



211
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA

**FACTORES QUE INFLUYEN EN LA
ANDROGÉNESIS *in vitro* DE
Solanum iopetalum L.**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS
EN HORTICULTURA**

PRESENTA

MARIBEL PACHECO SÁNCHEZ

Chapingo, Méx., Noviembre 1999

Bib 91363



HORTICULTURA
posgrado
universidad autónoma chapingo

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANDROGÉNESIS

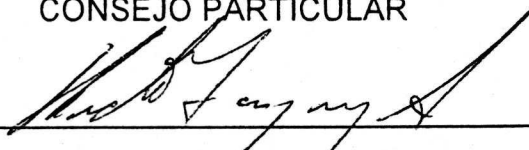
in vitro DE *Solanum iopetalum* L.

Tesis realizada por MARIBEL PACHECO SÁNCHEZ bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

DIRECTOR:



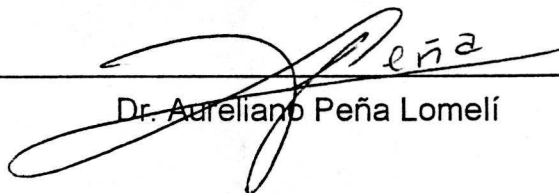
Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR



Dra. María Teresa Colinas León

ASESOR



A. 35196

Dr. Aureliano Peña Lomelí

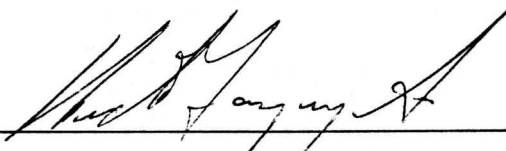
Universidad Autónoma Chapingo

Chapingo, Estado de México, Noviembre de 1999

FACTORES QUE INFLUYEN EN LA ANDROGÉNESIS
in vitro DE *Solanum iopetalum* L.

El jurado que revisó y aprobó el examen de grado de MARIBEL PACHECO SÁNCHEZ autora de la presente tesis de Maestría en Ciencias en Horticultura estuvo constituido por:

PRESIDENTE



Dr. Héctor Lozoya Saldaña

ASESOR



Dra. María Teresa Colinas León

ASESOR



Dr. Aureliano Peña Lomelí

DATOS BIOGRÁFICOS

La autora del presente trabajo Bióloga MARIBEL PACHECO SÁNCHEZ, es originaria de Ixtapan, municipio de Atenco, Estado de México. Realizó estudios de Educación Media Superior en la Escuela Preparatorio de Texcoco, ubicada en Texcoco Estado de México. Los estudios de Educación Superior los realizó en la Escuela Nacional de Estudios Profesionales-Zaragoza, Universidad Nacional Autónoma de México con sede en el Distrito Federal, donde cursó la carrera de Biología. En 1990 trabajó en el Centro de Acuacultura El Varejonal, ubicado en el Varejonal, Sinaloa. Posteriormente se desempeñó en el Centro Oceanográfico de Manzanillo, en Manzanillo Colima. En los últimos años ha trabajado como docente en escuelas de Educación Media Superior.

AGRADECIMIENTOS

A Dios por darme la oportunidad de vivir.

A la Universidad Autónoma Chapingo, especialmente al Departamento de Fitotecnia.

Al Director del presente trabajo, Dr. Héctor Lozoya Saldaña, por su valiosa asesoría y empeño en la realización del mismo.

Especialmente, a la Dra. María Teresa Colinas León, por su disponibilidad en la revisión de la tesis y por su apoyo desinteresado que me permitió realizar la Maestría.

Al Dr. Aureliano Peña Lomelí, por la minuciosa revisión al presente trabajo y sus importantes observaciones.

A la M. C. Teresa Cervantes Martínez, por su ayuda en los análisis citológicos y en la toma de fotografías.

A los profesores de la Maestría en Ciencias en Horticultura por su enseñanza.

DEDICATORIA

A mis padres, por ser excelentes guías
en la realización de mis metas y por su
comprensión y cariño incondicional

A mis hermanos por su especial
compañía y su constante apoyo.

A todas aquellas personas que han
formado parte de mi vida.

ÍNDICE DE CUADROS	ix
ÍNDICE DE FIGURAS	xi
RESUMEN	xii
SUMARY	ix
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS	4
III. REVISIÓN DE LITERATURA	
3.1. Generalidades	5
3.2. Características botánicas	6
3.3. Problemática del cultivo	7
3.4. Cultivo de anteras in vitro	9
3.5. Genotipo de la planta madre	10
3.6. Ambiente de cultivo de la planta madre	12
3.7. Etapa de desarrollo de las células masculinas	14
3.8. Pretratamientos	17
3.9. Factores físicos y químicos	19
3.10. Reguladores de crecimiento	21
3.11. Sacarosa	24
3.12. Aminoácidos	25
3.13. Temperatura y luz	25
3.14. Regeneración de plantas	29

3.15. Métodos convencionales para la producción de haploides	30
3.16. Obtención de haploides in vitro	32
3.17. Importancia de la producción in vitro de haploides y su aplicación en el mejoramiento genético	32
3.18. Determinación de ploidia de las plantas regeneradas	36
IV. MATERIALES Y MÉTODOS	39
4.1. Determinación del estado de desarrollo de las células masculinas	39
4.2. Cultivo de in vitro de anteras	40
4.3. Etapa de inducción	41
4.3.1. Pretratamiento	41
4.3.2. Desinfestación	41
4.3.3. Medio de cultivo	42
4.3.4. Carbón activado	42
4.3.5. Reguladores de crecimiento	43
4.4. Etapa de morfogénesis	43
4.4.1. Medio de cultivo	43
4.4.2. Carbón activado	43
4.4.3. Reguladores de crecimiento	43
4.5. Fase de incubación	44
4.6. Análisis estadístico	44

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	46
5.1. Estado de desarrollo de la célula masculina	46
5.2. Etapa de inducción de callogénesis en las anteras	49
5.2.1. Pretratamiento	49
5.2.2. Carbón activado	56
5.2.3. Reguladores de crecimiento	58
5.2.4. Características del callo formado	65
5.3. Etapa de morfogénesis o regeneración de raíces y plantas	68
5.3.1. Carbón activado	68
5.3.2. Reguladores de crecimiento	69
VI. CONCLUSIONES	75
APENDICE	77
VII. LITERATURA CITADA	80

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Tratamientos para la etapa de morfogénesis	43
2	Coeficientes de correlación de las características morfológicas del botón floral.	79
3	Diseño completamente al azar con arreglo factorial (etapa de inducción de callo a partir de anteras).	7
4	Comparación de medias de Tukey del porcentaje de oscurecimiento y sobrevivencia por efecto del tiempo de pretratamiento con 4°C.	51
5	Comparación de medias de Tukey del porcentaje de anteras con callo y cantidad de callo formado, por efecto del tiempo de pretratamiento.	53
6	Porcentajes de oscurecimiento y sobrevivencia por efecto del carbón activado, después de 10 semanas de iniciado el	

	cultivo.	58
7	Comparación de medias de Tukey del porcentaje de oscurecimiento por efecto de los reguladores de crecimiento.	59
8	Comparación de medias de Tukey del porcentaje de anteras con formación de callo por efecto de reguladores de crecimiento.	61
9	Tratamientos en los que se obtuvieron anteras con formación de callo.	65
10	ANAVA: Diseño completamente al azar (etapa de morfogénesis).	80
11	Comparación de medias de Tukey de las variables de estudio en la etapa de morfogénesis	81

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Diferentes etapas de microesporogénesis en <i>Solanum iopetalum</i>	47
2	Efecto del tiempo de pretratamiento con frío en la respuesta de las anteras a la formación de callo.	55
3	Interacción de AIA, BA y tiempo de pretratamiento en la respuesta de las anteras a la formación de callo.	62
4	Formación de callo a partir de anteras, en diferentes medios de cultivo.	68
5	Desarrollo de raíces a partir del callo formado, en diferentes medios de cultivo.	72
6	Desarrollo de plantas a partir del callo formado, en diferentes medios de cultivo	74

RESUMEN

Se evaluaron diferentes concentraciones de AIA (0.0, 0.2 y 1.0 mgL⁻¹) y BA (0.0, 1.0 y 3.0 mgL⁻¹) y sus respectivas combinaciones así como el efecto del pretratamiento con 4°C durante 48 y 96h, en la inducción de formación de callo en anteras de *Solanum iopetalum*. El efecto de cada uno de los factores así como la interacción de los tres resultó altamente significativo, lo que indicó que son necesarios para estimular la respuesta de las anteras a callogénesis. La combinación más eficiente fue 1.0 mg L⁻¹ de AIA + 1.0mg L⁻¹ de BA + 48h de pretratamiento, con 27.5% de callogénesis. Una vez obtenido el callo se trasplantó a medios específicos para morfogénesis, donde se observó el efecto de 2,4-D, AIA, BA y GA₃. El mayor número de callos con desarrollo de raíces, 40%, se obtuvo con el medio con 0.05 mg L⁻¹ de AIA + 0.05mg L⁻¹ BA + 0.1mg L⁻¹ de GA₃, en este medio también hubo formación de plantas, con una frecuencia de 3.33%. Finalmente, considerando la frecuencia de anteras callogénicas y la de regeneración de plantas 27.5 y 3.33% respectivamente, se puede decir, que el cultivo *in vitro* de anteras es susceptible de ser aplicado para la obtención de plantas haploides en *S. iopetalum*.

palabras clave: papa, androgénesis, haploides, callogénesis.

SUMMARY

The effect of different concentrations of indoleacetic acid (AIA, 0.0, 0.2, and 1.0 mgL⁻¹) and benzyladenine (BA, 0.0, 1.0, and 3.0 mgL⁻¹) in their combinations as well as the exposure to 4°C for 48 or 96 hr in calli induction on anthers of *Solanum iopetalum* was evaluated. The action of the factors, individually and in combination was highly significative. It is, they are necessary to trigger and stimulate calli formation from anthers. The most efficient combination (AIA, 1.0 mgL⁻¹; BA, 1.0 mgL⁻¹ and 48 hr pre-treatment at 4°C) resulted in 27.5% of the anthers with calli. This undifferentiated tissue was transplanted to several morphogenic-inducing media, where the effect of 2,4-D, AIA, BA and gibberellic acid (GA₃) was studied. The best medium (0.05 mgL⁻¹ AIA; 0.05 mgL⁻¹ BA; and 0.1 mgL⁻¹ GA₃) induced roots in 40% of the explants. This medium also induced plantlet differentiation in 3.3% of the calli. According to these results, the anther *in vitro* culture could be established to reduce ploidy in resulting plants of *Solanum iopetalum*.

Key Words: potato, androgenesis, haploids, callus yield.

I. INTRODUCCIÓN

La papa (*Solanum tuberosum* L.) es un cultivo de gran importancia social y económica en el mundo, es superada en volumen de producción y consumo sólo por arroz, trigo y maíz (Niederhauser, 1997). Asimismo, se considera con un alto potencial por su capacidad de producción en tiempo y superficie y su excelente valor nutritivo. Los países de mayor producción son China, Polonia, Rusia, Holanda, Canadá y Francia, entre otros (Wolf, 1997; Parsons, 1998).

En México se cultivan aproximadamente 70 mil ha y ocupa el quinto lugar en importancia después del maíz, frijol, trigo y algodón. La producción anual aproximada es de 1.2 millones de toneladas que se valoran en 215 millones de dólares y es principalmente para consumo doméstico, no se exporta y las importaciones oscilan entre 2 y 4 mil ton (Rivera, 1997).

En algunas regiones su cultivo se ha visto limitado debido a problemas ambientales y principalmente a la presencia de enfermedades virales, bacterianas y fungosas. Al respecto, el tizón tardío (*Phytophthora infestans* Mont de By) es considerado actualmente como el problema fitopatológico más importante en la papa a nivel mundial, debido por un lado, a que los grupos de compatibilidad están ampliamente distribuidos en el mundo, incrementando variabilidad y originando cepas más agresivas (Sequeira, 1997), y por el otro, a

la existencia de tendencias político-económicas de reducir la aplicación de agroquímicos en papa en un futuro cercano (PICTIPAPA, 1997).

Muchos de estos problemas biológicos tienen solución vía mejoramiento genético, incorporando caracteres valiosos de especies silvestres a las variedades cultivadas. En el pasado se ha recurrido a la especie mexicana *S. demissum* como fuente de genes de resistencia al tizón tardío (Sequeira, 1997). No obstante, otras especies también pudieran contribuir con genes valiosos, tal es el caso de *S. iopetalum* (Lozoya, 1997). Esta especie endémica de México es hexaploide y tiene un gran potencial genético susceptible de ser utilizado, pero primero debe superarse su múltiple ploidia, ya que esto representa un gran inconveniente en el fitomejoramiento.

Existen algunas técnicas que permiten de manera artificial la reducción del genoma y obtener haploides, tales como cruza interespecíficas, polinización tardía, irradiación del polen, tratamientos con reguladores de crecimiento y choque térmico, o bien por técnicas *in vitro* (Bhojwani y Razdan, 1989).

Dentro de esta última, los haploides pueden generarse a partir del cultivo de óvulos, ovarios, polen, embriones inmaduros (generados cuando no hay fertilización), microesporas o por cultivo de anteras (Pierik, 1990). Cabe mencionar que la obtención de haploides a través del cultivo de anteras ha sido ampliamente utilizada en numerosas especies, incluyendo las de importancia económica (Bhojwani y Razdan, 1989). Con esta técnica se tiene la posibilidad

de obtener resultados en muy corto tiempo, hasta en un año, además tiene la ventaja de que en algunas especies las plantas resultantes contienen una mezcla de ploidias: haploides, dihaploides o diploides, triploides, tetraploides, octaploides y aneuploides (Rokka *et al.*, 1996; Farnham, 1998) las cuales pueden ser de gran utilidad en programas de mejoramiento para la obtención de genotipos tolerantes a las condiciones mencionadas.

Por todo lo anterior, en el presente trabajo se plantearon los siguientes objetivos.

II. OBJETIVOS

Identificar los factores favorables para la androgénesis *in vitro* de *Solanum iopetalum* a partir del cultivo de anteras.

De manera particular:

Establecer marcadores morfológicos de los botones florales que permitan identificar la etapa uninucleada de la microespora.

Determinar el tiempo de pretratamiento con 4°C, en los botones florales, más adecuado para la inducción de androgénesis.

Evaluar el efecto del carbón activado en la inducción de androgénesis *in vitro* así como en la morfogénesis.

Identificar reguladores de crecimiento apropiados para la inducción de androgénesis y para el desarrollo de plantas.

Determinar la capacidad androgénica y de regeneración de plantas *in vitro* de *Solanum iopetalum*.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

3.1. GENERALIDADES

Se considera que la papa es originaria del Sur de América (Perú, Ecuador, Bolivia), aunque la diseminación del cultivo se inicia en el siglo XVI por los españoles quienes la introdujeron a Europa (Hanneman, 1994).

La papa es un cultivo que se adapta a varios climas, su extensión actual va del ecuador hasta zonas polares; es decir, de latitudes de 50°N y 50°S y altitudes de 0 a 4 mil metros, donde habitan tres cuartas partes de la población mundial. Ocupa 22 millones de ha con una producción total de 287 millones de toneladas. Por lo tanto, el número de factores bióticos y abióticos, limitantes del rendimiento encontrados en tal diversidad de nichos ecológicos, es considerable y muy importante. El nivel de productividad varía en función del clima, de la cantidad y calidad de insumos (Gallais y Bannerot , 1992).

La papa cultivada *Solanum tuberosum* es un tetraploide cuyo número cromosómico es $2n=4x=48$ y ha evolucionado de especies diploides. Es una planta autógama aunque llega a presentar cierto grado de entrecruzamiento, se reproduce sexual y asexualmente. Muestra depresión endogámica y

frecuentemente presenta alelos de incompatibilidad (Montaldo, 1984; Rivera, 1990).

La mayoría de los dihaploides provenientes de variedades tetraploides de *S. tuberosum*, son plantas débiles pero cruzadas con otras especies diploides o entre ellas mismas pueden producir descendencia vigorosa. La debilidad natural de los dihaploides originales es debida a la depresión causada por la endogamia (Vidal, 1998).

3.2. CARACTERÍSTICAS BOTÁNICAS

La papa es una planta herbácea anual y perenne por su reproducción debido a su propagación vegetativa. Los tallos son de dos tipos: aéreos y/o rastreros y subterráneos, estos últimos están compuestos por rizomas y tubérculos (parte comestible). Cada tallo aéreo origina de dos a tres tubérculos, éstos pueden ser ovoides o cilíndricos con piel blanca, amarilla, rosa, roja o violeta (Valdés, 1992).

Las hojas son compuestas, formadas por folíolos largos de forma ovoide. Las flores son perfectas, de color blanco, púrpura o veteadas de acuerdo al cultivar. El fruto es redondo con diámetro aproximado de 2 cm. (Valdés, 1992).

3.3. PROBLEMÁTICA DEL CULTIVO

La planta de papa es atacada severamente por una enfermedad causada por el hongo *Phytophthora infestans* Mont de Bay, que destruye sus hojas y sus tallos. En muchas regiones este daño se manifiesta relativamente tarde en el ciclo de la planta, por lo que recibe el nombre de tizón tardío. El control químico es costoso y tiene impacto ambiental, las aplicaciones de fungicidas para controlar este hongo encarece el cultivo y afecta el ambiente. En 1994 los productores de papa del mundo gastaron más de \$4 mil millones de dólares en fungicidas (PICTIPAPA, 1997).

En cualquier lugar donde la papa se cultive, de temporal y aún en regiones con riego, el cultivo debe protegerse con fungicidas químicos para prevenir el ataque del tizón tardío. Actualmente, la papa recibe anualmente más productos químicos que cualquier otro producto alimenticio (Niederhauser, 1997).

Los científicos de todo el mundo han buscado durante más de 100 años la resistencia genética al tizón tardío, sin embargo, sus esfuerzos se ha disminuido por la agresividad y variabilidad del hongo. El biotipo A2 que siempre ha existido en México se ha dispersado a nivel mundial (Sequeira, 1997). La solución a este problema que afecta a la producción de papa en el mundo está en la incorporación de resistencia genética durable a tizón tardío, de los biotipos 1 y 2 en los nuevos cultivares de papa (PICTIPAPA, 1997).

La coexistencia de los tipos de apareamiento entre las razas de *P. infestans*, A1 y A2 (fase sexual) en México, ha originado una alta diversidad de biotipos de este hongo y la severidad de ataque del tizón a la papa por la misma razón, es destructiva. Como consecuencia de la evolución natural se han formado y sobrevivido a este patógeno especies silvestres que son resistentes y además tienen genes valiosos para otros factores abióticos y bióticos adversos que afectan a la papa, entre estas se encuentran *Solanum bulbocastanum* ($2n=2x=24$), *S. cardiophyllum* ($2n=2x=24$), *S. verrucosum* ($2n=2x=24$), *S. stoloniferum* ($2n=4x=48$), *S. brachycarpum* ($2n=6x=72$) y *S. iopetalum* ($2n=6x=72$). Esta última es una especie endémica mexicana que se distribuye en el Este y Centro del país y representa un gran potencial genético susceptible de ser aprovechado (Montaldo, 1984; Hanneman, 1994).

Prácticamente no existen reportes sobre la utilización de esta especie en programas de mejoramiento (Julio *et al.*, 1998), ésto es debido probablemente a su condición de hexaploide que dificulta su manipulación, lo que ha generado la necesidad de disponer de técnicas y programas de mejoramiento que puedan aprovechar la amplia variabilidad genética contenida en esta especie para incorporarlo a variedades comerciales o crear nuevas variedades de papa resistentes al hongo y con características agronómicas aceptables, aunque primero se debe superar la múltiple ploidia. Al respecto el cultivo de anteras *in vitro* puede resultar una buena alternativa.

3.4. CULTIVO DE ANTERAS *in vitro*

El cultivo de anteras o “androgénesis *in vitro*” forma parte de cultivo de tejidos vegetales, es una técnica que consiste en aislar las anteras del botón floral o inflorescencia en condiciones asépticas y cultivadas en medio nutritivo sintético, con la finalidad de obtener plantas haploides derivadas del gametofito masculino o microespora (Auge y Boccon-Gibod, 1986).

Los primeros en demostrar que las anteras de *Datura innoxia* aisladas *in vitro* eran capaces de formar embriones haploides fueron Guha y Maheshwari en 1964, apartir de entonces y básicamente en la última década se han obtenido considerables progresos principalmente en especies de importancia económica como arroz, maíz, trigo, cebada, chile y papa (Sunderland, 1980). Cabe mencionar que se han publicado resultados favorables en más de 247 especies de plantas superiores en varios países como Inglaterra, Francia, Alemania, Estados Unidos, China, Japón y Canadá, entre otros (Maheswari *et al.*, 1982; Pierik, 1990).

Si bien es cierto que estos resultados son alentadores para el mejoramiento genético de una cantidad considerable de plantas, en algunos otros cultivos se ha usado con poca eficiencia, debido principalmente a que participan un gran número de factores físicos, químicos y de la planta para tener éxito en la producción a gran escala de haploides.

3.5. GENOTIPO DE LA PLANTA MADRE

El genotipo es posiblemente el factor más importante en la producción de plantas haploides mediante cultivo de anteras. Se han observado marcadas diferencias en la respuesta no sólo entre especies del mismo género sino entre variedades de la misma especie (Maheswari *et al.*, 1982). La embriogénesis ocurre con mayor frecuencia en especies de las familias Solanaceae, Cruciferae y Gramineae. Dentro de éstas cada genotipo responde de manera particular, por lo general, la primera forma embriones directamente de la microespora, en tanto que la última se caracteriza por formar callo y apartir de éste genera embriones (Dunwell, 1985).

Así, dependiendo del genotipo se puede formar callo o embriones. En arroz y cebada se forma exclusivamente callo, en tanto que en otros cereales sólo se forman embriones después de la ruptura de la pared de la antera. En algunos casos se ha observado la formación secundaria de callo a partir de embriones bajo la influencia de auxinas, que son necesarias para estimular el desarrollo de la microespora (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984).

Se sabe que la capacidad de callogénesis es hereditaria y está controlada por más un gen del núcleo (Sonnino *et al.*, 1989). Aunque Ghaemi *et al.* (1993), demostraron que la capacidad de androgénesis *in vitro* es influenciada no sólo por efectos del núcleo sino por el citoplasma en algunos casos.

Por otro lado, la ocurrencia en algún grado de embriogénesis en la progenie resultante de padres que no presentan capacidad de embriogénesis, claramente indica que la formación de embriones está determinada por genes recesivos (Sonnino *et al.*, 1989).

La heterogeneidad genética de la respuesta ha sido considerada el principal obstáculo en la aplicación del cultivo de anteras; sin embargo, muchos estudios han indicado que la inducción a embriogénesis puede lograrse manipulando factores genéticos y ambientales del cultivo (Chen, 1983).

Esto significa que es posible mejorar el nivel de respuesta en genotipos de baja capacidad de embriogénesis a través de cruzas o recombinaciones con variedades de alta respuesta a la producción de haploides vía embriogénesis (Jacobsen y Sopory, 1978). Es claro que este tipo de procedimientos son susceptibles de ser empleados sólo en especies de importancia económica como centeno, trigo, maíz (Petolino *et al.*, 1988), papa (Jacobsen y Sopory, 1978), entre otras. Además, resulta de gran importancia para materiales resistentes a enfermedades o condiciones ambientales desfavorables (Sonnino *et al.*, 1989).

De manera general, estudios recientes concentran su atención en aspectos genéticos más que fisiológicos, pero no debe perderse de vista que los diferentes genotipos varían en su capacidad de respuesta en distintas condiciones ambientales como luz, temperatura, etc. (Rokka *et al.*, 1996).

3.6. AMBIENTE DE CULTIVO DE LA PLANTA MADRE

Las condiciones bajo las cuales crecen las plantas donadoras o plantas madre influyen en gran medida en la respuesta de las anteras a formar embriones y en la posterior producción de plantas haploides (Dunwell, 1985); es decir, el fotoperiodo, la intensidad luminosa y la temperatura principalmente son factores que afectan tanto el número de anteras que tienen respuesta positiva como la frecuencia a embriogénesis de las mismas, según se ha observado en tabaco, trigo y algunas especies del género *Brassica* (Sunderland, 1981; Collins y Genovesi, 1982).

Wenzel y Foroughi-Wehr (1984) encontraron que anteras provenientes de plantas cultivadas bajo condiciones controladas a 20 000 lux, tienen una mayor frecuencia de callogénesis que las cultivadas a menor intensidad lumínica.

Asimismo, la temperatura durante el crecimiento de la planta es crítica y depende de la especie y de la combinación con la intensidad lumínica, así por ejemplo, en cebada a temperaturas de 18 a 20 °C con 10 000 lux causa reducción de la tasa de callogénesis.

Por otra parte, se han recomendado ciertos tratamientos para incrementar la respuesta de la planta donadora, tales como remover la región apical de la inflorescencia, aplicar reguladores de crecimiento como etrel (Bajaj *et al.*, 1977),

eliminar botones florales viejos o aplicar algunos nutrimentos (Maheshwari *et al.*, 1982).

Es evidente que aún en una misma especie pueden haber diferencias en esta respuesta debidas a la época de cosecha de las anteras. Estas diferencias son causadas posiblemente por los efectos de la variación estacional (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984; Feng y Wolyn, 1991).

Asimismo, se sabe que los factores ambientales pueden favorecer la formación de poblaciones dimórficas para polen pequeño y normal durante el período de floración. Algunas publicaciones indican que los granos de polen pequeño elevan la tasa de embriogénesis; sin embargo, en este punto hay cierta controversia, pues otros autores, mencionan que la proporción de granos de polen “pequeños” por si sola no es suficientemente grande comparada con el gran número de microsporas las cuales desarrollan plantas haploides vía embriogénesis (Collins y Genovesi, 1982).

El estado nutricional de la planta madre así como la edad de ésta, también influyen en el proceso de embriogénesis. Se considera que las anteras que provienen de los vástagos primarios son más productivas que las de los laterales o menos jóvenes, por lo que se recomienda emplear botones florales del inicio de la floración (Dunwell, 1985; Bajaj *et al.*, 1977).

Para lograr la formación de embriones, es de gran importancia la etapa de desarrollo en la que se encuentren las células masculinas o microesporas en el momento de su aislamiento (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984). Numerosas investigaciones han demostrado que las microesporas responden sólo en una etapa específica de desarrollo, la cual se ubica de la uninucleada temprana a la binucleada temprana, e incluso en tetrada para la mayoría de las especies (Dunwell, 1985).

De manera general, Sunderlan (1980) clasifica a las plantas de acuerdo a su respuesta a embriogénesis en tres categorías principales: premitótica, mitótica y postmitótica; menciona que en la primera se obtiene mayor respuesta usando anteras que contengan microsporas que aún no completan la meiosis y antes de la primera división del polen, las que pertenecen a la segunda categoría responden óptimamente cerca de la primera división del polen y finalmente la etapa binucleada temprana es la más adecuada para plantas postmitóticas.

La mayoría de las plantas en las que se han obtenido respuesta positiva ha sido a partir de microsporas en etapa uninucleada. En papa los mejores resultados se han obtenido con microesporas en esta etapa y la respuesta disminuye cuando se cultivan en etapa de tetrada o binucleada (Sopory y Bajaj, 1987).

De igual forma, en espárrago se observó que la frecuencia en la formación de callo embriogénico y no embriogénico de anteras con microesporas en etapa uninucleada tardía fue más del doble que las anteras con microesporas en

etapa uninucleada media o binucleada temprana y seis veces mayor que anteras en uninucleada temprana o binucleada tardía (Feng y Wolyn, 1991).

Es frecuente observar aberraciones de estructuras embriogénicas cuando se cultivan anteras con microgametos en etapas posteriores, lo que sugiere que son menos competentes para completar el desarrollo y la formación posterior de plantas (Sibi *et al.*, 1979).

En el cultivo *in vitro* del polen se ha observado que éste puede seguir un camino de desarrollo esporofítico en lugar del gametofítico. Se sabe que la microespora comúnmente se divide para formar una célula vegetativa y otra generativa, la cual conduce al tipo de desarrollo gametofítico. Teóricamente en términos citológicos la microespora puede seguir cuatro rutas en el desarrollo: 1)- la mitosis del núcleo de la microespora forma directamente dos células idénticas, de las cuales una o ambas pueden formar embriones como ocurre en *Datura innoxia*, 2)- sigue el curso de la división normal y la célula vegetativa genera embriones, como en *Nicotiana tabacum*, 3)- el embrión se desarrolla de la célula generativa y finalmente 4)- ambas células producen embriones (Maheshwari *et al.*, 1982).

Por otra parte, es importante identificar los botones florales e inflorescencias que contengan microesporas en estado óptimo, esto puede hacerse, con fines prácticos, mediante las características morfológicas (marcadores) de los

mismos, tales como la longitud de los sépalos, el grado de apertura del botón así como el color y la longitud de éste.

Aparentemente lo anterior es relativamente fácil, pero establecer una correlación entre la apariencia del botón y el desarrollo de la microespora no siempre es absoluta, es decir, botones morfológicamente idénticos pueden diferir significativamente dando total o ninguna respuesta (Sunderland, 1980).

Además, el grado de uniformidad de los botones varía de una especie a otra; en especies con botones pequeños la presencia de anteras asincrónicas es relativamente baja. El grado de asincronía se incrementa con el número de anteras por botón. En maíz y sorgo por ejemplo, donde la inflorescencia es larga y morfológicamente compleja, es frecuente la asincronía (Bhojwani y Razdan, 1989).

3.8. PRETRATAMIENTOS

Se han aplicado varios tipos de pretratamientos con la finalidad de incrementar la respuesta en algunas especies, en especial las bajas temperaturas, las cuales provocan un efecto positivo en la microespora estimulando la producción de embriones; éstas se pueden aplicar sobre la planta madre, yemas florales jóvenes o sobre las anteras *in vitro* (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984), lo cual se ha reportado en muchas especies como tabaco, *Datura*, arroz, cebada, papa, entre otras (Chen, 1983).

Aziz *et al.* (1999) encontraron que pretratamientos con temperaturas de 4 a 5°C en clones de genotipos diploides de *Solanum* (9507-04 y 6028-02) presentaron 34% de anteras que produjeron callo o embriones, comparado con 16% de los que no recibieron pretratamiento; de igual forma, se redujo el tiempo de respuesta de 7 a 5 semanas.

Al parecer el frío genera una desviación del proceso normal de la división del polen (división asimétrica) dando lugar a dos núcleos idénticos, los cuales pueden iniciar un desarrollo de tipo calógeno o de tipo embriogéneo, a menudo la embriogénesis sigue a la callogénesis (Auge y Boccon-Gibod, 1986).

El choque térmico posiblemente causa la disolución o desorganización de los microtúbulos y la disociación del huso acromático, lo que conduce a una división anormal del núcleo de la microespora (Bajaj, 1983). Algunos estudios sugieren que el desarrollo anormal resulta de la restricción en la actividad sintética del ARN o bien de la alteración en la composición de aminoácidos de la pared de la antera, lo cual favorece el desarrollo embriogénico (Collins y Genovesi, 1982).

Por otro lado, se piensa que la acción del choque térmico es retener la viabilidad del polen más tiempo y retrasar la senescencia del tejido de la pared de la antera, porque disminuye la intensidad respiratoria y el consumo de nutrimentos (Chen, 1983), lo cual previene la muerte del polen, pues alarga la

producción de aminoácidos que nutren a éste y reduce la biosíntesis de etileno; ésto incrementa el número de polen viable susceptible de formar plantas haploides. Al mismo tiempo, las bajas temperaturas detienen la primera mitosis y bloquean la formación de celulosa, por lo que se incrementa la posibilidad de un desarrollo subsecuente (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984).

Las temperaturas que se emplean dependen de la especie que se trate. Para la mayoría de los cereales se emplean temperaturas de 3 a 6°C, en tanto que para algunas solanaceas se aplican de 10 a 16°C con mejores resultados; asimismo, el tiempo de tratamiento es crítico en relación al estado inicial de desarrollo, por lo que debe buscarse una combinación adecuada de temperatura, tiempo y estado de desarrollo para cada cultivo (Sunderland, 1981).

Otro tipo de pretratamiento es sugerido por Dodds (1985) y consiste en remojar por varios días los botones florales o espigas cosechadas, o centrifugar las anteras a 3 o 5°C por 30 minutos. De igual forma se puede mejorar la eficiencia de embriogénesis asperjando etrel a los botones florales (Bajaj *et al.*, 1977)

3.9. FACTORES FÍSICOS Y QUÍMICOS

El Carbón activado se emplea con frecuencia en el cultivo de anteras debido a que tiene un gran poder adsorbente. Se ha visto que este compuesto incrementa la frecuencia a embriogénesis, en algunos casos hasta 91% comparado con 41% cuando no se emplea (Bajaj y Reinert, 1977); ésto se debe

a que es capaz de adsorber sustancias inhibitorias que se liberan en el medio como resultado de la degradación de sacarosa por el proceso de esterilización con autoclave (5 hidroximetil 2 furfural) o bien de la oxidación del tejido de la antera por presencia de fenoles (Dodds, 1985), que es producida en la mayoría de los casos por daño mecánico (Nitsch, 1983), e indica el inicio de senescencia de la antera que generalmente va acompañada de un aumento en la producción de etileno. Éste último también puede ser adsorbido por el carbón activado así como el ácido absísico (ABA) producido por la antera (Pierik, 1990).

Respecto al etileno, Sevenier y Cumans (1996) observaron que el etileno producido por las anteras en el proceso de incubación, principalmente en las etapas tempranas, estimula la división de la microespora originando callo, pero una vez formado el callo inhibe su desarrollo, este efecto lo controlaron con la adición de ácido alfa aminoacético.

Es evidente que el uso de carbón activado es fundamental si se desea aumentar la frecuencia de embriogénesis, pero es conveniente indicar que este compuesto no es selectivo, adsorbe tanto compuestos exógenos como endógenos, benéficos como dañinos. Si se emplea el altas concentraciones puede eliminar del medio compuestos importantes como las hormonas y tener un efecto inhibitorio del crecimiento (Nitsch, 1983).

La concentración de carbón activado dependerá de la constitución del medio, de la etapa del cultivo así como de las características del explante. En general se recomiendan concentraciones que van de 0.2 a 2.0% (Bajaj y Reinert, 1977; Rokka *et al.*, 1996)

Otros elementos importantes son los reductores o agentes antioxidantes, dentro de los cuales el ácido ascórbico junto con L-cisteína se ha demostrado que evitan el oscurecimiento de la antera producido por la oxidación de fenoles y quinonas, incrementando considerablemente la respuesta a embriogénesis (Tiainen, 1992).

3.10. REGULADORES DE CRECIMIENTO

En el cultivo de anteras tienen un papel importante las condiciones de incubación, pretaratamientos con bajas temperaturas, así como la constitución del medio nutritivo, donde los reguladores de crecimiento son la parte fundamental.

Dunwell (1991) divide a las especies en dos categorías, la independiente de los reguladores de crecimiento, donde ubica a la mayoría de las solanaceas, y la dependiente, como la mayoría de las gramíneas y crucíferas, en las cuales se obtiene un incremento considerable en la producción de haploides si se adicionan concentraciones relativamente altas de forma individual o combinada.

El requerimiento de reguladores de crecimiento varía entre especies y cultivares de la misma especie. En papa y algunas otras solanáceas las auxinas junto con las citocininas se han considerado como las de mayor efecto, específicamente ácido indolacético (AIA), bencilaminopurina (BA) y cinetina (Rokka *et al.*, 1996; Aziz *et al.*, 1999).

En otras especies como en trigo, es de particular interés en la inducción de callogénesis el ácido 2,4-diclorofenoxiacético (2,4-D) en concentraciones de 2 a 4 mgL⁻¹, en combinación con citocininas (Kintzios *et al.*, 1996). No obstante, el 2,4-D representa un riesgo, porque si se mantiene en el medio por mucho tiempo, después de formarse el callo, puede impedir la generación de embriones (Collins y Genovesi, 1982).

Otros reguladores como el ácido abscísico (ABA) y el ácido geberélico (GA₃) han sido escasamente empleados, éste último ha resultado eficiente para algunos cultivares de trigo.

Moieni y Sarrafi (1996) trabajaron con dos genotipos de trigo hexaploide y observaron un comportamiento antagónico entre GA₃ y 2,4-D en la producción de embriones, al reemplazar este último por GA₃ con feniletilamina (PEA) en el medio disminuyó el número de embriones y el porcentaje de plantas regeneradas, en tanto que PEA solo, incrementó el número de embriones por antera en ambos genotipos. Asimismo, el medio básico suplementado con GA₃ incrementó la tasa de regeneración de plantas haploides.

Por su parte, Foroughi *et al.* (1977) cultivaron anteras de *Solanum tuberosum* en el medio de Linsmaier y Skoog (1965), el cual modificaron agregando CoCl_2 , FeNaEDTA y eliminaron FeSO_4 , al mismo tiempo variaron la concentración de AIA y BA, con esto obtuvieron formación de yemas, en tanto que usando ANA y cinética sólo obtuvieron raíces. El cultivo se mantuvo a 23°C en oscuridad y se transfirieron a luz sólo después de diferenciación.

Sopory *et al.* (1978) cultivaron anteras en medio de Murashige y Skoog (1962) utilizando una combinación de 100 medios con 40 genotipos. La máxima respuesta la obtuvieron cuando emplearon 60 g L^{-1} de sacarosa, AIA ($6 \times 10^{-6} \text{ M}$), BA ($4 \times 10^{-6} \text{ M}$) y carbón activado. En ausencia de alguno de estos factores la respuesta disminuyó. Asimismo, la respuesta fue mejor cuando el cultivo se mantuvo en 12 h de luz y 12 h de oscuridad.

Es claro que los reguladores de crecimiento no actúan de manera independiente, sino en relación con otros factores. Jing-li *et al.* (1983) demostraron que cuando las anteras de trigo son pretratadas con 3 y 5 $^\circ\text{C}$ por 72 h en medio líquido suplementado con 1.2 mgL^{-1} de AIA y 2 mgL^{-1} de cinetina se incrementa considerablemente la inducción de polen multicelular y subsecuente desarrollo de embriones, donde fue 5 veces mayor que en el medio sin reguladores.

La generación de plantas se logra por una concentración suficiente de reguladores, una combinación adecuada, un cambio en estas o por omisión de las mismas. El inconveniente de adicionar medios ricos en reguladores es que promueve el crecimiento de tejido diploide de la antera. De hecho para la inducción de callogénesis es necesario el empleo de auxinas, pero para la formación de plantas es mejor el medio sin reguladores (Maheshwari *et al.*, 1982)

3.11. SACAROSA

La principal fuente de carbono para el cultivo de anteras es la sacarosa. Dunwell (1991) menciona que existen dos tipos de plantas, las que requieren de bajas concentraciones, de 2 a 4% como las solanaceas y lileaceas, y las que requieren altas concentraciones, de 8 a 12% como los cereales, aunque esto no es universal. En algunos casos como en papa, se recomienda adicionar al medio altas concentraciones al inicio de la embriogénesis porque inhibe la proliferación de tejidos somáticos, pero una vez que emergen las plántulas es conveniente disminuir su concentración (Maheshwari *et al.*, 1982).

Los altos niveles de sacarosa actúan como reguladores osmóticos previniendo la lisis del polen durante las etapas tempranas de división y más tarde evita la germinación precoz del polen durante las etapas tempranas de embriogénesis.

3.12. AMINOÁCIDOS

En el curso de la formación de embriones se han observado cambios en los niveles de aminoácidos, principalmente en treonina, serina, glutámico y prolina presentes en el tejido nutritivo de la antera, que al parecer son determinantes en la inducción de embriones (Collins y Genovesi, 1982).

Algunos autores sugieren que es necesaria la adición de ciertos aminoácidos al medio para optimizar la producción de plantas haploides vía embriogénesis, debido a que las sales de nitrato o amonio que se incorporan al medio no pueden remplazarlos. Uno de los aminoácidos que más frecuentemente se emplea es la glutamina en concentraciones de 500 mgL^{-1} , aunque recientemente se ha observado que prolina tiene mejores resultados cuando se utiliza en concentraciones de 100 mgL^{-1} (Dunwell, 1985).

Se sugiere que ciertos genotipos poseen un aminoácido endógeno el cual permite la inducción embriogénica. En tabaco el ácido glutámico juega un papel clave en la promoción de crecimiento del polen (Collins y Genovesi, 1982).

3.13. TEMPERATURA Y LUZ

Dentro de los factores físicos de incubación, la temperatura es tal vez el más importante. En la mayoría de las especies, incluyendo las Solanaceas, se ha

observado buena respuesta cuando se incuban en un rango de 25 a 30 °C (Dunwell, 1985).

Rokka *et al.* (1996) al cultivar anteras de cuatro genotipos de papa encontraron que cuando éstas se mantuvieron a 28°C la respuesta a embriogénesis se incrementó en la mayoría de los genotipos, obteniéndose un promedio de 11.9% de embriones, comparado con un 0.9% cuando se cultivaron a 20°C.

En algunos casos temperaturas altas por períodos de 1 a 3 días han resultado favorables; sin embargo, el período de exposición óptimo puede variar en función del genotipo. En el caso de *Brassica napus* cv. Tower, 14 días a 30°C es más efectivo, en tanto que otros genotipos de este género, responden mejor en períodos cortos de 1 a 2 días a 35°C (Keller, 1984). En trigo se ha visto que incubar las anteras a 33°C y luego transferirlas a 24°C favorece la formación de callo.

Se sabe que la temperatura de incubación afecta el potencial de regeneración del callo inducido, cuando éste se mantiene con altas temperaturas (29-31°C) se llega a perder capacidad regenerativa (Dunwell, 1985).

Rokka *et al.* (1996) concluyen que la formación de yemas no fue afectada tanto como la producción de embriones por la temperatura. Asimismo, observó que cierto grado de oscurecimiento de los embriones y yemas están asociados con incrementos en la temperatura. Finalmente afirma que la prevención del

oscurecimiento se consigue disminuyendo la temperatura durante el cultivo. Por otro lado, temperaturas elevadas en mucho de los casos favorecen la producción de albinos (Dunwell, 1985).

En cuanto a la luz, es poca la evidencia sobre su efecto en el cultivo de anteras. La recomendación usual es que la incubación de las anteras sea en oscuridad o bien a muy baja intensidad, del orden de 2 000 lux (Bajaj *et al.*, 1977) y sólo se transfieran a la luz cuando los embriones o el callo se hayan formado (Dunwell, 1985; Sunderland, 1980), en este caso se recomiendan baja intensidad lumínica y el fotoperiodo depende del genotipo. Por lo general se recomiendan entre 14 y 16 horas luz y una intensidad lumínica de 4000 a 6000 lux.

Existen otros factores que influyen en el cultivo de anteras, que han sido estudiados con menos detalle, pero que de igual forma pueden ser significativos principalmente en el incremento de la frecuencia a embriogénesis o callogénesis.

La orientación de la antera en la superficie del medio generalmente no se controla, pues es muy difícil, sin embargo, es evidente que en algunas especies como tabaco y *Datura* los mejores resultados se han obtenido cuando la cara plana de la antera esta en contacto directo con el medio (Dunwell, 1991).

Por otro lado, **la alta densidad de siembra** parece tener un efecto benéfico en la frecuencia de embriogénesis, aunque existe poca evidencia de ésto, en

cebada se ha comprobado que entre más próximas estén las anteras unas de otras mayor es la respuesta al cultivo.

Bajaj *et al.* (1977) demostraron que cuando se cultivaron 4 anteras unas en contacto con las otras en 10 ml de medio la frecuencia de la respuesta se incrementó de 44.7 a 65.6% en comparación con las cultivadas a 1 cm de distancia; sin embargo, no hubo diferencias significativas en el número de plantas por antera. Por su parte, Dunwell (1991) recomienda para cebada utilizar 60 anteras por ml de medio.

Algunos investigadores sugieren que **la pared de la antera** también juega un papel importante en la embriogénesis, esta parece tener tanto efectos benéficos como inhibitorios, dependiendo de las circunstancias. En el inicio del cultivo induce o estimula la androgénesis, posiblemente aportando los nutrimentos y/o factores de crecimiento, pero en la senescencia tiene efecto inhibitorio del mismo (Maheshwari *et al.*, 1982)

En beleño, el polen embriogénico es restringido a la periferia del lóculo de la antera muy próximo al tapete, lo que sugiere que el gradiente crítico de sustancias de origen del tapete es instrumento para la inducción de división embriogénica en el polen (Bhojwani y Razdan, 1989).

Chen (1983) observó en arroz que la pared de la antera es importante en la inducción inicial del esporofito en el desarrollo del polen, debido a que los

metabolitos producidos por la actividad de la antera envuelven al callo joven, después las células del tapete desaparecen y las células remanentes proveen de ciertos metabolitos para el desarrollo subsecuente del polen.

Al respecto, Jing-li *et al.* (1983) concluyen que el desarrollo del polen esta completamente relacionado con la viabilidad de la antera y que es posible emplear reguladores de crecimiento para mantenerla y favorecer la división y diferenciación del esporofito.

3.14. REGENERACIÓN DE PLANTAS

No siempre los embriones derivados de anteras pueden desarrollarse en plantas, por lo que se hace necesario un medio de cultivo adecuado para éstos, que comúnmente es sólido. Generalmente, se requiere de una disminución en la concentración de sacarosa hasta el 2% y en muchos casos eliminar los reguladores de crecimiento y el suplemento de aminoácidos (Maheshwari *et al.*, 1982; Keller, 1984).

La tasa de conversión de embriones a plantas está bajo control genético. En algunas especies sólo una pequeña fracción (1-10%) de embriones cultivados se desarrollan directamente en plantas, la mayoría se desarrolla de una manera anormal, con un elongado o contraído hipocótilo. En *Brassica napus*, por ejemplo, se desarrolla un gran número de embriones secundarios a partir de embriones derivados de anteras (Keller, 1984; Aziz *et al.*, 1999).

Aziz *et al.* (1999) encontraron que de los siete clones de papa estudiados, sólo en dos hubo producción de plantas. Además observaron que en el primero se formó una gran cantidad de tejido (callo/embriones) derivado de las anteras y las plantas emergieron de estas estructuras; en tanto que en el segundo se dió una tendencia a producir directamente plantas de las anteras.

Por otra parte, la frecuencia de sobrevivencia de los embriones depende del estado de desarrollo. La mayoría de los embriones globulares no sobreviven, mientras que la mayoría de los embriones bipolares sobreviven y se tornan verdes. Una reducción gradual de sacarosa ayuda a su sobrevivencia, aunque no siempre es así. En *B. napus* la sobrevivencia de embriones es mayor con 6% de sacarosa que con 2% (Keller, 1984)

3.15. MÉTODOS CONVENCIONALES PARA LA PRODUCCIÓN DE HAPLOIDES

Existen algunas especies que son capaces de producir haploides de forma espontánea, pero su frecuencia es muy baja (0.001 a 0.01%). Esto se originan como resultado de partenogénesis o apomixis debido a la no fertilización (Bhojwani y Razdan, 1989).

Se pueden emplear diferentes técnicas para inducir de manera artificial la producción de haploides, mediante **ginogénesis** que implica el desarrollo de la oosfera sin fertilización como resultado de una polinización tardía o cuando el

polen resulta inviable porque se ha irradiado o bien si el polen es extraño, en el caso de cruas interespecíficas.

Por otra parte, si el núcleo de la oosfera se elimina o se inactiva antes de la fertilización se origina un haploide con la información del grano de polen. También es posible realizar ciertos cruces interespecíficos en donde se da la fertilización pero poco después de que esto ocurre uno de los genomas se elimina originándose un haploide por **eliminación del genoma**.

Al respecto, se ha observado que en cruas interespecíficas entre tetraploides de *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum* todas sus plantas fueron dihaploides. Estudios citológicos revelaron que en estas cruas dobles la fertilización ocurre normalmente pero la eliminación selectiva de cromosomas de *H. bulbosum* se presenta durante las primeras etapas de desarrollo del embrión híbrido, por lo que este tiene sólo cromosomas de *H. vulgare*. En estas condiciones el embrión aborta 10 días después de la polinización, por lo que es necesario aislarlos de la planta y cultivarlos en medio sintético (Bhojwani y Razdan, 1989).

La eliminación de los cromosomas es causada por que estos no pueden completar su congregación en metafase o su migración para los polos en la anafase. John (1983) encontró que la tasa de eliminación de cromosomas en el embrión se incrementó en el tercer día de su formación, lo cual coincide con la demanda de síntesis de proteínas. Además, observó que existe control genético

sobre los mecanismos de eliminación en el híbrido, en cebada esta controlado por los cromosomas 2 y 3.

De igual forma, el uso de **tratamientos químicos** como la aplicación de reguladores de crecimiento, de azul de tolúeno, hidracida maléica, óxido nitroso, cloranfenicol entre otros, o el **choque térmico** con bajas o altas temperaturas y la **irradiación** con rayos X o ultravioleta, pueden generar haploides (Pierik, 1990).

3.16. OBTENCIÓN DE HAPLOIDES *in vitro*

Los haploides pueden generarse a partir de células gametofíticas masculinas o femeninas; a través del cultivo de anteras, microesporas, polen, así como de ovarios, óvulos o bien a partir del cultivo de embriones inmaduros que se forman cuando no hay fertilización y que en condiciones naturales generalmente abortan. Cabe mencionar que la mayor parte de plantas haploides que se han obtenido *in vitro* han sido a partir del cultivo de anteras (Pierik, 1990).

3.17. IMPORTANCIA DE LA PRODUCCIÓN *in vitro* DE HAPLOIDES Y SU APLICACIÓN EN EL MEJORAMIENTO GENÉTICO

Las plantas haploides tienen un sólo juego de cromosomas y son estériles; sin embargo, si se duplica su número cromosómico mediante la aplicación de

algunos químicos como colchicina pueden ser fértiles, y lo más importante, isogénicos, es decir, todos sus loci serán homocigotos, produciendo una descendencia uniforme ya que ninguno de sus genes segrega (Pierik, 1990).

La obtención de líneas con alta homocigosis es una fase crítica del mejoramiento genético para el desarrollo de cultivares en diversas especies, su importancia radica en su utilización como progenitores para la obtención de semilla híbrida (F_1) que en principio debe ser homogénea (Dodds, 1985).

Tradicionalmente, los fitomejoradores obtienen líneas puras por autofecundación; no obstante, es un proceso que implica mucho tiempo, de 6 a 7 ciclos o generaciones, y labor intensiva pues se requiere de polinización manual, mientras que a partir de cultivo de anteras es posible producir haploides y conseguir la homocigosis (por posterior duplicación cromosómica) hasta en un año, haciendo el mejoramiento genético más rápido (Farnham, 1998).

La segregación genética se elimina en el caso de los homocigotos, pues no aparecen los genes recesivos enmascarados por los dominantes. La producción de líneas homocigotas resulta especialmente importante en plantas incompatibles (Dodds, 1985).

La homocigosis así obtenida es aún más importante en plantas que presentan una fase juvenil muy larga, como en árboles frutales o forestales, porque

conseguirla de manera natural es un proceso extremadamente largo. En el caso de plantas que son normalmente poliploides, resulta muy útil trabajar con un nivel de ploidía más bajo, ya que el estudio de la herencia y la combinación de caracteres deseables resulta más fácil (Pierik, 1990).

Asimismo, los monoploides poseen la ventaja para el mejorador de distinguir de forma inmediata las mutaciones recesivas, por lo que si se dispone de una gran cantidad de haploides la inducción de mutaciones y su selección se hace posible a gran escala, de esta forma se puede hacer selección de material resistente a fitotoxinas o condiciones desfavorables, por ejemplo (Dunwell, 1985).

Por otro lado, en fusión de protoplastos también resulta ventajoso trabajar con haploides para la hibridación somática, porque se obtendrían individuos con números cromosómicos iguales a los progenitores (Sopory y Bajaj, 1987).

De igual manera, genotipos complejos se fijan en plantas completamente homocigóticas obtenidas a través de diploidización de haploides, lo cual es muy importante en cuanto a características de baja heredabilidad condicionadas por interacciones génicas complejas. Los materiales isogénicos tienen un vigor reducido comparado con plantas heterocigóticas; sin embargo, se caracterizan por la ausencia de todos los genes letales (Dunwell, 1985).

Los dobles haploides pueden utilizarse para detectar linajes e interacciones génicas, de tal forma que pueden obtenerse varianzas genotípicas y el número de genes que afectan caracteres cuantitativos, así como ligamiento de genes (Dunwell, 1991).

La técnica de cultivo de anteras también ha permitido seleccionar líneas endogámicas con altos contenidos de alcaloides así como variedades resistentes a enfermedades o simplemente nuevas variedades (Sonino *et al.*, 1989).

A pesar de que se ha logrado un progreso considerable en cultivo de anteras, la principal dificultad es que se obtiene una baja frecuencia en la producción de haploides y sólo en pocas especies como arroz, cebada, trigo, papa y coliflor, la frecuencia es suficientemente que permite su uso para la obtención de nuevas variedades (Dodds, 1985).

Es importante hacer notar que la obtención de haploides, por si misma, no es importante para los mejoradores, ya que éstos son estériles, por lo que es precisa su duplicación para conseguir la fertilidad. Por lo tanto, si se obtienen homocigotos por duplicación de cromosomas, no se debe considerar como una meta definitiva, pues estos no son mas que el material para cruces posteriores que producirán híbridos valiosos cualitativa y cuantitativamente.

3.16. DETERMINACIÓN DE PLOIDIA DE LAS PLANTAS REGENERADAS

Una de las desventajas o ventajas en las plantas obtenidas a partir del cultivo de anteras en algunas especies es que las poblaciones resultantes contienen una mezcla de ploidias: haploides, dihaploides o diploides, triploides, tetraploides, octaploides y aneuploides. Farnham (1998) al cultivar anteras de brócoli obtuvo 12% de haploides, 55% dihaploides y 33% tetraploides.

Estas mezclas ocurren debido a la poliploidización espontánea y regular de los embriones durante el cultivo o bien por el crecimiento o desarrollo de tejido somático como el filamento, tejido conectivo o pared de la antera, los cuales están influenciados igualmente por el medio.

En arroz, el filamento se desarrolla cuando se utilizan más de 2 mgL^{-1} de auxinas. Similar comportamiento se observó cuando se colocaron anteras viejas y jóvenes en altas concentraciones de citocininas. No obstante, en algunas otras especies como cebada, nunca se observó producción de callo somático (Wenzel y Foroughi-Wehr, 1984). Por tal razón, es necesario verificar el nivel de ploidia de las plantas obtenidas antes de usarlas en programas de mejoramiento.

En la actualidad se utilizan varias técnicas para determinar el número cromosómico de las plantas, pero no todos son adecuados para aquellas que tienen cromosomas tan pequeños como la papa. Uno de los métodos más

usados y confiables es cuantificar los cromosomas en células somáticas y/o sexuales. La determinación del número de cromosomas en células somáticas de papa se realiza frecuentemente en las puntas de las raíces, que son tejido meristemático en crecimiento activo (Huamán, 1995).

Los cromosomas se cuentan con mínima equivocación en células en metafase; sin embargo, la frecuencia de células en esta etapa es baja, por lo que para incrementar su número e impedir que entren en anafase y al mismo tiempo favorecer la contracción de los mismo se requieren de tratamientos físicos o químicos, como el uso de agua a 0°C, hidroxiquinoleína o alfa bromonaftaleno, entre otros (García, 1988).

Por otra parte, es posible distinguir a los haploides de los diploides en función de sus características del tallo, hojas y flores. En algunas especies, como chile, los tallos son mucho más delgados en los haploides y la longitud del entrenudo es menor, lo que da la apariencia de roseta, las hojas son más angostas y las flores son aproximadamente una tercera parte del tamaño de las diploides. Esto puede deberse a pocas células o a células más pequeñas en los tejidos haploides (Morrison, 1987).

Farnham (1998) encontró una correlación positiva entre longitud de células guarda en la epidermis de la hoja con el nivel de ploidia, obteniendo aproximadamente el 50% de plantas regeneradas haploides y 1% diploide.

También la longitud de los estomas y el diámetro de los granos de polen han servido como parámetros para determinar el nivel de ploidia, aunque Ruiz y Larque (1990) consideran que en algunas especies no es un indicador confiable.

En algunas ocasiones se puede tener una estimación rápida del número cromosómico del material en estudio mediante la determinación del número de cloroplastos en las células guarda, que al parecer tienen una relación directamente proporcional al nivel de ploidia (Huamán, 1995). De acuerdo a Dunwell (1991) en papa los monohaploides tienen de 5 a 8 cloroplastos por célula guarda, en tanto que los dihaploides tienen de 10 a 15 y los tetraploides de 18 a 24.

Finalmente, en algunas ocasiones se recomienda determinar la ploidia mediante electroforesis o a través de la cuantificación de ADN de plantas y raíces por citometría de flujo. Aziz *et al.* (1999) pudieron determinar el porcentaje de monoplóides de clones de papa mediante ésta técnica.

IV. MATERIALES Y MÉTODOS

Esta investigación se llevó a cabo en el laboratorio de Usos Múltiples del Departamento de Fitotecnia de la Universidad Autónoma Chapingo.

4.1. DETERMINACIÓN DEL ESTADO DE DESARROLLO DE LAS CÉLULAS MASCULINAS

Se colectó una muestra de 100 botones florales de diferentes tamaños, de clones avanzados de *Solanum iopetalum* sembrados bajo condiciones de campo en Metepec, Toluca, Edo. de México.

De los botones colectados algunos se analizaron en fresco y otros se fijaron en solución farmer durante 24 h, después se transfirieron a una solución de alcohol al 70% por tiempo indefinido (García, 1988), para su posterior análisis.

Se midieron algunas características morfológicas del botón floral: longitud del botón (LB); longitud de los sépalos, de la parte superior hasta donde inicia la separación de los mismos (LS); diámetro del botón (DI); así como el grado de apertura del botón o constricción (AP); la proporción entre la longitud del botón y el diámetro del mismo (LBD) y entre la longitud del botón y la longitud del sépalo (LBS). La variable AP fue cualitativa y se establecieron tres niveles en

función del grado de constricción del cuello que forman los sépalos: I constricción completa, II constricción ligera y III constricción casi nula.

De cada botón se aislaron las anteras, las cuales se tiñeron con acetocarmín para identificar en el microscopio la etapa de desarrollo de las microesporas o grano de polen. Las diferentes etapas de desarrollo se clasificaron de la siguiente forma:

Etapa I Células madres del polen (inicio de profase), células en metafase I, anafase I y telofase I.

Etapa II: Células en metafase II, anafase II y telofase II (tetrada).

Etapa III: Células uninucleadas (previas a mitosis)

Etapa IV: Granos de polen.

Se realizó un análisis de correlación entre la etapa de desarrollo de las microesporas y cada una de las características morfológicas del botón floral determinadas, para indicar si existe alguna asociación entre estos y determinar los marcadores morfológicos convenientes.

4.2. CULTIVO DE *in vitro* DE ANTERAS

Se cosecharon botones florales de apariencia semiovalada o alargada con ligero grado de constricción o apertura del cáliz, por contener microesporas en etapa uninucleada (de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera parte).

El experimento se dividió en dos etapas: etapa de inducción (desde el inicio del cultivo hasta la formación de callo a partir de las anteras) y etapa de morfogénesis (a partir del callo formado hasta el desarrollo de raíces y plantas).

4.3. ETAPA DE INDUCCIÓN

4.3.1. Pretratamiento

Una vez seleccionados los botones se mantuvieron húmedos y envueltos con papel secante en el refrigerador a 4°C durante 48 y 96 h, con la finalidad de determinar cual es el tiempo de pretratamiento adecuado. Algunos botones no recibieron pretratamiento (testigo).

4.3.2. Desinfestación

Al término de este período los botones se desinfestaron, para lo cual se lavaron con una solución de detergente y agua corriente, posteriormente se trataron con una solución de hipoclorito de sodio (cloralex al 6% de ingrediente activo) al 15% durante 20 minutos, al término de lo cual se enjuagaron con agua destilada y esterilizada que contenía antioxidante (ácido cítrico 150 mgL⁻¹, ácido ascórbico 100 mgL⁻¹ y L-cisteína 25 mgL⁻¹).

Posteriormente se aislaron las anteras de los botones florales en condiciones asépticas, se eliminó el filamento y se colocaron en el medio de cultivo.

4.3.3. Medio de cultivo

En todas las pruebas se empleó el medio básico MS (Murashige y Skoog, 1962), suplementado con tiamina 1.0 mgL^{-1} , mio-inositol 100 mgL^{-1} , ácido nicotínico 0.5 mgL^{-1} , piridoxina 0.5 mgL^{-1} , cisteína 50 mgL^{-1} , ácido ascórbico 200 mgL^{-1} , agar-agar 6.5 gL^{-1} y pH 5.7 ± 0.1 .

Sacarosa: Con respecto a este compuesto, se adicionó al medio en una concentración del 6%, pues se recomienda emplear altas concentraciones al inicio de la embriogénesis o callogénesis, porque inhibe la proliferación de tejido somático y previene la lisis del polen en etapas tempranas de la división (Maheshwari *et al.*, 1982). Se empleó azúcar de mesa.

4.3.4. Carbón activado

Con la finalidad de determinar si la adición de carbón activado incrementa la repuesta de las anteras a formar callo, en los tratamientos donde hubo mayor formación de callo se realizó una segunda prueba donde se adicionó este compuesto al 0.2% de su concentración.

4.3.5. Reguladores de crecimiento

Se utilizaron diferentes tratamientos adicionando al medio de cultivo AIA (ácido indolacético) y BA (bencilaminopurina), en concentraciones de 0.0, 0.2, 1.0, y

0.0 1.0, 3.0 mgL⁻¹ respectivamente; tanto de manera individual como en sus respectivas combinaciones.

4.4. ETAPA DE MORFOGÉNESIS

4.4.1. Medio de cultivo

Se empleó medio básico MS suplementado con tiamina 1 mg L⁻¹, mio-inositol 100 mg L⁻¹ sacarosa 20 g L⁻¹, agar-agar 6.5 g L⁻¹, pH 5.7 ± 0.1.

4.4.2. Carbón activado

Se empleó al 0.2% de su concentración en uno de los tratamientos.

4.4.3. Reguladores de crecimiento

Se utilizaron AIA, BA, 2,4-D y GA₃ en las combinaciones que se describen en el cuadro 1.

Cuadro 1. Tratamientos para la etapa de morfogénesis

Tratamiento	AIA	BA	2,4-D	GA ₃	Carbón activado
	Mg L ⁻¹				(%)
1	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0
2	0.00	2.00	0.0	0.0	0.0
3	0.00	0.20	1.5	0.0	0.0
4	0.00	0.00	1.5	0.0	0.0
5	0.00	0.00	0.0	0.1	0.0
6	0.05	0.05	0.0	0.1	0.0
7	0.00	0.00	1.5	0.0	0.2

4.5. FASE DE INCUBACIÓN

En el inicio del cultivo o etapa de inducción las anteras se mantuvieron sin iluminación, con una temperatura de 22-23°C durante la mañana y 26-28°C durante la tarde. Una vez formados los callos se transfirieron a la luz, con una intensidad luminica de $24.5 \mu\text{mols}^{-1}\text{m}^{-2}$ y un fotoperiodo de 16 horas.

En cada uno de los diferentes tratamientos se evaluó:

- Grado de oscurecimiento de las anteras y del callo formado
- Tiempo que tardó en iniciarse la callogénesis.
- Número de anteras con desarrollo de callo (frecuencia de callogénesis)
- Cantidad de callo formado, al respecto se establecieron tres niveles: 1-poco (de 0.1-0.5 cm de diámetro aproximadamente), 2-medio (de 0.6-1.0 cm de diámetro) y 3-abundante (diámetro mayor de 1.1cm).
- Textura del callo y color
- Número de raíces formadas y longitud.
- Número de plantas completas desarrolladas

4.6. ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Etapa de inducción. Los diferentes experimentos se evaluaron mediante un diseño completamente al azar con arreglo factorial 3^3 , con 5 repeticiones por tratamiento (27 tratamientos en total). Los factores fueron: tiempo de

pretratamiento, AIA y BA, con tres niveles cada uno. La unidad experimental fue un frasco con 10 anteras.

Etapa de morfogénesis. Se empleó un diseño completamente al azar con seis repeticiones por tratamiento (7 tratamientos), la unidad experimental fue un frasco con cinco segmentos de callo.

V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1. ESTADO DE DESARROLLO DE LA CÉLULA MASCULINA

De los botones florales cosechados se aislaron las anteras y se analizaron en el microscopio, para observar las diferentes etapas de la microesporogénesis e identificar la etapa de interés (uninucleada).

Las células madres no presentaron un núcleo bien definido, posiblemente porque iniciaban la profase, aunque se observó claramente la calosa que rodea la célula (Figura 1-a), y es evidente hasta la etapa de tetrada; en tanto que en las células en etapa uninucleada se observó un núcleo bien definido y no vacuolada (Figura 1-d). En los granos de polen, en el inicio de su desarrollo se observó un núcleo definido, sin vacuolas aparentes, pero a diferencia de la anterior la pared celular mostró pequeñas invaginaciones características de la estructura externa del polen, las cuales a medida que se desarrolla se hacen más prominentes y esto es acompañado del crecimiento de vacuolas que le dan finalmente una apariencia típica (Figura 1-e y f). En cuanto a la etapa de tetrada fue fácil de identificar, resultando ser de tipo tetraédrico, que de acuerdo a Curtis (1976) es la más común (Figura 1-b y c).

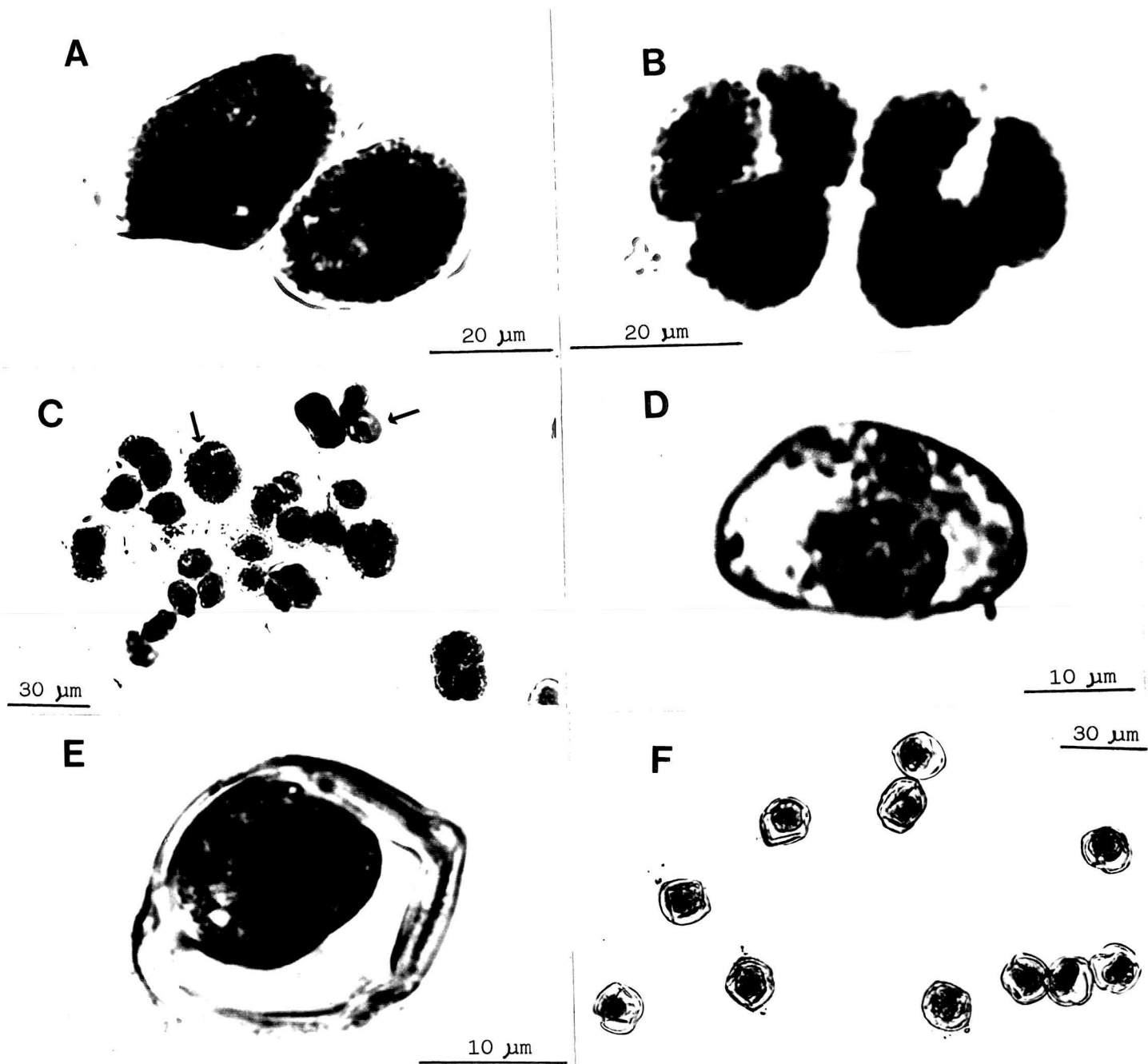


Figura 1. Diferentes etapas de la microesporogénesis en *Solanum iopetalum*. A)- Células madres del polen (inicio de profase). B)- Microesporas en tetrada. C)- Microesporas en tetrada y en etapa uninucleada. D)- Microespora en etapa uninucleada. E) y F)- Granos de polen.

Con la finalidad de reconocer de manera práctica la etapa uninucleada en los botones florales, se trató de asociar algunas características morfológicas de éste con el estado de desarrollo de la microespora.

Como se observa en el Cuadro 2 (apéndice), todos los parámetros morfológicos estudiados tuvieron una correlación con el estado de desarrollo de la microespora altamente significativa, lo cual significa que las variables tienen un grado de asociación real; Sin embargo, sólo el diámetro y apertura del botón floral tuvieron un coeficiente de correlación (positivo) importante, es decir, relativamente alto (0.7985 y 0.8003, respectivamente) y un intervalo del coeficiente de correlación poblacional de $0.69 \geq \rho \geq 0.85$; por lo cual fue posible utilizar ambas características en *S. iopetalum* como indicadores para seleccionar en un momento dado una etapa de desarrollo de interés, que en este estudio fue uninucleada.

Así, botones de diámetros mayores y sin constricción (apertura casi completa) tuvieron granos de polen en su mayoría, lo cual se puede interpretar como botones de apariencia redonda; en tanto que botones de apariencia alargada o semiovalada, con un ligero grado de constricción o apertura, tuvieron células en etapa uninucleada o de tetra.

En cuanto a las otras características evaluadas, no fue posible utilizarlas como marcadores morfológicos, pues no tuvieron un coeficiente de correlación alto,

es decir, su grado de asociación es bajo, lo que no permitió utilizarlos como indicadores de la etapa de desarrollo. Esto concuerda con lo expuesto con Sunderland (1980) quien menciona que la correlación entre apariencia del botón y la etapa de desarrollo no siempre es absoluta.

Es importante mencionar, que en la mayoría de los estudios consideran la longitud del botón como un indicador adecuado de la etapa de desarrollo. Rokka *et al.* (1996) por ejemplo, recomienda en papa utilizar botones de 4-7 mm de longitud pues estos contienen microesporas en etapa uninucleada, mientras que Shen y Veilleux (1995) utilizaron botones de 3-4 mm de longitud.

En este estudio la longitud no resultó ser un buen indicador de la etapa de desarrollo ($r=0.6286$), es decir, se encontraron tanto botones pequeños (0.3-0.4 cm de longitud) como grandes (0.6 a 1.1 cm) de apariencia alargada y ligero grado de constricción, con microesporas en etapa uninucleada. Cabe mencionar que en el establecimiento del cultivo se utilizaron de manera indistinta.

Al respecto, en estudios posteriores se recomienda emplear preferentemente botones grandes (0.60-1.0 cm de longitud) y de apariencia mencionada, porque facilitan la manipulación y por lo tanto reduce el daño mecánico en las anteras. Finalmente, se puede decir que en la mayoría de las preparaciones obtenidas para determinar la etapa de desarrollo se observó de manera general, sincronía

en un mismo botón, en algunos casos se observaron células uninucleadas y en tetrada.

Esto último es de gran importancia, puede significar una gran diferencia en la respuesta de las anteras. De acuerdo con Dunwell (1985) la microespora en ambas etapas es susceptibles de desarrollar callo o embriones, sin embargo, Sopory y Bajaj (1987) mencionan que los mejores resultados, en papa, se obtuvieron al cultivar anteras con microesporas en etapa uninucleada y la respuesta a embriogénesis disminuyó cuando se cultivaron en etapa de tetrada o binucleada

En tanto que Feng y Wolyn (1991) observaron en espárrago que la frecuencia en la formación de callo embriogénico y no embriogénico de anteras con microesporas en etapa uninucleada tardía fue más del doble que las cultivadas en uninucleada media o binucleada temprana, y seis veces mayor que en uninucleada temprana o binucleada tardía

5.2. ETAPA DE INDUCCIÓN DE CALLOGÉNESIS EN LAS ANTERAS

5.2.1. PRETRATAMIENTO

5.2.1.1. Efecto del pretratamiento en el oscurecimiento de las anteras. El grado de oscurecimiento de las anteras cultivadas es un aspecto de importancia, porque refleja el metabolismo de la pared de la antera, que esta

directamente relacionado con su viabilidad y subsecuente desarrollo embriogénico o callogénico de la microespora.

El oscurecimiento se consideró como la aparición de color marrón claro que fue sustituyendo al color verde de las anteras, debido posiblemente a la oxidación de fenoles, pero que no implicó muerte del tejido, pues con estas características las anteras se mantuvieron viables y turgentes. Por otro lado, el ennegrecimiento de las anteras, y consecuente deshidratación, se consideró como pérdida de viabilidad.

En el Cuadro 3 (apéndice), se muestra que los tiempos de pretratamiento con (0, 48 y 96 h) tuvieron un efecto significativo en el oscurecimiento y sobrevivencia de las anteras durante su cultivo. Al comparar las medias (Cuadro 4), se pudo observar que a la décima semana del cultivo el tratamiento que no recibió frío presentó un 49.3% de oxidación, comparado con los que recibieron 48 y 96 h de pretratamiento que fueron de 28.9 y 25.4% respectivamente; es decir, disminuyó significativamente.

Cuadro 4. Comparación de medias de Tukey del porcentaje de oscurecimiento y sobrevivencia por efecto del tiempo de pretratamiento con 4°C.

Tiempo de pretratamiento (h)	No. de anteras sembradas	Oscurecimiento (%)	Sobrevivencia (%)
0	450	49.3 a	69.1 a
48	450	28.9 b	78.0 a
96	450	25.4 b	76.3 a
DMS		3.68	9.31

*En sentido vertical las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

En cuanto al porcentaje de sobrevivencia, también fue mayor en el caso de los tratamientos donde se aplicó frío, con 48 y 96 h se obtuvo 78.0 y 76.3% respectivamente; comparado con el 60.1% de los que no recibieron frío, aunque en este caso las diferencias no fueron estadísticamente significativas.

La disminución en el porcentaje de oxidación así como el aumento del porcentaje de sobrevivencia de las anteras tratadas con frío, se debió posiblemente a que las bajas temperaturas retrasan la senescencia de la pared de la antera, ya que bajan la intensidad respiratoria y el consumo de nutrimentos, aumentando la viabilidad de la misma (Chen, 1983).

Esto último es de gran importancia en el inicio del cultivo, debido a que al parecer la pared de la antera induce la embriogénesis posiblemente aportando nutrimentos, aminoácidos principalmente y/o factores de crecimiento para la microespora (Maheshwari *et al.*, 1982).

Cabe mencionar, que el grado de oscurecimiento que presentaron las anteras no significa muerte del tejido, porque aún cuando éstas se tornaron de color verde-marrón claro, se mantuvieron viables y turgentes.

Asimismo, el oscurecimiento de las anteras en la mayoría de los tratamientos se presentó desde los primeros días de cultivo, lo cual pudo deberse en cierta medida al daño mecánico que se causó al momento de aislar las anteras del

botón floral, lo que produce oxidación del tejido e inicia la senescencia del mismo (Nitsch, 1983).

Finalmente, se puede decir que el oscurecimiento no fue total en la antera a lo largo del cultivo, es decir, no hubo ennegrecimiento seguido de deshidratación, posiblemente por la presencia de ácido ascórbico y cisteína en el medio, que funcionan como antioxidantes, pues de acuerdo con Tainen (1992) se ha demostrado que estos evitan el oscurecimiento de la antera, incrementando la respuesta a embriogénesis.

5.2.1.2. Efecto del pretratamiento en la formación de callo. Las bajas temperaturas (4°C) empleadas en el pretratamiento tuvieron un efecto significativo en la respuesta de las anteras a la formación de callo, como se observa en el Cuadro 3 (apéndice).

Cuadro 5. Comparación de medias de Tukey del porcentaje de anteras con callo y cantidad de callo formado, por efecto del tiempo de pretratamiento.

Tiempo de pretratamiento (h)	No. de anteras sembradas	anteras con callo (%)	Cantidad de callo formado
0	450	0.100 a	0.080 a
48	450	3.833 b	1.228 a
96	450	3.444 b	1.744 a
DMS		1.769	0.668

*En sentido vertical las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

Sin embargo, al comparar las medias se observó que no hubo diferencias entre los tratamientos con 48 y 96 h de frío, obteniendo 3.83 y 3.44% de anteras con

callo respectivamente, en tanto que en el testigo (0hrs de frío), la respuesta es significativamente menor, 0.10%. Esto coincide con lo expresado por Aziz *et al.*, (1999) quien encontró que pretratamientos con temperaturas de 4 y 5°C en clones diploides de *Solanum* presentaron 34% de anteras con producción de callo o embriones comparado con el 16% de los que no recibieron pretratamiento.

Lo anterior confirma que es necesario la aplicación de bajas temperaturas a los botones florales de *S. iopetalum* para estimular la formación de callo. Por un lado, porque posiblemente esto es lo que genera la desviación del proceso normal de división del polen (división asimétrica), dando lugar a dos núcleos iguales los cuales pueden iniciar el desarrollo de callo o embriones (Bajaj *et al.*, 1977; Auge y Boccon-Gibod, 1986). Y por el otro, porque como ya se mencionó las bajas temperaturas aumentan la viabilidad de la pared de la antera, la cual juega un papel importante en la inducción del esporofito en el desarrollo inicial de la microespora, debido a que provee a ésta de metabolitos necesarios para su desarrollo (Chen, 1983).

En cuanto al tiempo de respuesta, no hubo diferencias al emplear 48 o 96 h de pretratamiento, en ambos casos las anteras iniciaron la formación de callo en la tercera semana aproximadamente y continuó hasta la décima semana (Figura 2).

Esto es similar a lo obtenido por Aziz *et al.* (1999) en algunos clones de papa, los cuales produjeron callo/embriones de la semana 5 a la 12. En tanto que Shen y Veilleux (1995) reportaron haber obtenido embriones en algunos clones diploides de papa después de seis semanas de cultivo.

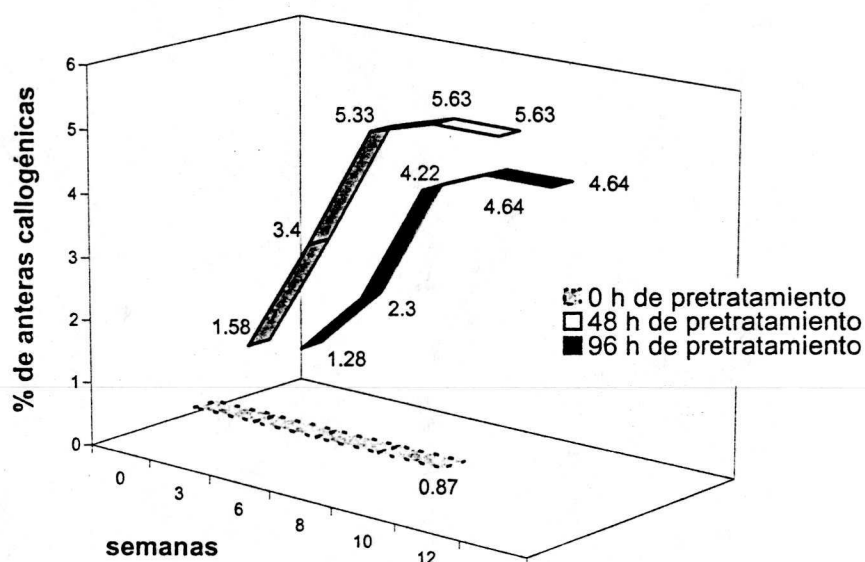


Figura 2. Efecto del tiempo de pretratamiento (0,48 y 96 h) con frío (4°C) en la respuesta de las anteras a la formación de callo.

También se puede ver que en la sexta semana el porcentaje de anteras que formaron callo se incrementó en ambos casos, pero continuó siendo mayor con 48h (5.33%) a diferencia del de 96 h (4.22%). Posteriormente el incremento de anteras callogénicas fue mínimo y se detuvo en la 10 semana, así como el crecimiento del callo.

Esto último coincidió con el incremento de la temperatura de incubación; durante el período inicial del cultivo, la temperatura se mantuvo entre 24 y 28°C durante el día, pero a partir de la semana 10 aproximadamente, la temperatura se elevó hasta 31-32°C. Al parecer estas temperaturas frenaron la formación de callo en las anteras, posiblemente porque las altas temperaturas afectan drásticamente el metabolismo descontrolando los procesos de desarrollo y crecimiento de las células.

Al respecto, Dunwell (1985) menciona que en la mayoría de las Solanaceas se han obtenido buenos resultados empleando temperaturas en un rango de 25 a 30°C, temperaturas mayores disminuyen la posibilidad de androgénesis o callogénesis.

Asimismo, se ha visto en algunas especies que las temperaturas altas son necesarias para inducir la formación de callo en períodos cortos, pues por tiempo prolongado son negativas. Keller (1984) reporta que en *Brassica* son necesarias temperaturas de 30-35°C en períodos de 1 a 3 días o incluso 14 días en el inicio del cultivo, posteriormente es necesario disminuir la temperatura a 24°C para favorecer la formación de callo.

En este aspecto coincide con Rokka *et al.* (1996) quien reporta que en uno de los cinco clones de papa que estudio (Petra) obtuvo un aumento en la

producción de embriones sólo cuando disminuyó la temperatura de incubación de 28 a 24°C, después de cuatro semanas de incubación

Aunque estadísticamente represente lo mismo en la respuesta de las anteras emplear 48 o 96 h de frío, se puede ver que la media (Cuadro 5) es ligeramente mayor con 48 h. Además, se observó que los botones después de cuatro días de almacenamiento se tornaron más flácidos lo que dificultó el aislamiento de las anteras y favoreció el daño mecánico, incluso en la desinfestación. Esto hace pensar que es más conveniente emplear 48 h. de pretratamiento

5.2.2. CARBÓN ACTIVADO

5.2.2.1. Efecto del carbón activado en el oscurecimiento de las anteras. En el Cuadro 6 se muestran las diferencias en el porcentaje de oxidación promedio de las anteras tratadas con 0.2% de este compuesto. El testigo mostró el mayor porcentaje (30.2%), comparado con el que contenía carbón activado (23.0%). El efecto de este compuesto se esperaba, pues se considera que es capaz de adsorber etileno o sustancias fenólicas, producidas por la pared de la antera, así como sustancias que resultan de la degradación de la sacarosa por efecto de la esterilización en autoclave, que incrementan la oxidación del tejido (Dodds, 1985; Nitsch, 1983)

De igual forma, el porcentaje promedio de viabilidad de la antera fue similar en ambos casos, lo que significa que el grado de oxidación que presentaron las anteras que no se trataron con carbón activado no es severo, al parecer la adición de este compuesto no fue determinante en la viabilidad.

Cuadro 6. Porcentajes de oscurecimiento y sobrevivencia después de 10 semanas de iniciado el cultivo.

Carbón activado (%)	No. de anteras sembradas	Oscurecimiento (%)	Sobrevivencia (%)
0.0	250	30.2	77.3
0.2	250	23.0	80.7

5.2.2.2. Efecto del carbón activado en la callogénesis. De las anteras sembradas en medio con carbón activado ninguna presentó desarrollo de callo o embriones.

Varios autores coinciden en mencionar que la adición de carbón activado al medio de cultivo es benéfica e incluso en algunos casos necesaria para incrementar la respuesta de las anteras a embriogénesis o callogénesis hasta en un 50%, ya que disminuye la oxidación e incrementa la viabilidad de la antera (Bajaj *et al.*, 1977; Rokka *et al.*, 1996).

Sin embargo, de acuerdo a lo obtenido, es posible que no sea conveniente adicionar este compuesto al medio en el inicio del cultivo, pues de acuerdo con Sevenier y Cumans (1996) la producción de etileno (que favorece la oxidación) por las anteras principalmente en etapas tempranas, estimula la división de la microespora originando callo o embriones, pero una vez que se forman su desarrollo se ve inhibido por el etileno.

Cabe señalar que las anteras que produjeron callo fueron de color verde-marrón claro; es decir, con cierto grado de oxidación. Esto indica que posiblemente el etileno y fenoles producidos por la pared de la antera en etapas tempranas de la incubación favorecieron el desarrollo callogénico en la antera. Lo anterior puede explicar porque en los tratamientos con carbón activado las anteras no generaron callo o embriones, aún cuando se mantuvieron viables y en su mayoría de color verde claro durante el cultivo.

5.2.3. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Cuadro 7. Comparación de medias de Tukey del porcentaje de oscurecimiento por efecto de los reguladores de crecimiento.

Concentración (mgL ⁻¹)	Porcentaje de oscurecimiento	
	AIA	BA
0.0	32.5 a	30.9 a
0.2	25.0 b	
1.0	23.8 b	26.4 ab
3.0		24.2 b
DMS	5.394	5.394

En sentido vertical, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

5.2.3.1. Efecto del AIA y BA en el oscurecimiento de las anteras. En el cuadro 3 (apéndice), se puede observar que tanto el AIA como el BA influyeron significativamente en el oscurecimiento de las anteras y al analizar la comparación de medias, en el caso de AIA (Cuadro 7) se vio que en concentraciones de 0.2 y 1.0 mgL⁻¹ en el medio de cultivo, tuvo efectos similares

en el porcentaje de oxidación y en ambos casos fue significativamente menor (25.0 y 23.8% respectivamente), en comparación con el testigo (32.5%).

En cuanto a BA también hubo diferencias significativas. Al comparar las medias se ve que sólo cuando se empleó 3.0 mgL^{-1} de éste compuesto, se disminuyó significativamente el oscurecimiento en las anteras (24.2%) comparado con el (30.9%) del testigo.

Lo anterior muestra claramente que ambos reguladores de crecimiento favorecen la disminución de oxidación de las anteras, esto pudo deberse a que éstos mantiene la viabilidad de la pared de la antera facilitando la absorción de nutrimentos (Jing-li *et al.*, 1983).

5.2.3.2. Influencia del AIA y BA en la formación de callo. Se evaluó el efecto de diferentes concentraciones de AIA (0.0, 0.2 y 1.0 mg L^{-1}) y BA (0.0, 1.0 y 3.0 mgL^{-1}) y sus diferentes combinaciones.

En el Cuadro 3 (apéndice) se muestra que ambos reguladores de crecimiento afectaron significativamente la respuesta de las anteras a formar callo. Asimismo, se observa que la interacción entre estos dos factores, así como con el pretratamiento, fue altamente significativa.

Cuadro 8. Comparación de medias de Tukey del porcentaje de anteras con formación de callo por efecto de reguladores de crecimiento.

Concentración (mgL ⁻¹)	Anteras con formación de callo (%)	
	AIA	BA
0.0	0.17 b	0.58 b
0.2	4.17 a	
1.0	6.58 a	8.83 a
3.0		1.50 b
DMS	2.592	2.592

En sentido vertical, las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).

El Cuadro 8 muestra que se obtuvo mayor respuesta (6.58%) cuando se emplearon concentraciones de 1 mg L⁻¹ de AIA y en el caso de BA de igual forma (8.83%), esta concentración superó significativamente al testigo, lo que concuerda con lo reportado por algunos autores que mencionan que concentraciones de 1-2.5 mg L⁻¹ da mejores resultados.

Así por ejemplo, Aziz *et al.* (1999) obtuvo mayor porcentaje de respuesta al emplear medios con combinaciones de AIA y BA en concentraciones de 1 y 1-2.5 mg L⁻¹ respectivamente; mientras que Jin-li *et al.* (1983), en anteras de trigo, al utilizar 1.2 mg L⁻¹ de AIA y 2.0 mg L⁻¹ de cinetina, encontraron que se incrementó considerablemente la inducción de polen multicelular y subsecuente desarrollo de embriones, que resultó cinco veces mayor que cuando no se empleó reguladores.

Por otra parte, en la Figura 3 se muestran claramente la interacción entre los tres factores de estudio en la respuesta de las anteras a la formación de callo;

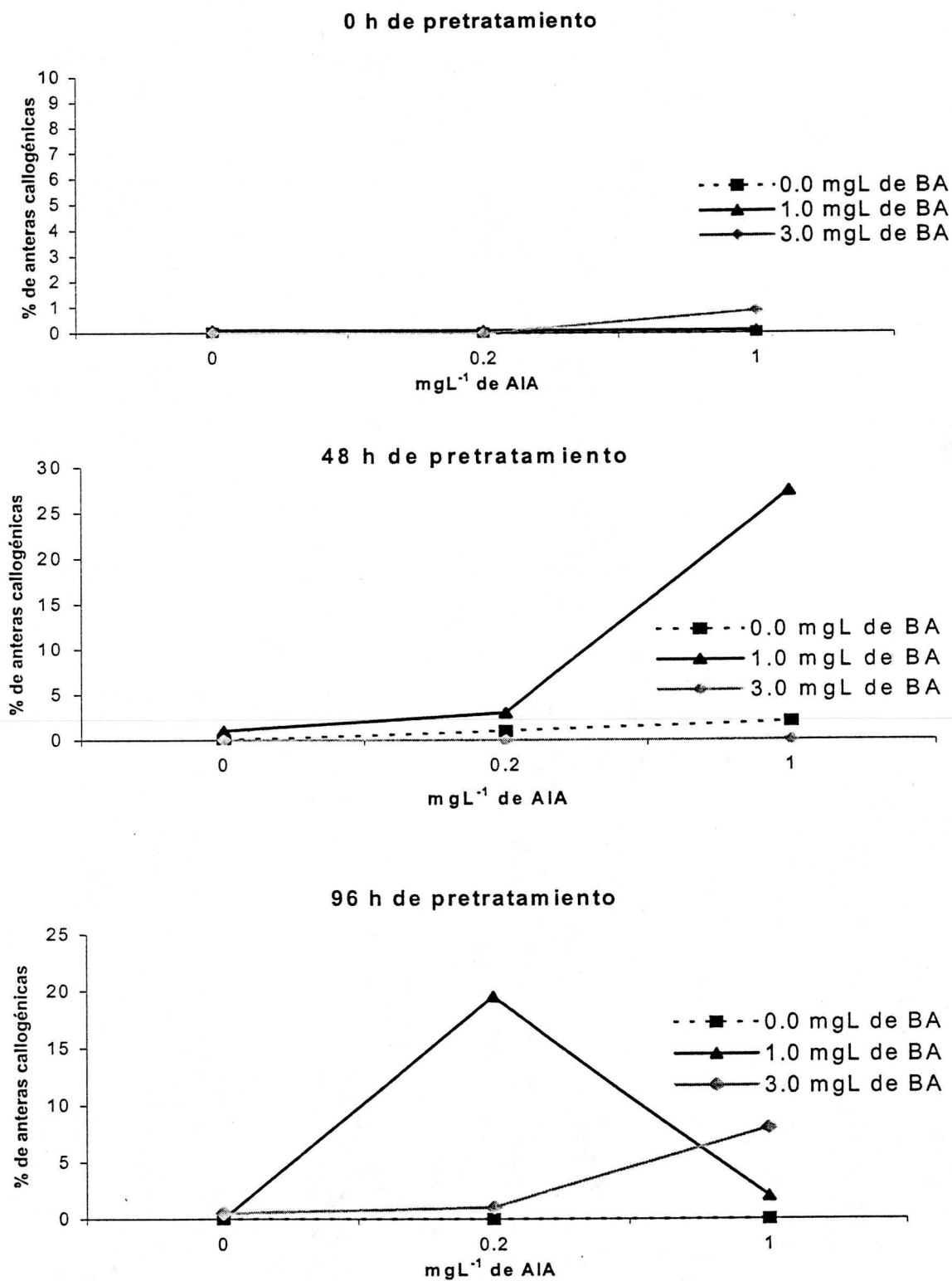


Figura 3. Interacción de AIA, BA y tiempo de pretratamiento con frío (4°C), en la respuesta de las anteras a la formación de callo.

es decir, el comportamiento de los tratamientos donde se aplicó BA, con respecto a las diferentes concentraciones de AIA utilizadas, no se mantuvo constante al cambiar los tiempos de pretratamiento.

Aismismo, se puede observar en todos los casos, que en ausencia de ambos reguladores de crecimiento no hay respuesta a la formación de callo. Esto concuerda con lo reportado por Kitizios *et al.* (1996) quienes reportaron que de los cuatro cultivares de trigo utilizados ninguno tuvo respuesta en ausencia de reguladores de crecimiento.

Cuando los reguladores se aplicaron de forma individual, la respuesta máxima fue baja, de 1% con 1.0mgL de BA y de 2% con 1.0 mgL de AIA, misma que se incrementó al emplear ambos reguladores de forma combinada, siempre que hubiera pretratamiento con frío.

De lo anterior se resume que tanto los reguladores de crecimiento como el pretratamiento con frío son necesarios para inducir la formación de callo a partir en las anteras.

Al comparar el porcentaje de anteras callogénicas obtenido con 0.0, 1.0 y 3.0 mg L⁻¹ de BA en los diferentes tiempos de pretratamiento, se puede apreciar que en ausencia de BA (0.0 mgL⁻¹), sólo hubo respuesta cuando se combinó con 0.2 y 1.0 mg L⁻¹ de AIA y 48 h de pretratamiento, con una frecuencia de 1 y 2% respectivamente.

Al aplicar 1.0 mg L^{-1} de BA hay respuesta en los tres tiempos de pretratamiento. En el primero (0 h) la respuesta fue muy baja (0.87%), prácticamente nula. Con 48h de pretratamiento y 1.0 mg L^{-1} de AIA, se obtuvo el porcentaje más alto de callogénesis de todos los tratamientos (27.5%); en tanto que con esta misma combinación de reguladores y 96 h de pretratamiento, la respuesta disminuyó hasta el 2%.

Por otro lado, al emplear 1.0 mg L^{-1} de BA + 0.2 mg L^{-1} de AIA + 96 h de pretratamiento se produjeron 19.5% de anteras callogénicas, lo cual fue bastante aceptable, en contraste con el 3% obtenido al aplicar 48 h de pretratamiento.

Finalmente, al adicionar 3.0 mg L^{-1} de BA al medio de cultivo se obtuvo respuesta únicamente al tratar las anteras con frío durante 96 h, encontrándose que la frecuencia más alta fue de 8% y se produjo al combinar estos factores con 1.0 mg L^{-1} de AIA.

La interacción entre los tres factores fue altamente significativa (Cuadro 3, apéndice) por lo que se puede decir, que los cambios observados en éstos, no se atribuyen a efectos aleatorios. Esto se esperaba, pues se sabe que los reguladores de crecimiento no actúan de manera independiente y funcionan mediante gradientes de concentración, es decir, su función dependerá de su concentración y la presencia de otros reguladores (Jankievish, 1986). Además,

las bajas temperaturas de pretratamiento influyen de manera importante en la inducción de callogénesis en la antera .

Lo anterior concuerda con los resultados obtenidos por Jing-li *et al.* (1983), quienes demostraron que cuando las anteras de trigo son pretratadas a 3 y 5°C por 72 h en medio líquido suplementado con 1.2 mg L⁻¹ de AIA y 2 mg L⁻¹ cinetina, se incrementó considerablemente la inducción de polen multicelular y subsecuente desarrollo de embriones, que fue 5 veces mayor que en el medio sin reguladores. De acuerdo a lo anterior, se pudo determinar finalmente cuales fueron las mejores combinaciones de AIA, BA y tiempo de pretratamiento.

Cuadro 9. Tratamientos en los que se obtuvieron anteras con formación de callo.

tratamientos			No. de anteras sembradas	Oscurecimiento (%)	Tiempo de respuesta (semanas)	Anteras con callo (%)	• Cantidad de Callo formado
PRET (h)	BA (mgL ⁻¹)	AIA (mgL ⁻¹)					
0.0	1.0	1.0	50	27.5	5	0.87	0.10
48	0.0	0.2	50	24.0	3	1.0	0.10
48	0.0	1.0	50	24.0	5	2.0	0.05
48	1.0	0.0	50	36.5	5	1.0	0.05
48	1.0	0.2	50	22.5	3	3.0	0.30
48	1.0	1.0	50	21.5	3	27.5	1.80
96	0.0	0.2	50	29.5	5	0.5	0.00
96	1.0	1.0	50	17.0	3	2.0	0.30
96	3.0	0.0	50	39.0	-	0.5	0.00
96	3.0	0.2	50	6.0	5	1.0	0.25
96	3.0	1.0	50	4.5	3	8.0	0.52
96	1.0	0.2	50	31.0	3	19.5	1.80

PRET = Pretratamiento con 4°C

- 1-poco (de 0.1-0.5 cm de diámetro aproximadamente), 2-medio (de 0.6-1.0 cm de diámetro) y 3-abundante (diámetro mayor de 1.1 cm).

En el Cuadro 9 se observa que al emplear: 48 h de pretratamiento +1.0 mg L⁻¹ de AIA + 1.0 mgL⁻¹ de BA; 96 h de pretratamiento + 0.2 mg L⁻¹ de AIA + 1.0 mgL⁻¹ de BA y 96 h de pretratamiento + 1.0 mg L⁻¹ de AIA + 3.0 mg L⁻¹ de BA, se obtuvieron los mayores porcentajes de anteras callogénicas, 27.5, 19.5 y 8%, respectivamente. Asimismo, el primero y el segundo presentaron los porcentajes más altos de callo producido por antera de 0.6-1.0 cm de diámetro aproximadamente.

Con respecto al resto de las variables, en los tres tratamientos, el grado de oscurecimiento no fue severo (4.5-31.0%), es pertinente señalar que donde se presentó menor oscurecimiento hubo menor respuesta a callogénesis, y en los tres casos la respuesta de las anteras a formar callo se dio a las tres semanas de iniciado el cultivo.

De lo anterior se deduce que estos tres tratamientos fueron los mejores y de éstos el primero (1.0 mgL⁻¹ de AIA, 1.0 mgL⁻¹ de BA y 48h de pretratamiento) resultó ser el más eficiente para la inducción y subsecuente producción de callo en anteras de *S. lopotatum* (Figura 4-C).

5.2.4. Características del callo formado

Es importante mencionar que los callos se formaron en la mayoría de los casos a partir de anteras de color verde-marrón, es decir, presentaban cierto grado de oxidación, pero estaban turgentes y viables.

Los callos formados fueron de color verde claro y de apariencia compacta. En casi todos los tratamientos, en el inicio de la formación del callo se observaron estructuras similares a proembriones (Figura 4-A), pero posteriormente no se observó desarrollo de embriones.

Es posible que estos interrumpieran su desarrollo y hayan quedado enmascarados por el crecimiento del callo, pues de acuerdo con Wenzel y Foroughi-Wehr (1984) algunos embriones muestran secundariamente formación de callo bajo la influencia de auxinas, las cuales son necesarias para la inducción del desarrollo de la microespora.

Otro aspecto de gran importancia es que, al parecer, el callo se formó a partir de las microesporas y no de la pared de la antera o filamento, ya que en todos los casos en el inicio del proceso se observó una hidratación de la antera y posteriormente los lóbulos de la antera se abrieron y del interior se generó callo. Una vez formado el callo, el tejido de la antera se fue ennegreciendo hasta constituir tejido muerto, el cual al transplantar los callos se eliminó (Figura 4-B y D).

Lo anterior sugiere que existen altas posibilidades que el callo que se generó a partir de anteras sea haploide o de otras ploidias pero con información genética exclusivamente del microgameto y las plantas que se generen a partir del callo serán de estas características; sin embargo, no se corroboró. Esto, se

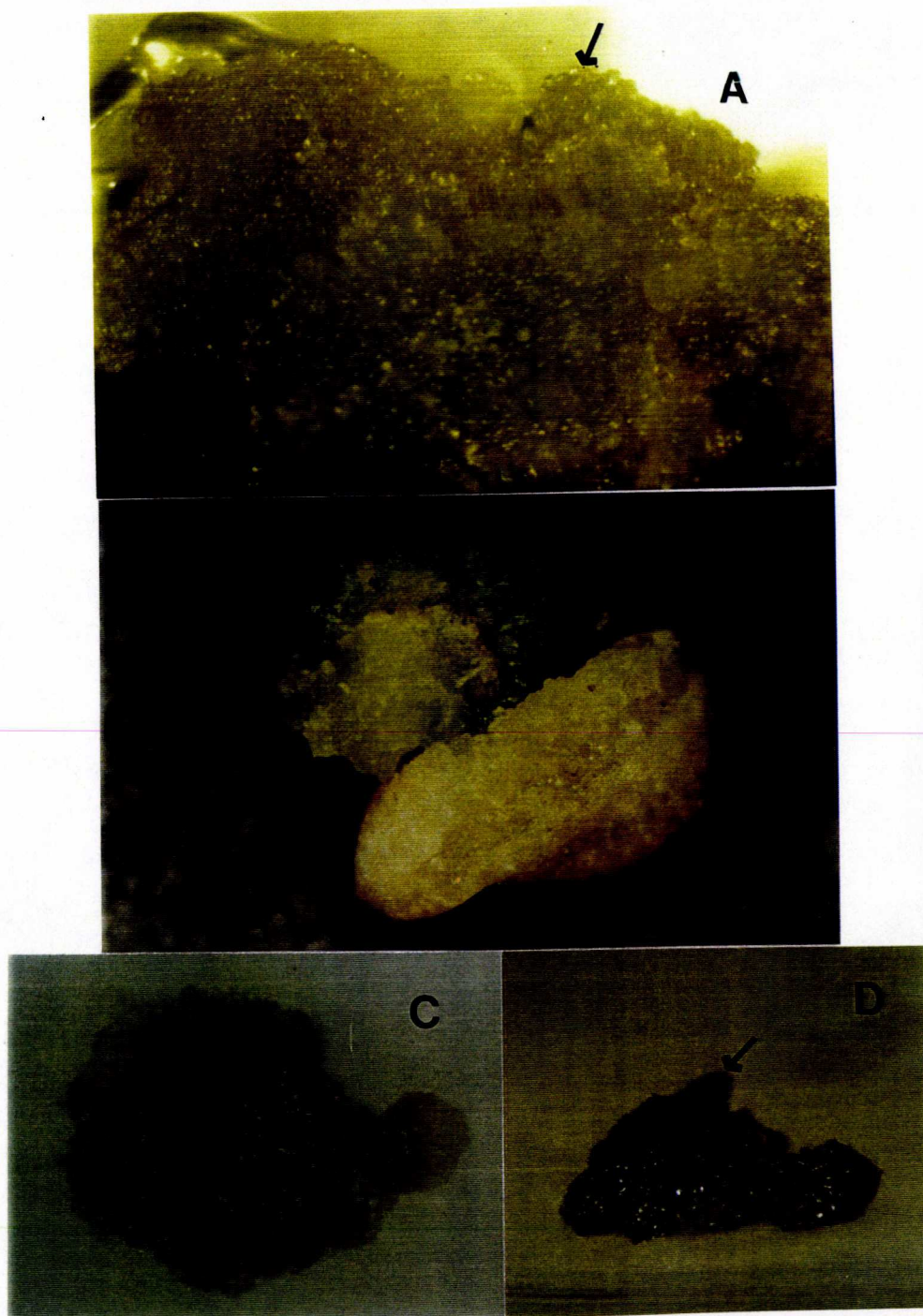


Figura 4. Formación de callo a partir de anteras tratadas con frío (4°C) durante 48 h. A)- Desarrollo de proembriones en medio MS suplementado con 0.2 mg L⁻¹ de AIA + 1.0 mg L⁻¹ de BA. B) y D)- El tejido de la antera no participa en la formación de callo. C)- Formación de callo en medio MS suplementado con 1.0 mg L⁻¹ de AIA + 1.0 mg L⁻¹ de BA.

menciona porque algunos autores como Rokka *et al.* (1996), mencionan que cuando la plantas se generan a partir de callo puede haber alteraciones en los procesos de división y generarse diferentes ploidias por endoduplicación, fusión o endomitosis.

5.3. ETAPA DE MORFOGÉNESIS O REGENERACIÓN DE RAÍCES Y PLANTAS

Los callos formados a partir de anteras se trasplantaron a medios morfogénicos con la finalidad de inducir la diferenciación de raíces, brotes y/o plantas completas, pues no siempre los embriones o callos derivados de anteras pueden desarrollarse en plantas, por lo que requieren de un medio de cultivo adecuado, que generalmente implica una disminución en la concentración de sacarosa, hasta un 2% (Maheshwari *et al.*, 1982).

5.3.1. CARBÓN ACTIVADO

El análisis estadístico de esta segunda fase (Cuadro 10, apéndice), mostró diferencias significativas en cuanto a los diferentes tratamientos, y al comparar las medias (Cuadro 11, apéndice) se observa que todos los tratamientos sin carbón activado presentan una media similar, donde la mínima fue de 10.0% y la máxima de 18.75%, lo que en general se puede interpretar como un bajo porcentaje de oxidación, el cual se puede atribuir al daño mecánico que se causó en el momento del trasplante.

En cuanto al tratamiento con carbón activado, se observa un alto porcentaje de oxidación (59.37), lo que se tradujo en pérdida de viabilidad. Esto contrasta totalmente con lo esperado, pues este compuesto es capaz de adsorber fenoles y etileno que se producen con frecuencia al hacer el corte del callo en el trasplante, y por lo tanto evita la oxidación (Nitsch, 1983; Dodds, 1985).

El alto grado de oxidación pudo deberse a que el carbón empleado (LAITZ S.A.) contiene altas concentraciones de potasio y algunas otras impurezas que pudieron afectar el tejido, pues, si bien es cierto que los tejidos meristemáticos son ricos en potasio, es posible que altas concentraciones sea tóxicas para el callo por lo que frenaron su crecimiento (Sánchez y Escalante, 1988).

Por otro lado, este compuesto puede adsorber sustancias nutritivas y/o que influyen en el desarrollo, como los reguladores de crecimiento cuando se emplea en altas concentraciones, pero éste no fue el caso, pues la concentración utilizada en el medio fue de 0.2% que es la más baja recomendada (Bajaj y Reinert, 1977; Rokka *et al.*, 1996).

5.3.2. REGULADORES DE CRECIMIENTO

Se evaluaron diferentes concentraciones de reguladores de crecimiento para determinar su efecto en la organogénesis del callo formado. El análisis estadístico (Cuadro 10, apéndice) indica que los reguladores empleados

influyeron significativamente en la diferenciación de raíces a partir del callo formado.

Al comparar las medias (Cuadro 11, apéndice), se observa que los tratamientos: 0.2 mgL^{-1} de BA + 1.5 mgL^{-1} de 2,4-D; 1.5 mgL^{-1} de 2,4-D; 0.1 mgL^{-1} de GA₃; y 0.05 mgL^{-1} de AIA + 0.05 mgL^{-1} de BA + 0.1 mgL^{-1} de GA₃, favorecieron el desarrollo de raíces (Figura 5); pero no presentaron diferencias significativas en la cantidad promedio de callos con desarrollo de raíces (1.71, 1.53, 1.41 y 2.0 respectivamente), lo que corresponde al 34.0, 30.6, 28.34 y 40%, respectivamente, comparado con 0.043 (0.86%) del tratamiento con 2.0 mgL^{-1} de BA y 0.0% del testigo.

Asimismo, el desarrollo de raíces por callo fue estadísticamente igual en estos tratamientos, de 3.38-5.41 (Cuadro 11), con longitudes promedio de 1.44 cm. a 2.84 cm, en tanto que el medio con 2 mgL^{-1} de BA sólo produjo en promedio 0.04 raíces por callo.

La adición de 2,4-D en concentraciones de 1.5 mgL^{-1} al medio solo o en combinación con 0.2 mg L^{-1} de BA, favoreció significativamente el enraizamiento, sólo en cuanto al número de raíces por callo (Cuadro 11), pero no indujo la brotación o formación de plantas completas. Esto pudo deberse, a que dicha concentración posiblemente inhibe la formación de brotes.

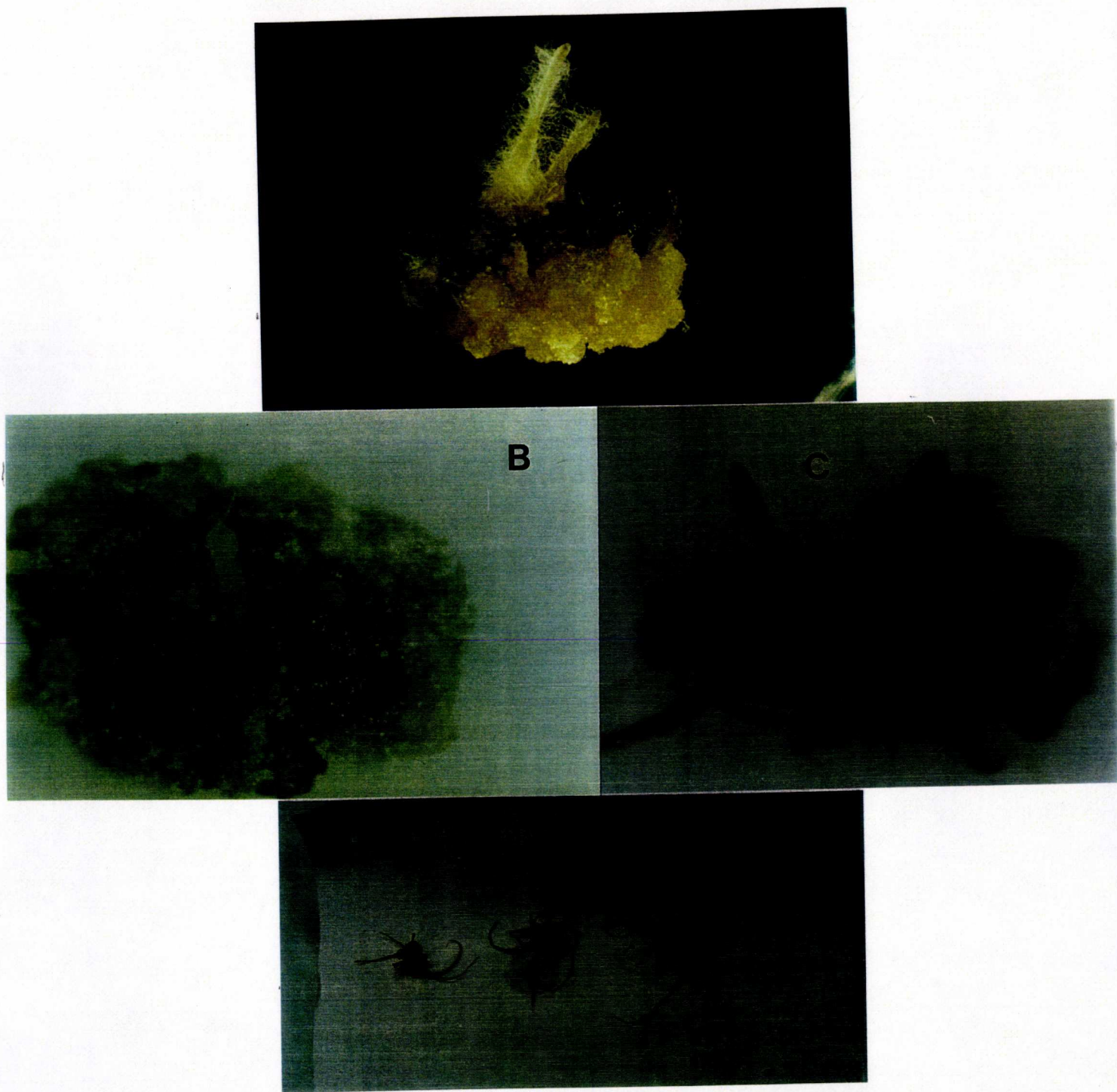


Figura 5. Desarrollo de raíces a partir de callo. A)-En medio MS suplementado con 1.5 mg L^{-1} de 2,4-D + 0.2 mg L^{-1} de BA. B)- En medio MS suplementado con 0.1 mg L^{-1} de GA_3 + 0.05 mg L^{-1} de AIA + 0.05 mg L^{-1} de BA. Los dos primeros después de 3 semanas de cultivo. C)- En medio MS suplementado con 1.5 mg L^{-1} de 2,4-D después de 6 semanas de cultivo. D)- En el mismo medio, después de 10 semanas de cultivo.

Kintzios *et al.* (1996), al trabajar con cuatro cultivares de trigo, observó que la inducción de brotes y raíces se vio favorecido por bajas concentraciones de 2,4-D (2 mg L^{-1}) pero disminuyó cuando se emplearon 5 mg L^{-1} de 2,4-D y concluye que la proliferación de brotes también puede ser afectada negativamente por la aplicación de auxinas en concentraciones altas durante la fase de inducción.

Por otro lado, en los tratamientos suplementados con 0.1 mg L^{-1} de GA_3 y 0.1 mg L^{-1} de $\text{GA}_3 + 0.5 \text{ mg L}^{-1}$ de BA + 0.5 mg L^{-1} de AIA, fue posible la regeneración de plantas completas, una planta en cada tratamiento, lo que representa el 3.33%. Esto significa que el GA_3 , influye de manera importante en la formación tanto de raíces como de plantas (Figura 6).

Lo anterior esta de acuerdo con lo mencionado por Moieni *et al.* (1996) quien indica que el GA_3 solo o en combinación con 2,4-D tiene un efecto positivo en la inducción de regeneración de plantas en cultivares hexaploides de trigo, ya que cerca del 80% de plantas haploides obtenidas fueron producidas de forma directa en medios suplementados con este regulador de crecimiento.

De manera similar Uhrig (1985) una vez que obtiene embriones en anteras de clones diploides de papa, los trasplantó a medio de Linsmaier y Skoog suplementado con 0.1 mg L^{-1} GA_3 donde obtiene un considerable desarrollo de plantas, entre 18.7 y 12.7 por 100 anteras, dependiendo del medio previo para la inducción de embriones.



Figura 6. Desarrollo de plantas a partir de callo. A)- En medio MS suplementado con 0.1 mg L^{-1} de GA_3 + 0.05 mg L^{-1} de AIA + 0.05 mg L^{-1} de BA, después de 5 semanas de cultivo. B)- En En medio MS suplementado con 0.1 mg L^{-1} de GA_3 , después de 5 semanas de cultivo. Se observan embriones en la base . C)- La misma planta después de 10 semanas de cultivo.

El hecho de que en los tratamientos libres de reguladores de crecimiento, el callo permaneció creciendo en pequeña proporción y se mantuvo viable a lo largo del estudio pero no se diferenció en raíces, brotes o plantas, aunado a lo anterior sugiere que los reguladores son necesarios para la organogénesis, como lo demostraron Moieni *et al.* (1996), Seseek *et al.* (1996) y Kintzios *et al.* (1996), en diferentes cultivares de trigo y Rokka *et al.* (1996) y Aziz *et al.* (1999) en clones de papa.

En general se tuvo una baja producción de plantas a partir de callo, 3.33%, sin embargo, la frecuencia en la producción de callo en los mejores tratamientos fue de 19.5 y 27.5%, la cual es bastante aceptable.

Seseek *et al.*, (1996) menciona que la habilidad de regenerar plantas es un indicador importante en la aplicabilidad del cultivo *in vitro* de anteras. Sin embargo, el número de anteras que responden a la formación de callo o embriones, puede ser usado también como un indicador viable. En su escrito indica que obtener de 3-4% de plantas regeneradas justifica el empleo de esta técnica en el mejoramiento genético, al menos en trigo.

Tomando en cuenta lo anterior y considerando la repuesta obtenida, se puede decir, que el cultivo de anteras si es susceptible de ser aplicado para la obtención de plantas haploides de *S. iopetalum*, ya que esta especie tiene un gran valor genético que puede ser utilizado

VI. CONCLUSIONES

De acuerdo al estudio realizado el marcador morfológico del botón floral que más se asocia con la microespora en etapa uninucleada es la apariencia semiovalada o alargada con ligero grado de constricción o apertura del cáliz.

El tiempo de pretratamiento, 48 y 96hrs, no presentó diferencias significativas en la frecuencia de anteras con formación de callo (3.83 y 3.44% respectivamente). Sin embargo, las anteras se pudieron manipular con mayor facilidad cuando se trataron con 48hrs de frío.

La adición de carbón activado al medio de cultivo al 0.2% de su concentración, tuvo efectos negativos en la inducción de callogénesis así como en la morfogénesis, debido a que frenó el desarrollo del callo.

El pretratamiento con 4°C así como la adición conjunta de AIA y BA al medio de cultivo, fueron necesarios para inducir la respuesta de las anteras a la formación de callo.

La combinaciones de reguladores de crecimiento y tiempo de pretratamiento más eficientes en la producción de anteras callogénicas fueron: 1.0 mgL⁻¹ de

AIA + 1.0 mgL^{-1} de BA y 48hrs de pretratamiento, y 0.2 mgL^{-1} de AIA + 1.0 mgL^{-1} de BA y 96hrs de pretratamiento con una frecuencia de 27.5 y 19.5% respectivamente.

Se requirió de reguladores de crecimiento para estimular la formación de raíces y plantas a partir del callo producido.

El 2,4-D en concentraciones de 1.5 mgL^{-1} sólo o en combinación con 0.2 mgL^{-1} de BA estimuló la formación sólo de raíces en 30.6 y 34.0% respectivamente.

El GA_3 en concentraciones de 0.1 mgL^{-1} sólo o en combinación con 0.05 mgL^{-1} de AIA + 0.05 mgL^{-1} de BA, favoreció la formación de plantas completas, con una frecuencia de 3.33% en ambos casos y de raíces en un 28.3 y 40% respectivamente.

Solanum iopetalum tiene capacidad androgénica y de regeneración de plantas *in vitro* con una frecuencia máxima de 27.5 y 3.33% respectivamente.

APENDICE

Cuadro 2. Coeficientes de correlación de las características morfológicas del botón floral.

	Características morfológicas					
	LB	DI	LS	AP	LBD	LBS
ED	0.6286	0.7985	0.5638	0.8003	0.5465	0.5599
$\alpha=$	0.005	0.0001	0.005	0.0001	0.005	0.0001
$\rho=$		$0.69 \geq \rho$ ≥ 0.85		$0.69 \geq$ $\rho \geq 0.85$		

DE = Estado de desarrollo

LB = Longitud del botón floral

DI = Diámetro del botón

LS = Longitud del nivel de constricción del botón al extremo superior

AP = Apertura o grado de constricción del botón

LBD = Diferencia entre la longitud del botón y el diámetro del mismo

LBS = Diferencia entre la longitud del botón y la longitud del nivel de constricción al extremo superior

ρ = coeficiente de correlación poblacional

Cadro 3. ANAVA: Diseño completamente al azar con arreglo factorial (etapa de inducción de callo a partir de anteras).

F.V.	GL	variables de estudio		
		NOA CM	NAC CM	CAC CM
TPT	1	11.377*	4.136**	0.9622**
BA	2	14.175*	24.536**	12.188**
AIA	2	26.875**	12.602**	5.655**
TPTxBA	2	34.219**	3.052*	0.808**
TPTxAIA	2	1.636	11.102**	4.009**
BAXAIA	4	11.050**	5.731**	2.877**
TPTxBAXAIA	4	43.052**	17.706**	5.990**
$\bar{X}$		2.98	3.63	0.439
C. V.		25.05	17.48	20.66

* nivel de significancia de $\alpha= 0.05$

** nivel de significancia de $\alpha= 0.01$

NOA = Número de anteras oscurecidas

NAC = Número de anteras con callo

CAC = Cantidad de callo formado

TPT = Tiempo de pretratamiento con 4°C

$\bar{X}$ = Media del experimento

C.V. = Coeficiente de variación

Cuadro 10. ANAVA: Diseño completamente al azar (etapa de morfogénesis).

F.V.	GL	Variables de estudio				
		OSC	CAC	NRC	NRA	LRA
		CM	CM	CM	CM	CM
Trat	6	180.9**	7.08**	16.43**	48.80**	0.67**
X ⁻		19.31	0.8557	0.9557	1.437	0.7685
C.V.		23.33	25.08	21.08	23.09	19.73

* nivel de significancia de $\alpha = 0.05$ ** nivel de significancia de $\alpha = 0.01$

OSC = Porcentaje de oscurecimiento del callo

CAC = Cantidad de callo formado

NRC = Número de callos (de cada 5 callos) que desarrollaron raíces

NRA = Número de raíces formadas por callo

LRA = Longitud promedio de raíces

X⁻ = Media del experimento

C.V. = Coeficiente de variación

Cuadro 11. Comparación de medias de Tukey de las variables de estudio en la etapa de morfogénesis

Tratamientos				Variables				
AIA	BA	2,4-D	GA ₃	OSC	CAC	NCR	NRC	LRA
		(mgL ⁻¹)		(%)				
0.00	0.00	0.00	0.00	10.00c	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
0.00	2.00	0.00	0.00	10.43c	0.71b	0.04b	0.04b	0.73b
0.00	0.20	1.50	0.00	11.45c	1.25ab	1.71ab	3.41a	1.44ab
0.00	0.00	1.50	0.00	11.85c	1.19ab	1.53ab	2.98ab	0.83b
0.00	0.00	0.00	0.10	18.75b	1.25ab	1.41ab	2.25ab	2.54a
0.05	0.05	0.00	0.10	13.33bc	1.59a	2.00a	1.38ab	1.21ab
0.00	0.00	1.50	0.00 ¹	59.37a	0.00b	0.00b	0.00b	0.00b
DMS				6.877	1.541	1.941	3.005	1.4825

*En sentido vertical las medias con la misma letra no son significativamente diferentes ($\alpha = 0.05$).¹ tratamiento con carbón activado

OSC = Porcentaje de oscurecimiento del callo

CAC = Cantidad de callo formado

NCR = Número de callos (de cada 5 callos) que desarrollaron raíces

NRC = Número de raíces por callo

LRA = Longitud promedio de las raíces

VII. LITERATURA CITADA

- Auge, R. y J. Boccon-Gibod 1986. Aplicaciones en la horticultura. En: Vidalie, H. (ed.). Cultivo *in vitro*. Edit. Científica, México. pp: 91-124.
- Aziz, A. N., J. E. A. Seabrook G. C. C. Tai and H. De Jong 1999. Screening diploid *Solanum* genotypes responsive to different anther culture conditions and ploidy assessment of anther-derived roots and plantlets. Amer. J. of Potato Res. 76:9-16.
- Bajaj, Y. P. S., Reinert et E. Herberle 1977. Factors enhancing *in vitro* production of haploid plants in anther and isolated microspores. In: Gauthere, T. R.(ed.). La Culture des Tissus et des Cellules des Vegetaux Resultas Generaux et Realsations Pratiques. Masson, Paris, France. pp:48-58.
- Bajaj, Y.P.S. 1983. *In vitro* production of haploids. In: Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Ammirato, P.V. and Yamada, Y. (eds). Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 1. Mcmillan., New York, U.S.A. pp: 256-277.
- Bhojwani, S. S. and M. K. Razdan 1989. Plant Tissue Culture: Theory and Practice. Elsevier Science Publishers B. V., Amsterdam, Netherlands. pp:113-141.
- Chen, Y. 1983. Anther and pollen culture of rice in China. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. The International Rice Research Institute (IRRI). Manila, Philippines. pp:11-25.

- Collins, G. B. and A. D. Genovesi 1982. Anther culture and its application to crop improvement. In: Application of Plant Cell and Tissue Culture to Agriculture and Industry. Tomes, D.T. and R. L. Peterson eds. Ontario, Canadá. pp:26-39.
- Curtis, P. J. 1976. Introducción a la Citología Vegetal. Univ. Autónoma Chapingo. edic. Planeta, S. A. Chapingo, México. 262 pp.
- Dodds, J.H. 1985. Experiments in Plant Tissue Culture. Dodds J.H. and Watson R. editors, Secon ed. U.S.A. 232 pp.
- Dunwell, J. M. 1985. Anther and ovary culture. In: Bright, S. W. J. and M. G. K. Jones (eds). Cereal Tissue and Cell Culture. Martinus Nijhoff / W. Junk Publishers. Boston, U. S. A. pp:1-43.
- Dunwell, J. M. 1991. Haploid cell culture. In: Dixon, R.A. (ed.). Plant Cell Culture: a Practical Approach. IRL Press. Washinton, U.A.S. pp:21-36.
- Farnham, M. W. 1998. Doubled-haploid broccoli production using anther culture: effect of anther source and seed set characteristics of derived lines. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 123(1):73-77.
- Feng, X. R. and D. J. Wolyn 1991. High frequency production of haploid embryos in asparagus anther culture. Plant Cell Reports. 10:574-578.
- Foroughi, W. B.; H. M. Wilson and M. G. Gaul 1977. Monohaploid plants from anthers of genotype of *Solanum tuberosum* L. Euphytica. 26:361-368.
- Gallais A. et Bannerot H. 1992. Amelioration des Especies Vegetales Cultivees: objectifs et criteres de selection. Institut National de la Recherche Agronomique. Paris, France. 768 pp.

- García, V. A. 1988. Técnicas y Procedimientos de Citogenética Vegetal. Univ. Autónoma Chapingo. Chapingo, México. 195 pp.
- Ghaemi, M., A. Sarrafi and G. Alibert 1993. Influence of genotype and culture conditions on the production of embryos from anther of tetraploid wheat (*Triticum turgidum*). Euphytica 65:81-85.
- Hanneman, R. E. 1994. The testing and release of transgenic potatoes in the North American Center of diversity. In: Krattiger, A. F. and A. Rosemarin (eds). Biosafety for Sustainable Agriculture: Sharing Biotechnology Regulatory Experiences of the Western Hemisphere. ISAAA: Ithaca and SEI. Stockholm. pp:47-67.
- Huamán, Z. 1995. Técnicas Citológicas para Determinar el Número Cromosómico y la Fertilidad de las Papas. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima, Perú. 10 pp.
- Jacobsen, L. and S. Sopory 1978. The Influence and possible recombination of genotypes on the production de microspore embryoids in anther culture of *Solamun tuberosum* and diaploid hibrids. Theoretical and Applied Genetics 52:119-123.
- Jankiewicz, L. S. 1989. Desarrollo Vegetal, Sustancias Reguladoras. Univ. Aut. Chapingo. México. 121 pp.
- Jing-Li, P., G. Gong-Hong and D. hai 1983. Initial types of wheat pollen cells and their development in anther culture. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. The International Rice Research Institute (IRRI). Manila, Philippines. pp:117-129.

- John, C. J. 1983. Producing haploid plants by chromosome elimination. In: Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement. The International Rice Research Institute (IRRI). Manila, Philippines. pp:57-75.
- Julio, L. G., N. Estrada, E. G. Carrasco y W. García 1998. Utilizaci6bn de *Solanum iopetalum* como fuente de resistencia al tiz6n (*Phytophthora infestans*). Reunion Latinoamericana de la Papa. Compendio de exposiciones. del 9-13 de febrero. Cocholobamba, Bolivia. pp:52-53.
- Keller, W. A. 1984. Anther culture of *Brassica*. In: Vasil, I.K. (ed.). Cell Culture and Somatic Genetics of Plants. Vol. 1. Academic Press. London, G.B. pp:302-310.
- Kintzios, S. E., M. Triantafyllou and J. Drossopoulos 1996. Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation on plant regeneration from mature wheat embryos. Cereal Research Communications. 24(2):147-153.
- Lozoya, S. H. 1997. Technical Report. Programa Internacional Cooperativo del Tiz6n Tardío (PICTIPAPA). Metepec, México. 19 pp.
- Maheshwari, S. C., A. Rashid and A. K. Tyagi 1982. Haploids from pollen grains. Amer. J. Bot. 69(5):865-879.
- Moieni, A. And A. Sarrafi 1996. The effects of giberellic acid, phenylethylamine, 2,4-D, and genotype on androgenesis in hexaploid wheat (*Triticum aestivum*). Cereal Research Communications. 24(2):139-145.
- Montaldo, A. 1984. Cultivo y Mejoramiento de la Papa. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas. San José Costa rica. 676 pp.

- Morrison, R. H., R. E. Koning and D. A. Evans 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. *Plant Physiology*. 126:1-9.
- Niederhauser, J. 1997. La papa como un cultivo básico en la alimentación de la población mundial. I Simposium Internacional de la Papa. Conferencia Magistrales. Campo experimental INIFAP, Valle de Toluca, Metepec. pp:3-4.
- Nitsch, C. 1983. Progress in anther and pollen culture techniques. In : *Cell and Tissue Culture Techniques for Cereal Crop Improvement*. The International Rice Research Institute (IRRI). Manila, Philippines. pp:1-10.
- Parsons, D. B. 1998. *Papas*. Edit. Trillas. México. D. F. 54 pp.
- Petolino, J., A. Jones and S. Thompson 1988. Selection for increased anther culture response in maize. *Theoretical Applied Genetics* 76:157-159.
- PICTIPAPA, A. C. (Programa Internacional Cooperativo Del Tizón Tardío De La Papa). 1997. Folleto. 11 pp.
- Pierik; R. L. M. 1990. *Cultivo in vitro de las plantas superiores*. Edit. Mundi-Prensa. Madrid, España. 268 pp.
- Rivera, P. A. 1980. Búsqueda de clones con gametos no reducidos. Informe de investigación. CIDAGEM-CIAMEC-INIA, México. 37 pp.
- Rivera, B. R. 1997. Variedades transgénicas de papa resistentes a los virus PVX y PVY. I Simposium Internacional de la Papa. Conferencia Magistrales. Campo experimental INIFAP, Valle de Toluca, Metepec, México. pp:45-48.

- Rokka, V., L. Pietilä and E. Pehu 1996. Enhanced production of dihaploid lines via anther culture of tetraploid potato (*Solanum tuberosum* L. Ssp *tuberosum*) clones. *American Potato Journal* 73:5-12.
- Ruiz, P. L. M. y A. S. Larque 1990. Los estomas de *Solanum cardiophyllum*, longitud, frecuencia e índice estomático. *Fitotecnia* 1(3):7-14.
- Sánchez, F. C. y E. R. Escalante. 1983. Hidroponia. Univ. Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 194 pp.
- Sequeira, L. 1997. Estrategias para el combate mundial contra el tizón tardío de la papa. I Simposium Internacional de la Papa. Conferencia Magistrales. Campo experimental INIFAP, Valle de Toluca, Metepec. pp:18-20.
- Sesek, S. and S. Dencic 1996. The potential of anther culture technique in wheat breeding. *Cereal Research Communications*. 24(2):163-171.
- Sevenier, R. and M. Coumans 1996. Ethylene production and involvement during the first steps of durum wheat (*Triticum durum*) anther culture. *Physiologia Plantarum*. 96(1):146-151.
- Shen, L. Y. and R. E. Veilleux. 1995. Yield of embryos from sequential anther culture. *American Potato Journal*. 72:689-700.
- Sibi, M. R., Dumas de Valux and D. Chambonnet 1979. Obtencion de plantes haploides par androgenèse *in vitro* chez le pimient (*Capsicum annum* L.) *Ann. Amélior Plan.* 29:583-606.
- Sonnino, A., S. Tanaka, M. Iwuanaga and L. Schilde-Restschler 1989. Genetic control of embryo formation in anther culture of dihaploid potatoes. *Plant Cell Reports*. 8:105-107.

- Sopory, S. K.; E. Jacobsen and G. Wenzel 1978. Production of monohaploid embryos and plantlets in culture anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Sci. Lett. 12:47-54.
- Sopory, S. K. and Y. P. Bajaj 1987. Anther Culture and Haploid Production in Potato. In: Bajaj Y. P.(ed.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. vol. 3 Potato. pp:90-105.
- Sunderland, N. 1980. Guidelines in the culture of pollen *in vitro*. In: Ingram, D.S. and Helgeson, J.P. (eds.). Tissue Culture Methods for Plant Pathologists. Blackwell Scientific Publications. London, G.B. pp: 33-40.
- Sunderland, N. 1981. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Pitman Publishing Ltd. and The Science Press. London, G.B. pp:65-86.
- Tiainen, T. 1992. The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of tetraploid potato (*Solanum tuberosum*). Plant Cell Reports. 10:604-607.
- Uhrig, H. 1985. Genetic selection and liquid medium conditions improve the yield of androgenetic plants from diploid potatoes. Theor. Appl. Genet. 71:455-460.
- Valdés, L. A. 1992. Producción de Hortalizas. Edit. Limusa. México, D.F. 296 pp.
- Vidal, M. V. A. 1998. Caracterización citológica y producción de gametos no reducidos en dihaploides de *Solanum tuberosum* L. e híbridos interespecíficos de papa. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Posgraduados. Montecillos, México. 76 pp.

Weier, T. E., G. R. Stocking, M. C. Barbour 1983. Botánica. De. Limusa, México.
774 pp.

Wenzel G. And Foroughi-Wehr 1984. Anther culture of cereal and grasses. In:
Vasil Y. K (ed.). Culture and somatic cell genetics of plants. Vol. 1.
Academic Press. London, G.B. pp: 36-54.

Wolf, S. 1997. El mercado mundial de la semilla de la papa. I Symposium
Internacional de la Papa. Conferencia Magistrales. Campo experimental
INIFAP, Valle de Toluca, Metepec, México. pp:5-8.