climate Change Affecting Rice Production: The Physiological and Agronomic Basis for Possible Adaptation Strategies. *Adv. Agron.* 101: 59-122.
58. Westgate, M.E., J.B., Passioura & R. Munns. 1996. Water status and ABA content of floral organs in drought-stressed wheat. *Aust. J. Plant Physiol.* 23: 763-772.
59. Wilson, Z. & D. Zhang. 2009. From Arabidopsis to rice: pathways in pollen development. *J. Exp. Bot.* 60(5): 1479-1492.
60. Zhang, D.S., W.Q. Liang, Z. Yuan, N. Li, J. Shi, J. Wang, Y. Wang, Y.M. Liu, W.J. Yu & D.B. Zhang. 2008. Tapetum degeneration retardation is critical for aliphatic metabolism and gene regulation during rice pollen development. *Mol. Plant* 1(4): 599-610.
61. Zinn, K.E., M. Tunc-Ozdemir & J.F. Harper. 2010. Temperature stress and plant sexual reproduction: uncovering the weakest links. *J. Exp. Bot.* 61(7): 1959-1968.