

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
MAESTRIA EN HORTICULTURA**

**Cultivo de anteras en tomate de
cáscara (Physalis ixocarpa) Brot.**



DIRECCION ACADEMICA
DEPTO. DE SERVICIOS ESCOLARES
OFICINA DE EXAMENES PROFESIONALES

T E S I S
QUE COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE
MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA
P R E S E N T A :
LEOBARDO LORTUÑO OLEA

CHAPINGO, MEX.

MARZO DE 1995

DX 63110
- 101336

DEDICATORIA

A mi esposa Sobeida, por su amor, comprensión y apoyo incondicional.

Al pequeño Leo.

A mi madre y hermanas por su apoyo moral y económico.

AGRADECIMIENTOS

Quiero dejar patente mi agradecimiento a todas aquellas personas que colaboraron de alguna manera para hacer posible la terminación del presente trabajo:

Al M. en C. Alejandro Manzo González, asesor de tesis, quien aportó valiosas sugerencias durante el desarrollo del mismo.

A mis sinodales por sus acertadas observaciones, en especial a la Dra. Susana Azpiroz Rivero, quien realizó una revisión meticulosa del borrador de tesis.

A la Dra. Marina Gavilanes Ruiz, por las facilidades brindadas para la transcripción e impresión de la tesis.

Al Dr. Agustín López Herrera, coordinador de la maestría en Horticultura, quien apoyó el desempeño escolar de los alumnos.

A los profesores de la Maestría en Horticultura, por su enseñanza y aporte de nuevas e invaluable experiencias académicas.

A los compañeros de la Maestría en Horticultura, por su compañía y la convivencia brindada durante mis estudios.

UNIVERSIDAD AUTONOMA CHAPINGO

DIRECCION ACADEMICA
CHAPINGO, MEXICO.

10327

AUTORIZACION DE EXAMEN DE GRADO			
FOLIO	FECHA		
	DIA	MES	AÑO
622.0/9212129-5	20	MARZO	1995

- C. M.C. ALEJANDRO MANZO GONZALEZ. PRESIDENTE
- C. M.C. TERESA CERVANTES MARTINEZ. ASESOR
- C. M.C. JOSE LUIS RODRIGUEZ DE LA O. ASESOR
- C. DRA. SUSANA ASPIROZ RIVERA. REPRESENTANTE COORD. GRAL.
ESTUDIOS DE POSTGRADO
- C. M.C. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA. REPRESENTANTE COORD. DEPTAL.
ESTUDIOS DE POSTGRADO

EN VISTA DE HABER SIDO SATISFECHOS LOS REQUISITOS QUE ESTABLECE EL REGLAMENTO ACADEMICO EN VIGOR, ESTA DIRECCION TIENE A BIEN AUTORIZAR EL EXAMEN DE GRADO AL C. LEOBARDO ORTUÑO OLEA. PASANTE DE LA CARRERA DE MAESTRO EN CIENCIAS EN: "HORTICULTURA"

 POR LO QUE RUEGO A USTED PRESENTARSE EN EL SALON N° LA SALA DE CONSEJO DEL DEPTO. DE FITOTECNIA DEL DEPARTAMENTO DE ENSEÑANZA E INVESTIGACION EN DE ESTA UNIVERSIDAD EL DIA 22 DEL MES DE MARZO A LAS 13:00 HRS. CON EL FIN DE INTEGRAR EL H. JURADO QUE DEBERA PRACTICAR EL EXAMEN DE GRADO ARRIBA MENCIONADO.

ATENTAMENTE
"ENSEÑAR LA EXPLOTACION DE LA
TIERRA, NO LA DEL HOMBRE"
EL DIRECTOR ACADEMICO

P.A.

ING. RAMES SALCEDO BACA.



C.C.P.-DEPTO. DE MAESTRIA EN CIENCIAS EN HORTICULTURA.

C.C.P.-C. PASANTE LEOBARDO ORTUÑO OLEA. PARA SU CONOCIMIENTO

INDICE

	Pág.
Introducción	1
Objetivos	3
Hipótesis	3
I. Revisión de literatura	4
1. Tomate de cáscara	4
1.1. Clasificación	4
1.2. Características de la planta	4
1.3. Crecimiento y floración	5
1.4. Fructificación	7
1.5. Cultivares	7
2. Técnicas de producción de haploides	9
2.1. Producción de haploides <i>in vivo</i>	10
2.2. Producción de haploides <i>in vitro</i>	10
3. Importancia y aplicaciones de los haploides	16
4. Cultivo de anteras	20
4.1. Cultivo de anteras en la familia <i>Solanaceae</i>	21
4.2. Factores que afectan la frecuencia de androgénesis	25
4.2.1. Genotipo de la planta donadora	26
4.2.2. Estado fisiológico de la planta donadora	27
4.2.3. Etapa de desarrollo de las microsporas	29
4.2.4. Pretratamiento de las anteras	32
4.2.5. Medio de cultivo	35
4.2.6. Ambiente de incubación	42
4.3. Ploidía de las plantas obtenidas	45
II. Metodología	47
II.1. Material biológico	47
II.2. Medios de cultivo	47
II.3. Establecimiento de la metodología básica	50
II.4. Aplicación de los tratamientos	52
II.5. Análisis citogenético del material vegetal obtenido	54
II.6. Aclimatación del material vegetal	55
II.7. Análisis estadístico	56

III. Resultados y discusión	57
III.1. Determinación del tamaño del botón floral	57
III.2. Oscurecimiento de las anteras	57
III.2.1. Efecto de la composición del medio sobre el oscurecimiento de las anteras	60
III.2.1.a. Oscurecimiento de las anteras en medio sólido	60
III.2.1.b. Oscurecimiento de las anteras en medio líquido	61
III.2.2. Efecto del tipo de agar sobre el oscurecimiento de las anteras	63
III.2.3 Efecto de la concentración de sacarosa sobre el oscurecimiento de las anteras	64
III.2.4. Efecto de la obscuridad sobre el oscurecimiento de las anteras	65
III.2.5. Efecto del carbón, caseína, aminoácidos y tratamiento en frío, sobre el oscurecimiento de las anteras	66
III.3. Respuesta de las anteras <i>in vitro</i>	66
III.3.1. Formación de callo en las anteras	67
III.3.2. Androgénesis de las anteras	72
III.4. Análisis citogenético de las plantas obtenidas	78
III.5. Aclimatación de las plantas obtenidas	78
III.6. Metodología para el cultivo de anteras en tomate de cáscara	80
Conclusiones	83
Bibliografía	84
Apéndice	99

INDICE DE CUADROS

Cuadro	Título	Pág.
1	Comparación de características entre 2 variedades de tomate de cáscara.	8
2	Especies de la familia <i>Solanaceae</i> en las cuales se ha obtenido callo, embriones o plantas a partir del cultivo de anteras y/o polen	22
3	Tratamientos en frío de botones florales de diferentes especies	33
4	Concentraciones de sacarosa, empleadas en el cultivo de anteras de varias especies	38
5	Composición (Macro y micronutrientes) de los medios de cultivo utilizados para el cultivo de anteras de tomate de cáscara	48
6	Influencia de la composición del medio de cultivo y del agente gelificante sobre el oscurecimiento de anteras de tomate cultivadas <i>in vitro</i>	61
7	Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el oscurecimiento de anteras de tomate de cáscara cultivadas en medio líquido	62
8	Efecto de la concentración de sacarosa sobre el oscurecimiento de anteras de tomate de cáscara cultivadas <i>in vitro</i>	65
9	Respuesta de las anteras de tomate de cáscara en el medio N6 bajo diferentes concentraciones de hormonas	68
10	Respuesta del callo de tomate de cáscara en el medio N6 con diferentes concentraciones de hormonas	73

CUADROS DEL APENDICE

Cuadro	Título	Pág.
1A	Análisis de varianza para la variable número de anteras oscurecidas, en medios de cultivo sólidos, con 2 tipos de agar	100
2A	Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios sólidos utilizados	100
3A	Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios de cultivo, para cada marca de agar	101
4A	Análisis de varianza para la variable número de anteras oscurecidas, en medios líquidos con y sin agitación	101
5A	Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios líquidos utilizados	102
6A	Análisis de varianza para la variable número de anteras oscurecidas, en medios sólidos con diferentes concentraciones de sacarosa	102
7A	Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios con diferentes concentraciones de sacarosa	103
8A	Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en diferentes concentraciones de sacarosa	103
9A	Nombres comunes y científicos de las plantas mencionadas en el texto	104

INDICE DE FIGURAS

Figura	Título	Pág.
1	Formación de plantas haploides a través del cultivo de anteras y polen aislado	14
2	Diferentes grados de oscurecimiento en anteras de tomate cultivadas <i>in vitro</i>	58
3	Aspecto de anteras de tomate, después de varias semanas en cultivo	58
4	Anteras con formación de callo, cultivadas en medio sólido	70
5	Antera con formación de callo, cultivada en medio líquido	70
6	Brotes iniciándose del callo. Medio N6 con BA a 1.0 mg/L	71
7	Formación de brotes múltiples en el Medio N6 con BA a 1.0 mg/L	71
8	Androgénesis en una antera de tomate de cáscara. Medio N6 con AIA 0.02 mg/L	74
9	Formación de una planta de tomate de cáscara a partir de una antera cultivada <i>in vitro</i> . Medio N6 con AIA 0.06 mg/L	74
10	Brotación de embriones en una antera de tomate. Medio N6 con AIA 0.06 mg/L	76
11	Planta mixoploide de tomate de cáscara, obtenida por androgénesis de las anteras	76
12	Hoja de una planta mixoploide obtenida <i>in vitro</i>	77
13	Planta de tomate de cáscara en proceso de aclimatación	77

14	Células de ápices de raíces de tomate de cáscara mostrando (a) 12, (b) 24, (c) 24, 36 y (d) 48 cromosomas	79
15	Metodología establecida para el cultivo de anteras de tomate de cáscara, cultivar Rendidora	81
16	Planta diploide de tomate de cáscara, obtenida mediante el cultivo <i>in vitro</i> de las anteras	82
17	Planta diploide de tomate de cáscara, de 7 semanas de edad	82

RESUMEN

Con el fin de explorar la posibilidad de obtener plantas haploides, las cuales después de ser duplicado su número de cromosomas pueden ser utilizadas para producir líneas puras en corto tiempo, se estableció una metodología básica para el cultivo *in vitro* de anteras de tomate de cáscara. Se probaron 3 medios de cultivo MS, N6 y NN tanto sólidos como líquidos; 2 tipos de agar, agar agar y Gelgro; sacarosa 1, 3, 6, 12 y 15%; carbón activado 0.5%; hidrolizado de caseína 500 mg/L; glutamina, serina y prolina 100 mg/L; así como diferentes concentraciones de auxinas y citocininas.

Las principales respuestas de las anteras en cultivo fueron el oscurecimiento del tejido, la formación de callo y la androgénesis (inducción, desarrollo y crecimiento de embriones a partir de las microsporas). La formación de plantas fue posible después de 6 semanas en el medio N6 con vitaminas, myo-inositol 100 mg/L, sacarosa 3%, gelgro 0.4% y ácido indolacético 0.06 mg/L. La tasa de respuesta fue del 7.6% y las plantas obtenidas fueron diploides ($2n = 24$) y mixoploides ($n = 12$, $2n = 24$, $3n = 36$ y $4n = 48$).

INTRODUCCIÓN

El cultivo de tejidos vegetales es el conjunto de técnicas utilizadas para el crecimiento o mantenimiento de células vegetales, tejidos, órganos o plantas completas en un medio de cultivo definido y bajo un ambiente artificial controlado.

Durante los últimos años, en dichas técnicas se ha tenido un desarrollo importante, que se traduce en posibilidades para la solución de problemas agrícolas y hortícolas y para su explotación comercial. De esta forma, sus principales aplicaciones han sido la micropropagación, preservación de germoplasma, mejoramiento genético, producción de metabolitos e investigación básica, entre otras.

Dentro del mejoramiento genético a través del cultivo de tejidos vegetales, el cultivo de anteras es una técnica cuyo objetivo principal es la obtención de plantas haploides y diploides homocigotas, las cuales representan un material valioso para el fitomejoramiento, y son una herramienta útil para la investigación genética.

Empleando los métodos convencionales de entrecruzamiento y retrocruzamiento es posible obtener líneas puras; sin embargo, es un proceso que implica demasiado tiempo; por ejemplo, se necesitan de 8 a 10 años para obtener una variedad por el método de hibridación en un cultivo anual. Mediante el cultivo de anteras, los haploides y consecuentemente los diploides homocigotos, pueden obtenerse en un lapso relativamente corto; es posible producir líneas puras en una o dos generaciones empleando haploides.

Las plantas haploides poseen sólo un conjunto de cromosomas y son estériles, no obstante, mediante la duplicación de su número cromosómico (p. ej. mediante la aplicación de colchicina en las etapas tempranas del desarrollo) serán fértiles e isogénicas, es decir, todos sus loci serán homocigotos, produciendo una descendencia uniforme, ya que ninguno de los genes estará enmascarado por un alelo dominante.

Los diploides homocigotos fértiles pueden emplearse para producir líneas puras que se requieran para utilizar el vigor híbrido, al cruzarlas entre sí. Debido a que los factores genéticos están representados por un alelo, los cambios inducidos se hacen evidentes desde la primera generación. Las plantas homocigotas ofrecen las ventajas de mostrar una meiosis normal y no perder las características deseables durante la segregación (Bajaj, 1990).

Otra ventaja de las plantas haploides es que permiten el estudio genético preciso, ya que es posible identificar directamente las mutaciones inducidas.

El cultivo de anteras ha sido reportado en muchas especies, principalmente en las solanáceas y las gramíneas, como es natural, los esfuerzos se han encaminado hacia el fitomejoramiento más que hacia la investigación genética. Además de haploides, es común obtener plantas con ploidía mayor en el cultivo de anteras (Sunderland y Dunwell, 1977).

Dentro de este marco de referencia, en el presente trabajo se establece la necesidad de estudiar el cultivo *in vitro* de anteras de una planta mexicana de importancia económica y culinaria: el

tomate de cáscara (*Physalis ixocarpa* Brot.). De tomate se cosechan en México alrededor de 23,000 ha al año, siendo uno de los 10 cultivos hortícolas más importantes en cuanto a superficie cultivada. El cultivo tiene pocos problemas sanitarios, presenta una rentabilidad estable e involucra costos bajos; los principales estados productores son Guanajuato, Puebla, Morelos, Hidalgo, Jalisco, Michoacán y México.

El tomate de cáscara es una planta alógama obligada, lo cual ha dificultado por mucho tiempo su mejoramiento por métodos tradicionales (Peña y Márquez, 1990) y en consecuencia, se presenta una gran variabilidad genética en cuanto a tipos de planta y fruto. Se encuentran plantas rastreras, semirastreras o erectas, colores de fruto que van del amarillo al verde, hasta el morado, con rendimientos promedio desde 15 hasta 40 ton/ha.

De lo expuesto anteriormente, en el presente trabajo se plantean los OBJETIVOS siguientes:

- a) Generar una metodología para el cultivo *in vitro* de anteras en tomate de cáscara.
- b) Analizar el nivel de ploidía de las plántulas obtenidas.
- c) Adaptar el material que se obtenga, a las condiciones de invernadero.

La HIPOTESIS sometida a prueba es la siguiente:

El cultivo *in vitro* de anteras de tomate de cáscara permite obtener plantas con diferentes niveles de ploidía.

I. REVISIÓN DE LITERATURA

1. Tomate de Cáscara

1.1. Clasificación. (García, 1975)

Reino	Vegetal
Subreino	Plantas
División	<i>Spermathophyta</i>
Clase	<i>Angiospermae</i>
Subclase	<i>Dicotiledoneae</i>
Orden	Polemoniales
Familia	<i>Solanaceae</i>
Tribu	<i>Solaneae</i>
Género	<i>Physalis</i>
Especie	<i>ixocarpa</i>

1.2. Características de la planta

Según García (1975), la especie *Physalis ixocarpa* Brot. corresponde o es sinónimo de las especies *P. aequata* Jacq. y *P. philadelphica* Lam. De esta forma, la planta se describe de la siguiente manera: Herbácea de 15 a 60 cm de altura, anual; glabra o en ocasiones con pelos esparcidos; hojas ovadas de 2 a 8.2 cm de largo por 1 a 6 cm de ancho. Base atenuada, ápice agudo con márgenes irregularmente dentados, con 2 a 6 dientes en cada lado; peciolo de 0.4 a 6.5 cm de largo; pedicelo de 0.7 a 1 cm de largo; lóbulos del cáliz de forma ovada, de 0.7 a 1.3 cm de largo, hirsutos; corola de 0.8 a 2.3 cm de diámetro, amarilla, puede presentar

manchas de color azul verdoso que no contrastan; anteras azules o azul verde, de 0.2 a 0.35 cm de largo, generalmente retorcidas después de la dehiscencia. Cáliz del fruto de 1.8 a 4.3 cm de largo por 2.5 a 6 cm de ancho, con 10 costillas, baya de 1.6 a 6 cm de diámetro; pedicelos de 0.6 a 1 cm de largo en la fructificación.

Se distribuye en el Valle de México, localizándose hacia el Centro y Sur. Habita en encinares abiertos, pastizales, a orillas de charcos, canales y campos de cultivo; en zonas urbanas es común entre los 2220 y 2750 msnm. Fuera del Valle, esta especie se distribuye desde el Este y Sur de los Estados Unidos, hasta Costa Rica, Haití, Jamaica y Cuba.

En cuanto al número de especies del género *Physalis*, no se cuenta con el dato exacto, sin embargo se cree que varía entre 45 y 140. El número somático de cromosomas para el tomate de cáscara es de $2n = 24$.

1.3. Crecimiento y Floración

Bajo las condiciones de clima y suelo del estado de Morelos, el tomate tiene un ciclo de vida de 85 a 90 días de la siembra a la senectud. Luego de la germinación el crecimiento es lento, alrededor de 1 cm por día; a los 24 días se acelera, terminándose a los 55, que es cuando alcanza una altura de 90 cm. Después, la planta sigue creciendo lentamente hasta alcanzar poco más de 1 m, lo que sucede a los 70 días; posteriormente la planta envejece rápidamente.

La diferenciación de las yemas florales se inicia entre los 17 y 20 días posteriores a la siembra; la aparición de las primeras flores ocurre a los 28 ó 30 días y la planta continúa floreciendo hasta que muere. Las flores abren antes que las anteras tengan dehiscencia, entre las 8 y 12 horas del día; los lóbulos se hinchan considerablemente antes de abrir el botón floral.

Poco antes de la dehiscencia de las anteras, lo cual ocurre de la punta a la base, los filamentos se elongan hasta llegar cerca del estigma y las paredes de las anteras se enroscan hacia atrás para liberar el polen. Las anteras de color amarillo o blanco no abren uniformemente sino que duran de 2 a 4 días entre la dehiscencia de la primera a la quinta antera.

Entre el tercero y sexto día después del cierre de las anteras, la corola, los estambres, el estilo y el estigma se encorvan; se marchitan y caen; posteriormente el ovario y el cáliz se elongan; este último envuelve al fruto joven y crece a su máximo antes de que éste madure. (Saray, 1977).

A pesar de que el tomate de cáscara posee flores hermafroditas, presenta una autoincompatibilidad gametofítica, determinada por dos loci independientes con alelos múltiples (Pandey, 1957), por lo que se clasifica como planta alógama obligada.

1.4. Fructificación

El cuajado de los frutos se inicia a los 35 días después de la siembra y a los 42 la formación del cascabel. Del cuajado de los frutos a la maduración transcurren de 20 a 22 días. Del total de flores que tiene una planta, sólo el 40 % son fecundadas, de éstas, un 30 % aproximadamente llegan a cosecharse en su madurez (Saray, 1977).

1.5. Cultivares

El tomate presenta una gran variabilidad genética en cuanto a tipos de planta y fruto. Se encuentran plantas rastreras, semirastreras o erectas, con colores de fruto que van del amarillo al verde en tonalidades distintas, hasta el morado.

Entre los cultivares más conocidos están el Rendidora, Tamazula, Salamanca, Nova, Zamex, Estrella y Milperos. El primero supera en más del 20 % en rendimiento comercial y total a los materiales criollos que generalmente producen frutos pequeños y de color amarillo, presentan una gran diversidad en cuanto a sus características y tienen un rendimiento promedio por hectárea menor de 15 toneladas (Cuadro 1).

Cuadro 1. Comparación de características entre 2 variedades de tomate de cáscara (INIA, 1981).

Característica	Variedad	
	Rendidora	Criolla
Tamaño del fruto	Grande	Chico
Color de los frutos	Verde	Amarillo
Días al primer corte	75	90
Días al último corte	133	133
No. de cortes	9	7
Producción (ton/ha)	40	22

El cultivar Rendidora tiene mezclados diferentes hábitos de crecimiento (erecto, rastrero e intermedio). Un 35% de sus frutos son grandes (mayores de 4.5 cm de diámetro); aproximadamente un 85% de la producción corresponde a frutos que llenan completamente el cáliz; son agridulces y de color verde limón; presentan buena firmeza, y comienzan a madurar 60 a 65 días después del trasplante (Saray, 1977).

2. Técnicas de Producción de Haploides

Los haploides se conocen desde 1922, cuando Blakeslee *et al* (citados en Bajaj, 1983) reportaron la ocurrencia natural de plantas haploides en estramonio (*Datura stramonium*). Posteriormente fueron detectadas en muchas otras especies, pero a frecuencias muy bajas.

En los 50's, Tulecke demostró que los granos maduros del polen de *Ginkgo biloba* podían cambiar su desarrollo normal para formar callo, si se cultivaban en un medio apropiado. En 1964, Guha y Maheshwari lograron inducir accidentalmente embriones haploides del polen de toloache (*Datura innoxia*), al cultivar sus anteras durante un estudio de meiosis *in vitro*. A partir de este hallazgo, se estimuló notablemente el interés por la inducción experimental de haploides, especialmente en el área de la androgénesis in vitro (inducción, iniciación y desarrollo de embriones a partir de células haploides) (Sunderland y Dunwell, 1977).

Los haploides pueden ocurrir de manera espontánea en la naturaleza o ser inducidos experimentalmente. Los primeros se originan como resultado de partenogénesis o apomixis. En tales casos, el huevo no fertilizado, el esperma o las sinérgidas, empiezan a crecer para formar una planta haploide, independientemente de cualquier estímulo experimental (Bajaj, 1983).

2.1. Producción de haploides *in vivo*

Los embriones haploides pueden ser producidos *in vivo* por polinización demorada, polinización con polen irradiado, polinización con polen abortivo o extraño y choques de temperatura; en la mayoría de los casos la frecuencia de inducción de haploides es baja (Bajaj, 1983).

El desarrollo de haploides *in vivo* se lleva a cabo dentro del ovario y se asume que son originados de algún componente del saco embrionario.

En algodón (*Gossypium* spp.), se usa la semigamia como un método eficiente para producir plantas haploides. Cuando los híbridos de *Gossypium hirsutum* x *G. barbadense*, son cruzados como progenitores macho con una línea virulenta semigamética, se obtienen quimeras con follaje virulento (hembra) y verde (macho). Cuando los sectores verdes haploides son tratados con colchicina, pueden formar semillas homodiploides (Chu, 1982).

2.2. Producción de haploides *in vitro*

Los haploides pueden regenerarse a partir de células gametofíticas masculinas o femeninas, a través del cultivo de anteras, microsporas y polen, así como ovarios y óvulos. En cebada y trigo la eliminación de cromosomas mediante el cultivo de embriones jóvenes es una técnica empleada con éxito para obtener plantas haploides.

CULTIVO DE ANTERAS

El cultivo de anteras es una de las técnicas más sencillas para la inducción de androgénesis *in vitro*. Ha sido empleada para obtener callo, embriones y plantas derivadas de las microsporas en gran número de especies. Una modificación de la técnica involucra el cultivo de la inflorescencia bajo condiciones que permitan la proliferación de las microsporas en callo o embriones; lo anterior es de gran utilidad en los casos donde el tamaño pequeño de las anteras hace su disección técnicamente difícil.

Aunque el cultivo de anteras ha probado ser eficiente para la inducción de haploides, tiene una desventaja notable, las plantas no sólo pueden originarse de las microsporas sino también de varias otras partes de la antera, dando como resultado una población de plantas con varios niveles de ploidía (Bajaj, 1983).

CULTIVO DE MICROSPORAS Y/O POLEN

La producción de haploides a través del cultivo de microsporas (polen inmaduro) o polen, puede lograrse al cambiar el desarrollo de éstos, de tal forma que se comporten como células somáticas en lugar de madurar, formando estructuras haploides (embriones). Esta técnica presenta ciertas ventajas en relación con el cultivo de anteras: (1) se evita la interferencia de la pared de la antera o de otro tejido somático en la inducción de callo o plántulas; (2) puede obtenerse gran cantidad de plantas haploides a partir de pocas anteras; (3) la secuencia de androgénesis puede observarse a partir

de una sola célula, por lo tanto se tiene un sistema ideal para estudiar la fisiología y bioquímica de la embriogénesis.

El cultivo de microsporas normalmente involucra la flotación de las anteras en un medio líquido, seguido de la dehiscencia y liberación de éstas, que continúan su desarrollo como callo o embriones. Esta técnica se ha adaptado con éxito en tabaco, cebada y trigo. Las microsporas también pueden aislarse mecánicamente de anteras frescas o pretratadas (precultivadas). En el primer caso se ha logrado tener éxito en pocas especies, entre ellas tabaco, cebada, tabaco macuche y colza (Keller *et al*, 1987).

Mediante el cultivo de granos de polen se ha logrado obtener plantas en toloache, tabaco, papa, petunia, berenjena, arroz, beleño y belladona (Chu, 1982). En toloache se ha mejorado considerablemente la eficiencia de la androgénesis al tratar los granos de polen a 4° C por 48 h y cultivarlos en medio líquido; así como al cultivar el polen en un medio suplementado con extracto acuoso de anteras que previamente mostraron androgénesis (Nitsch y Norreel, 1973; citados en Bajaj, 1983).

Parece ser que la pared de la antera desempeña un papel crítico durante las etapas tempranas del desarrollo, ya que en la mayoría de las especies en las cuales se ha ensayado el cultivo de polen (exceptuando petunia y papa), sólo aquellos granos derivados de anteras precultivadas por 4-6 días pudieron desarrollarse en embriones (Chu, 1982), es decir, el éxito de esta técnica ha sido limitado sin el paso intermedio del cultivo de anteras (Fig. 1).

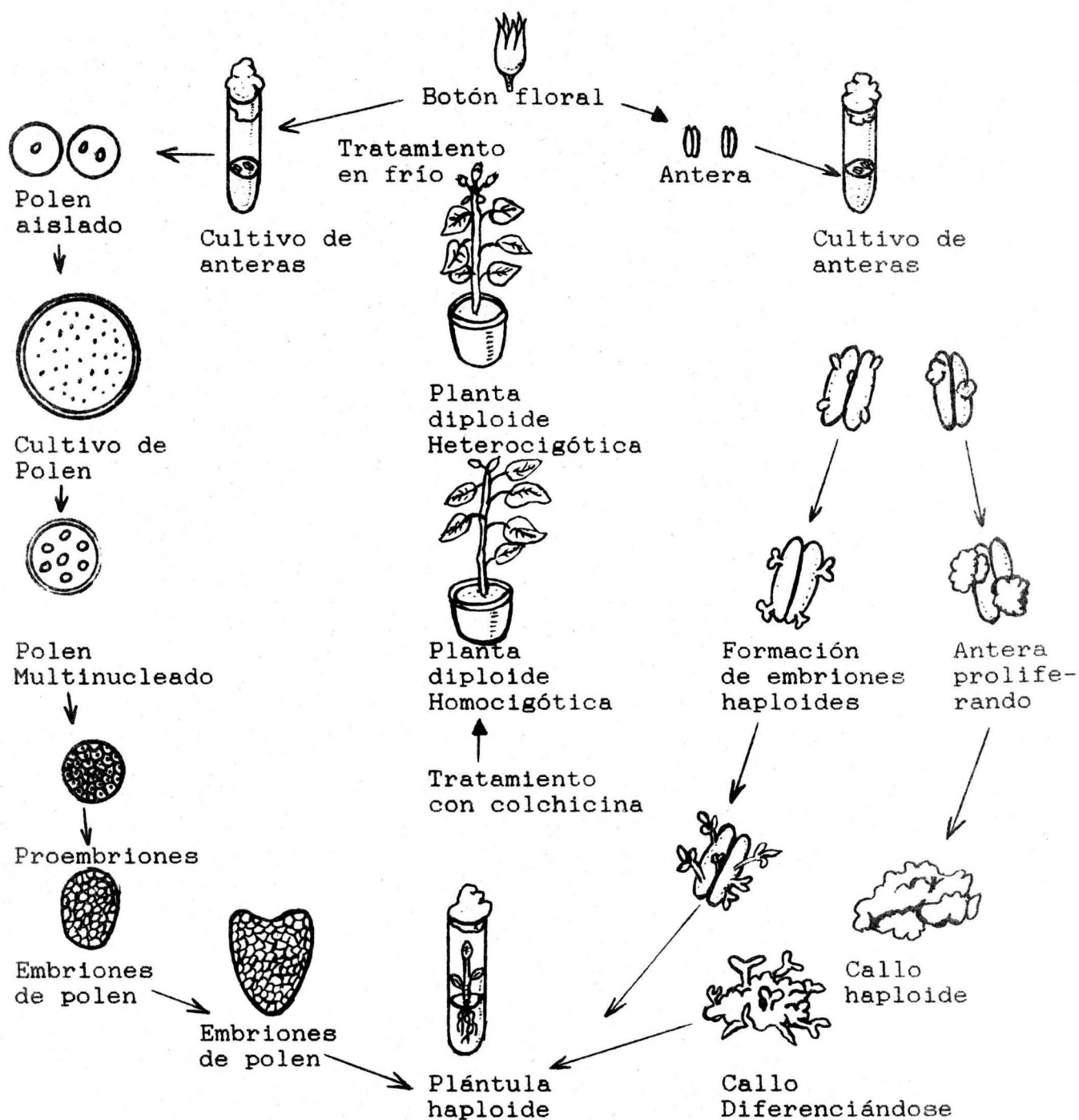


Fig. 1. Formación de plantas haploides a través del cultivo de anteras y polen aislado (Tomado de Bajaj, 1983).

CULTIVO DE OVARIOS Y ÓVULOS

La formación de embriones haploides o plantas producidas de gametofitos femeninos cultivados *in vitro*, ha sido reportada en un buen número de angiospermas. Se ha logrado inducir plantas haploides a partir de ovarios no fertilizados en arroz, maíz, remolacha, girasol, álamo, cebada, tabaco, trigo, gerbera, petunia y vid (Chu, 1982; Keller *et al*, 1987; Bajaj, 1990).

Estudios histológicos han demostrado que los haploides se originan de los elementos del saco embrionario, específicamente de la célula huevo y las sinérgidas, normalmente por partenogénesis (Keller *et al*, 1987).

Las plantas haploides inducidas por ginogénesis pueden obtenerse directamente sobre un medio con bajos niveles de auxinas o ser regeneradas del callo, después de transferirlo a un medio de diferenciación.

La principal desventaja del cultivo de ovarios es que está limitada a un saco embrionario por siembra. Aún si todas las células haploides pudieran formar callo o embriones, el rendimiento total sería bajo en comparación al número potencial que puede obtenerse del cultivo de anteras o microsporas. La respuesta *in vitro* de los cultivos de ovarios u óvulos es menor del 15%, porcentaje que no es significativamente diferente de la respuesta que puede lograrse en el cultivo de anteras (Keller *et al*, 1987).

ELIMINACIÓN DE CROMOSOMAS

En cebada la eliminación de cromosomas ha probado ser un método eficiente para la producción en gran escala de plantas haploides (Kasha y Kao, 1970; citados en Bajaj, 1983).

La técnica involucra la cruce de cebada ($2n=14$) con cebada bulbosa ($2n=14$). La semilla que se obtiene se desarrolla normalmente por 10 días y después empieza a abortar. Si los embriones inmaduros son disectados 2 semanas después de la polinización y son cultivados en el medio B5, continúan creciendo y la gran mayoría de las plantas resultan ser monoploides ($n=7$).

Esta técnica también se ha empleado para obtener trigo monoploide mediante la cruce de trigo ($2n=6x=42$) con cebada bulbosa ($2n=2x=14$); algunos cromosomas de cebada bulbosa son eliminados en el proceso y el trigo monoploide ($n=3x=21$) es obtenido (Barclay, 1975; citado en Bajaj, 1983).

La eliminación de cromosomas tiene ciertas ventajas sobre el cultivo de anteras para la producción de haploides en cebada, ya que pueden obtenerse en cualquier cultivar, mientras el cultivo de anteras depende del genotipo. Usando la cruce con cebada bulbosa, seguida del rescate de embriones, la formación de haploides es considerablemente alta y casi no se obtienen plantas con diferente ploidía (Bajaj, 1983).

3. Importancia y Aplicaciones de los Haploides

Las técnicas de producción de haploides pueden involucrarse en buen número de aplicaciones, entre las que destacan el mejoramiento genético, el aislamiento de mutantes, estudios sobre embriogénesis, genética cuantitativa e hibridación de especies distantes.

Los métodos convencionales de mejoramiento son laboriosos y consumen mucho tiempo, siendo a veces ineficientes. La producción de haploides tiene un potencial considerable en la obtención de nuevas variedades de plantas, siendo la principal ventaja de la producción *in vitro*, sobre los métodos convencionales de mejoramiento, el ahorro de tiempo. Mediante el cultivo de anteras y polen, las plantas homocigotas y posteriormente las líneas isogénicas pueden producirse en un año en especies autóгамas, a comparación del método de autofecundación que implica de 4 a 6 años (Bajaj, 1983). En especies alógamas, los haploides doblados también pueden utilizarse con éxito en la producción de híbridos.

Basándose en el método de cultivo de anteras, se han logrado producir numerosas líneas e híbridos. En trigo se han obtenido cerca de 82 líneas mientras que en arroz han sido 81, tan sólo en China. Las plantas homocigotas, obtenidas a través del cultivo de anteras, han permitido seleccionar líneas endogámicas de *N. tabacum* con altos contenidos de alcaloides así como una variedad F211 resistente a la marchitez bacteriana (Bajaj, 1990). En brócoli, los híbridos producidos a través de cruza de haploides doblados fueron superiores en muchas características, a los híbridos comerciales disponibles, que

fueron desarrollados a través de métodos convencionales (Keller *et al*, 1987).

El uso de haploides doblados ha permitido liberar nuevas variedades de arroz, *Guan18* (Deyao y Xigan, 1990) y *Huayu 15* (Shouyi y Shouyin, 1991); espárrago, *Andrés* (Doré, 1990); maíz, *Huayu 1* (Genovesi, 1990) y trigo, *Florin* (Picard *et al*, 1990) y *An. Cul. 28* (Youliang *et al*, 1991).

Aunque se ha logrado un progreso considerable, la principal dificultad es aún la baja frecuencia de haploides producidos *in vitro*. Aún existen pocas especies en las que la producción de haploides ocurra a frecuencias que permitan el uso constante de la técnica en los estudios sobre obtención de nuevas variedades, entre éstas están arroz, cebada, trigo, maíz, papa, tabaco y coliflor (Keller *et al*, 1987).

En el área de mutagénesis inducida (por radiación o a través de compuestos químicos) los cultivos celulares haploides son de enorme utilidad. Debido a la condición haploide del cultivo, las mutaciones inducidas son expresadas inmediatamente, a diferencia de un tejido diploide en el cual una mutación puede quedar enmascarada en un gen recesivo. Una ventaja adicional es que los mutantes pueden ser fácilmente diploidizados para formar diploides homocigotos.

Técnicamente es posible recuperar los mutantes obtenidos en células, protoplastos y callo haploides. De esta forma se han producido líneas celulares, tejidos y plantas completas resistentes a bajas temperaturas, a la estreptomycin, 5-bromodeoxiuridina, sulfoximina metionina y al nemátodo enquistado de la papa (Bajaj, 1983).

En algunos casos la variabilidad existente en la población de células es suficiente para realizar cierta selección. A partir de callo haploide de petunia y tabaco se han aislado líneas celulares resistentes a la estreptomycin y a la 5-bromodeoxiuridina, sin utilizar ningún tratamiento mutagénico. La resistencia de las células al antibiótico se logró incluyendo suficiente cantidad de éste en el medio de cultivo, como para permitir un crecimiento limitado. El análisis de las plantas regeneradas a partir de las líneas resistentes, demostró que la resistencia era heredada en forma Mendeliana (Sunderland y Dunwell, 1977).

Los cultivos celulares haploides tienen la ventaja sobre las plantas enteras de poder ser sembrados y analizados en gran número sin consumir muchos recursos. No obstante, el éxito de esta técnica depende de lograr una frecuencia de embriogénesis o formación de callo lo suficientemente alta; en la práctica la técnica está confinada sólo a aquellas especies en las que las células haploides cultivadas puedan retener su haploidía y permitan regenerar fácilmente plantas.

Otras aplicaciones menos exploradas de los haploides, pero con no menos potencial que las ya citadas, son las siguientes: (1) producción de translocaciones genéticas, adición y sustitución de líneas a través del cultivo de anteras de híbridos interespecíficos e intergenéricos; en la actualidad estas técnicas están en estudio y son empleadas en los híbridos de trigo x triticales (Chu, 1982; Keller et al, 1987), (2) el uso de haploides doblados, que permite detectar interacciones y ligamientos de genes, y estimar varianzas genéticas, y el número de genes que afectan caracteres cuantitativos (Dunwell,

1985), (3) los cultivos de microsporas aisladas, que se utilizan para la microinyección intranuclear de plásmidos; asimismo, pueden ser efectivas en el cocultivo y electroporación de genes, facilitando en gran medida la transferencia de genes en cereales (Keller *et al*, 1987).

Por último, el cultivo de microsporas provee un excelente material para el estudio del desarrollo de la célula vegetal. Debido a que cada embrión se forma a partir de una sola célula, esta técnica permite realizar fácilmente estudios bioquímicos y moleculares de la embriogénesis (Dunwell, 1985).

4. Cultivo de anteras

En 1964 Guha y Maheshwari descubrieron que el polen de una angiosperma, el toloache, podía modificarse en su crecimiento normal, hasta la formación de embriones, por el simple hecho de cultivarlo intacto dentro de la antera. Desde entonces, mediante el cultivo dentro de la antera (y en algunos casos, después de aislarlo de ésta), el polen de muchas otras angiospermas se ha modificado de su desarrollo normal hacia la formación de plantas, ya sea directamente vía embriogénesis (androgénesis) o indirectamente vía callo.

La técnica del cultivo de anteras *in vitro* es relativamente simple, rápida y eficiente (véase Fig. 1 y sección de Metodología). Por ello, en el lapso de 3 décadas la manipulación experimental de anteras se ha realizado en cerca de 200 especies e híbridos y al menos en 111 de ellas se han obtenido plantas completas a partir de polen (Chu, 1982; Bajaj, 1983). La mayoría de las especies estudiadas pertenecen a las familias *Solanaceae*, *Gramineae* y *Cruciferae* y algunas otras son especies económicamente importantes, como la caña de azúcar, caucho, cítricos, vid y álamo.

A pesar del gran número de especies estudiadas, la investigación activa y sostenida en el desarrollo del cultivo de anteras ha sido limitada sólo a ciertas especies: tabaco, daturas, cebada, trigo, triticale, arroz, maíz, papa y colza. A nivel de familia, en solanáceas y crucíferas, de manera general los embriones se

producen directamente, mientras que en gramíneas la regeneración con frecuencia sigue al subcultivo de un callo (Dunwell, 1985).

4.1. Cultivo de anteras en la familia *Solanaceae*

Dentro de las solanáceas, se ha trabajado con anteras en cerca de 60 especies (Cuadro 2), encontrándose respuestas diferentes entre géneros, entre especies del mismo género y aún entre diferentes cultivares de una misma especie (Sunderland y Dunwell, 1977).

Los miembros de los géneros *Datura*, *Nicotiana* y *Hyoscyamus* responden con relativa facilidad al cultivo *in vitro*, por lo que han permitido el estudio detallado a nivel citológico, ultraestructural y bioquímico de los eventos tempranos de la embriogénesis (Keller *et al*, 1987).

Cuadro 2. Especies de la familia *Solanaceae* en las que se ha obtenido callo (C), embriones (E) o plantas (P) a partir del cultivo de anteras y/o polen.

Especie	Tipo de Respuesta	Referencia
<i>Atropa belladonna</i>	C, E, P	Zenkteler, 1971
<i>Capsicum annum</i>	C, E, P	Kuo et al, 1973; Vagera, 1990
<i>C. annum x C. chinense</i>	C	Morrison et al, 1986
<i>C. frutescens</i>	C	Novák, 1974
<i>Datura innoxia</i>	C, E, P	Guha y Maheshwari, 1964
<i>D. metel</i>	E	Narayanaswamy y Chandy, 1971
<i>D. meteloides</i>	C, E, P	Kohlenback y Geier, 1972
<i>D. muricata</i>	E	Nitsch, 1972
<i>D. stramonium</i>	E	Guha y Maheshwari, 1967
<i>D. wrightii</i>	E	Kohlenback y Geier, 1972
<i>Hyoscyamus albus</i>	E, P	Raghavan, 1975
<i>Hyoscyamus muticus</i>	E, P	Wernicke et al, 1979
<i>H. niger</i>	E, P	Raghavan, 1975
<i>H. pusillus</i>	E, P	Raghavan, 1975
<i>Lycium halimifolium</i>	E	Zenkteler, 1972
<i>Lycopersicon esculentum</i>	C	Sharp et al, 1971
<i>L. esculentum x</i>		
<i>L. peruvianum</i>	C, E	Cappadocia y Ramulu, 1980
<i>L. pimpinellifolium</i>	E	Debergh y Nitsch, 1973
<i>Nicotiana affinis</i>	E, P	Nitsch y Nitsch, 1969
<i>N. alata</i>	E	Nitsch, 1969

Continúa

Continuación Cuadro 2.

Especie	Tipo de Respuesta	Referencia
<i>N. attenuata</i>	E	Collins y Sunderland, 1974
<i>N. clevelandii</i>	E	Vyskot y Novak, 1974
<i>N. glauca</i> x <i>N. langsdorfii</i>	C	Smith, 1974
<i>N. glutinosa</i>	E	Nitsch, 1969
<i>N. knightiana</i>	E	Collins y Sunderland, 1974
<i>N. langsdorfii</i>	E	Durr y Fleck, 1980
<i>N. otophora</i>	E	Collins et al, 1972
<i>N. paniculata</i>	C	Nakamura et al, 1974
<i>N. plumbaginifolia</i>	E, P	Tran Tan Van y Trinh, 1980
<i>N. raimondii</i>	E	Collins y Sunderland, 1974
<i>N. rustica</i>	E	Nitsch y Nitsch, 1969
<i>N. sanderae</i>	E	Vyskot y Novak, 1974
<i>N. suaveolens</i>	C	Smith, 1974
<i>N. suaveolens</i> x <i>N. langsdorfii</i>	C	Guo, 1972
<i>N. sylvestris</i>	C, E, P	Bourgin y Nitsch, 1967
<i>N. tabacum</i>	C, E, P	Nitsch y Nitsch, 1969
<i>Petunia axillaris</i>	C, P	Engvild, 1973
<i>P. hybrida</i>	C, P	Binding, 1972
<i>P. hybrida</i> x <i>P. axillaris</i>	C, P	Raquin y Pillet, 1972
<i>P. violacea</i>	C, P	Gupta, 1983
<i>Physalis ixocarpa</i>	E, P	Bapat y Wenzel, 1982
<i>Physalis minima</i>	E, P	George y Rao, 1979

C = Callo

E = Embriones

P = Plantas

Continúa

Continuación Cuadro 2.

Especie	Tipo de Respuesta	Referencia
<i>Scopolia carniolica</i>	E	Wernicke y Kohlenback, 1975
<i>S. lurida</i>	E	Wernicke y Kohlenback, 1975
<i>S. physaloides</i>	E	Wernicke y Kohlenback, 1975
<i>Solanum carolinense</i>	C	Reynolds, 1984
<i>S. chacoense</i>	C, E, P	Cappadocia et al, 1984
<i>S. dulcamara</i>	E	Zenkteler, 1973
<i>S. indicum</i>	C	David y Chinchani, 1980
<i>S. mammosum</i>	C	Anand y Govindappa, 1979
<i>S. melongena</i>	C, P	Raina e Iyer, 1973
<i>S. nigrum</i>	C, P	Harn, 1972
<i>S. phureja</i>	C	Matsubayashi y Kuranuki, 1975
<i>S. surattense</i>	C, E	Sinha et al, 1979
<i>S. torvum</i>	C, E	Jaiswal y Narayan, 1981
<i>S. tuberosum</i>	C, E, P	Dunwell y Sunderland, 1973
<i>S. tuberosum x</i>		
<i>S. chacoense</i>	C, P	Cappadocia et al, 1984
<i>S. verrucosum</i>	C, P	Weatherhead y Henshaw, 1979
<i>Withania somnifera</i>	C, P	Vishnoi et al, 1979

C= Callo

E= Embriones

P= Plantas

4.2. Factores que afectan la frecuencia de androgénesis

La androgénesis puede definirse como la inducción, iniciación y desarrollo de embriones a partir de células haploides. Aunque se ha logrado un progreso considerable en la inducción *in vitro* de embriones y plantas haploides, la principal dificultad en el cultivo de anteras y polen sigue siendo la baja frecuencia de plantas producidas en la mayoría de las especies estudiadas.

Los escasos incrementos en la producción de embriones y plantas se han obtenido mediante alteraciones lógicas de la técnica *in vitro* y no del estudio analítico de los mecanismos que controlan la androgénesis *in vivo* o de algún otro método que provea información general aplicable a varias especies.

Para propósitos prácticos y dada la limitación técnica que impone el uso de otros métodos, el estudio de los numerosos factores que influyen sobre la respuesta de las anteras en cultivo es la opción que ha permitido aumentar la frecuencia de producción de haploides. Sin embargo, los avances logrados han sido mínimos y a la fecha existen escasas recomendaciones definitivas aplicables de una investigación a otra. Lo anterior se debe a la gran cantidad de factores (tanto endógenos como exógenos) involucrados en la respuesta androgenética, las interacciones que pueden presentarse entre ellos y la diversidad de condiciones de cultivo.

4.2.1. Genotipo de la planta donadora

La habilidad del polen para formar embriones y plantas haploides depende de las diferencias genotípicas entre las plantas donadoras; la frecuencia de inducción de haploides varía con el género, especie y cultivares. El Cuadro 2 muestra claramente diferencias de la respuesta *in vitro* entre especies del mismo género (véase *Datura*, *Hyoscyamus*, *Nicotiana* y *Solanum*).

Gresshoff y Doy (1972) trabajando con 43 cultivares de jitomate, lograron inducir tejido haploide en sólo 3 de éstos. Tendencias similares se han observado en berro oreja de ratón, colza, arroz, trigo y muchas otras especies (Keller *et al*, 1987; Bajaj, 1983).

Se ha observado que la habilidad para mostrar proliferación de callo o embriogénesis es hereditaria y que es posible controlarla por genes nucleares (Keller *et al*, 1987). Algunas líneas derivadas de microsporas muestran mayor frecuencia de androgénesis que el control y ésta puede aumentarse aún más en los híbridos donde un progenitor sea una línea que tenga altos rendimientos de plantas haploides (Chu, 1982). Es probable que cada genotipo requiera condiciones de cultivo especiales para inducir tasas altas de embriogénesis.

4.2.2. Estado fisiológico de la planta donadora

Las condiciones fisiológicas de la planta donadora son importantes para propiciar una respuesta positiva de las anteras en cultivo. Tanto la luz (intensidad y duración) como la temperatura en las que crecen las plantas madre afectan el rendimiento de embriones en las anteras que se toman de éstas. Se ha reportado en ciertas especies variaciones estacionales en la respuesta de las anteras, principalmente papa, cebada y trigo.

Respecto al fotoperíodo, en tabaco cv. White Burley la frecuencia de embriogénesis en cultivo de anteras fue mayor cuando las plantas donadoras fueron cultivadas bajo días cortos e intensidad luminosa alta (14 Klx). Al disminuir la longitud del día, de 16 a 8 h, el rendimiento total de plántulas aumentó 5 veces, aumentando también el número de plántulas por antera (Sunderland y Dunwell, 1977). En forma similar respondió el cv. Badischer Burley, en el que la producción de haploides a partir del cultivo de polen fue mayor con plantas de día corto; en este caso la producción de haploides a partir de anteras cultivadas no fue influenciada por el fotoperíodo (Heberle-Bors y Reinert, 1979). La intensidad luminosa alta también es importante, en flor de nabo la respuesta de las anteras fue mayor al aumentar la intensidad luminosa recibida por las plantas donadoras (Keller *et al*, 1987).

La temperatura a la que crecen las plantas donadoras es crítica en la respuesta embriogénica de algunas especies. En colza se obtienen altas frecuencias de embriogénesis en microsporas derivadas de plantas creciendo en un ciclo de 10° C en el día/5° C en la noche, en comparación con otras temperaturas (Keller *et al*, 1987).

Las plantas de toloache que crecen a 24° C dan una mayor frecuencia de androgénesis (45%) que aquéllas expuestas a 17° C (8 %) (Bajaj, 1983), mientras que en Nicotiana knightiana el número de anteras que responde se duplica al incrementarse la temperatura de crecimiento de la planta de 14 a 20° C (Sunderland y Dunwell, 1977).

Los estudios sobre un ambiente en particular que favorezca el desarrollo de las anteras en cultivo son escasos, sólo se han estudiado algunos factores aisladamente sin considerar la interacción entre las variables luz, temperatura y genotipo del material usado.

Otro factor que afecta fuertemente la respuesta de las anteras es la edad de la planta donadora. Existe evidencia en diversas especies de que los botones, flores o espigas de plantas relativamente jóvenes (al inicio del período de floración) son más adecuados que aquellos tomados de plantas al final del período de crecimiento (Bajaj, 1983; Dodds y Roberts, 1985). En tabaco, Bajaj *et al* (1977) recomiendan coleccionar anteras del primer conjunto de flores de plantas creciendo en el verano. Por otra parte se observó que el vigor de las flores se retiene por mayor tiempo si las plantas donadoras son fertilizadas con la solución de Hoagland cada 2 meses.

En general puede decirse que es importante que las plantas utilizadas para el cultivo de anteras crezcan bajo condiciones óptimas, se fertilicen con regularidad y que las anteras se coleccionen de plantas relativamente jóvenes.

4.2.3. Etapa de desarrollo de las microsporas

Una de las variables determinantes para el éxito de la inducción de androgénesis *in vitro* es la etapa de desarrollo de las microsporas. En vista de la importancia crítica que representa su consideración, es necesario mencionar la estructura de la antera y el desarrollo del polen.

Un estambre típico de angiospermas comprende un filamento, tejido conectivo y una antera; el interior de esta última muestra dos lóculos y cada uno de éstos posee dos microsporangios o sacos polínicos.

Los sacos polínicos en las primeras etapas de desarrollo tienen un cordón central vertical (de una o varias células de grosor) de células madre de las microsporas, rodeado por una capa de tejido nutritivo especializado conocido como el tapete; que a su vez está rodeado por los tejidos que forman las paredes de la cámara polínica.

Los granos de polen son producto de un complejo proceso de desarrollo llamado microesporogénesis, el cual inicia con la formación de las células madre del polen en los primordios de la antera y culmina en la antesis, con la liberación de los granos de polen de las anteras maduras.

Cada célula madre de las microsporas (diploide) sufre 2 divisiones meióticas (la segunda sin reducción cromosómica) para formar una tétrada, generalmente esférica, de microsporas (haploides), las cuales se separan entre sí. Cada microspora sufre 2

divisiones mitóticas sin división citoplásmica (cariocinesis), la primera mitosis resulta en la formación de una pequeña célula generativa que da origen a los gametos masculinos y una gran célula vegetativa que forma el tubo polínico. La célula generativa sufre una segunda mitosis, la cual en gramíneas y crucíferas es inmediata, mientras que en otras familias como las solanáceas y ranunculáceas se demora y ocurre después de la germinación del polen sobre el estigma (Cronquist, 1984; Stanfield, 1987).

Uno de los factores clave que llevó al desarrollo del cultivo de anteras fue reconocer que los granos de polen pueden cambiar su crecimiento normal, sólo si son cultivados dentro de una etapa determinada, la cual en la mayoría de las especies estudiadas es la de microspora uninucleada (Sunderland y Dunwell, 1977; Chu, 1981; Bajaj, 1983).

En especies con una elevada respuesta en cultivo tales como toloache y tabaco, se han obtenido buenos resultados en la etapa de microspora uninucleada pero se ha registrado un pico de respuesta con microsporas justo antes, durante, o justo después de la primera mitosis (Sunderland y Dunwell, 1977).

Mediante estudios citológicos durante el cultivo *in vitro* se ha logrado detectar diferentes rutas de embriogénesis (Raghavan, 1979). En tabaco y *Datura metel*, cuando las anteras se cultivan en la etapa de microspora uninucleada los embrioides se inician de la célula vegetativa, la cual se divide repetidamente por una serie de divisiones internas sin alargamiento, hasta que una masa compacta de células se produce dentro de la pared del polen. Eventualmente ésta se rompe y deja libre la masa celular, la cual de manera gradual

asume la forma de un embrión globular típico. En este caso, sólo la célula vegetativa está involucrada en la embriogénesis, mientras que la pequeña célula generativa se desintegra sin dividirse.

En tabaco silvestre, tabaco, toloache, belladona y arroz los granos de polen en lugar de dividirse en células vegetativa y generativa, producen 2 células idénticas o núcleos con propiedades de tinción similares. Ambas sufren planos variables de división y forman una masa embriogénica típica.

Una tercera ruta de embriogénesis menos frecuente, descrita en toloache, involucra la división en dos del núcleo de la microspora, seguida por endoreduplicación del núcleo generativo y fusión entre los complementos cromosómicos de los 2 núcleos. Solamente después de que tales eventos celulares se completan, se produce la formación de embrioides y plántulas, en este caso, diploides homocigotos.

En beleño se ha encontrado que la célula generativa puede formar embrioides. Esta habilidad probablemente proviene del papel de síntesis de DNA de la célula generativa; lo cual propicia que entre en un estado mitótico con gran facilidad.

La formación de embriones varía entre especies. En tabaco se requieren de 3 a 5 semanas antes de que los embriones sean visibles saliendo de las anteras, mientras que en belladona y arroz, puede tomar hasta 8 semanas. Las plantas haploides se forman de 2 diferentes maneras, por androgénesis directa (los embriones se originan directamente de las microsporas, sin formar callo) o por androgénesis indirecta; en esta última, las microsporas en lugar de

sufrir embriogénesis, se dividen para formar un callo, el cual brota a través de la pared de la antera. El callo se diferencia para formar embriones o raíces y brotes, en el mismo medio o después de transferirlo a otro; en general, esta última vía no es recomendable ya que las plantas derivadas del callo exhiben variaciones genéticas (Bajaj, 1990).

4.2.4. Pretratamiento de las anteras

En 1973, Nitsch y Norreel descubrieron que el tratamiento en frío en botones florales de toloache antes del cultivo, aumentaba significativamente la producción de plantas haploides; lo cual más adelante fue confirmado en otras especies. A partir de entonces, con el objeto de incrementar los rendimientos de embriones y plántulas, se han aplicado diferentes tratamientos a las anteras, previos a la siembra. El tratamiento a bajas temperaturas es el más ampliamente usado. Puede ser aplicado a las inflorescencias, botones o aún a anteras aisladas antes de colocarlas en el medio. El período óptimo de frío necesita ser determinado para cada especie y cultivar; en general, los períodos de 3 a 4 días han probado ser eficientes para ciertas especies (Cuadro 3).

Cuadro 3. Tratamientos en frío en botones florales de diferentes especies.

Especie	Temperatura (°C)	Duración (Días)	Referencia
<i>Datura innoxia</i>	3	2	Nitsch y Norreel, 1973
<i>Datura metel</i>	0-1	2	Gupta y Babbar, 1980
<i>Hordeum vulgare</i>	4	28	Shannon <i>et al</i> , 1985
<i>Hyoscyamus niger</i>	7-9	2-4	Sunderland, 1981
<i>Nicotiana rustica</i>	9	15	Chowdhury, 1984
<i>Nicotiana tabacum</i>	3-4	2	Bajaj <i>et al</i> , 1977
<i>Oryza sativa</i>	8	8	Zapata <i>et al</i> , 1983
<i>Triticum aestivum</i>	3-5	3	Pan <i>et al</i> , 1983
<i>Zea mays</i>	5	7	Shimada, 1981
<i>Z. mays</i>	9	6-9	Tsay <i>et al</i> , 1986

El tratamiento en frío no induce la androgénesis pero tiene un efecto indirecto al aumentar la tasa de respuesta del polen. El incremento se atribuye principalmente a que las bajas temperaturas (3-5° C) retienen la viabilidad del polen más tiempo, demoran la senescencia de los tejidos de la antera y previenen la muerte del polen, incrementando así el número de polen viable disponible para formar embriones (Bajaj, 1983). Por otro lado, en algunas especies el frío rompe la mitosis asimétrica del polen, dando lugar a 2 núcleos idénticos en células de igual tamaño mismas que pueden ser la fuente de los embriones (Chu, 1982). En tabaco silvestre (Depaepe *et al*, 1977) y toloache (Dodds y Roberts, 1988) se ha detectado que la centrifugación de los botones florales en frío (a 2000 rpm y 5° C, por 30 minutos) aumenta la tasa de respuesta. El efecto anterior se atribuye a que la aplicación de gravedad incrementa la disfunción

del aparato mitótico, favoreciendo de alguna forma que se modifique el desarrollo normal de las microsporas.

La embriogénesis también puede estimularse por temperaturas altas. En col de bruselas es necesario exponer las anteras a temperaturas de 32 a 35° C durante 24 h o a 40° C por 1 h, antes de sembrarlas. En Chile un tratamiento inicial de las anteras a 35° C es efectivo para inducir la formación de plantas en algunos cultivares (Vaulx *et al*, 1981; citados en Vagera, 1990). El choque de temperatura parece causar la disolución de los microtúbulos y dislocación del huso acromático, lo cual ocasionaría una división anormal del núcleo de las microsporas (Bajaj, 1983). Asimismo se ha sugerido que la promoción de la embriogénesis por este método es una consecuencia de la reducción en la biosíntesis de etileno en las anteras (Biddington y Robinson, 1991).

Otros pretratamientos incluyendo presión atmosférica reducida, ambiente anaeróbico, agentes reductores (Harada e Imamura, 1983), así como choque osmótico (Ziauddin *et al*, 1990) han aumentado la respuesta de las anteras en cultivo. No obstante, los reportes son aislados y aún no se generaliza a otras especies.

4.2.5. Medio de cultivo

La composición del medio es uno de los factores más importantes que determinan no sólo el éxito del cultivo de anteras sino también el modo de desarrollo.

A excepción de ciertas especies en las que es posible inducir embriogénesis en un medio simple suplementado con sacarosa (Tabaco, toloache y beleño) (Bajaj, 1983) o con extracto de papa (Tabaco, arroz y trigo) (Chu, 1982), en la mayoría de las especies estudiadas ha sido necesario utilizar medios complejos en cuanto a su composición.

Los medios de cultivo más utilizados han sido el MS, N6, B5 y en menor medida el de Gamborg, LS y el de Nitsch y Nitsch.

SALES MINERALES

En general, el efecto preciso de las sales minerales sobre la androgénesis no ha sido investigado, a excepción del amonio y el fierro. En cereales el medio N6 (de baja concentración de amonio) ha probado ser el más eficiente para el cultivo de anteras (Chu, 1981). En cultivo de anteras de tabaco un medio a base de agar y sacarosa es suficiente para la inducción de embriones, mientras que sólo con la adición de hierro, tales embriones pueden desarrollarse en plantas completas (Dunwell, 1985).

AGAR

El agente solidificante puede llegar a ser importante en el tipo de desarrollo de las microsporas. Se estima que el agar contiene compuestos perjudiciales para la embriogénesis, además de fierro, considerado como una impureza (Dunwell, 1985). Algunos investigadores prefieren usar agarosa argumentando que el agar altera la disponibilidad de algunas hormonas (Margara, 1988). Sin embargo, el efecto del agente solidificante aún no ha sido bien determinado y requiere mayor investigación.

En algunas especies (papa, colza, trigo y arroz), el uso de medio sin agar (medio líquido) ha mostrado elevados rendimientos de callo y embriones derivados de las microsporas (Keller *et al*, 1987). Para el cultivo de granos de polen es altamente recomendable el uso de *medio líquido*, tanto para evitar las impurezas del agar como los efectos dañinos del contacto directo entre el polen y los tejidos de la antera. La pared de la antera parece ser necesaria sólo en las etapas tempranas del cultivo, como lo demuestra el hecho de que sólo aquellos granos de polen derivados de anteras precultivadas pueden desarrollarse en embriones. En etapas posteriores la pared de la antera puede proveer un ambiente desfavorable para el polen en desarrollo, ya sea por restringir el intercambio gaseoso y/o la disponibilidad de nutrimentos o por producir materiales tóxicos (Sunderland, 1979). En un medio líquido tales efectos son minimizados ya que los compuestos inhibitorios del desarrollo están diluídos y se facilita el intercambio y penetración de nutrimentos, evitando la competencia entre los embriones recién formados. En algunos casos ha resultado positivo utilizar dos medios de cultivo diferentes, uno para la inducción de androgénesis y otro para la

regeneración de embriones; en tabaco la producción de embriones mejoró sustancialmente al transferir las anteras de un medio con agar, a uno líquido, al momento de la apertura de las anteras (Sunderland, 1979). En toloache se obtuvo un incremento en la respuesta de las anteras, de 17.6% en cultivo continuo, hasta 30.8% en cultivo serial; las anteras se cultivaron en medio líquido y se transfirieron serialmente 5, 10 y 15 días después a un medio fresco (Tyagi *et al*, 1979).

SACAROSA

La sacarosa es la fuente de carbono más efectiva para el cultivo de anteras y no puede sustituirse por otros azúcares, en algunos casos se ha usado la glucosa o la maltosa, con resultados pobres (Chu, 1982). En cultivo de anteras de trigo, la maltosa y la glucosa 0.26 M fueron superiores a la sacarosa para la inducción de embriones (Navarro *et al*, 1994); asimismo, la maltosa a 150 nmol/l promovió más que la sacarosa, la inducción de callo de las microsporas en arroz (Sun *et al*, 1993). En ambos casos, la sacarosa fue más efectiva para la regeneración de plantas.

La concentración de la sacarosa es uno de los aspectos frecuentemente investigado en el medio de cultivo, encontrándose efectos diversos en diferentes especies. En general las solanáceas requieren bajas concentraciones de sacarosa, de 2 a 3%, para la inducción de androgénesis, mientras que las gramíneas y crucíferas requieren niveles altos, de 6 a 12% (Cuadro 4).

Cuadro 4. Concentraciones de sacarosa empleadas en el cultivo de anteras de diversas especies.

Especie	Concentración (%)	Referencia
<i>Datura innoxia</i>	2	Guha y Maheshwari, 1964
<i>Brassica oleracea</i>	10	Biddington y Robinson, 1991
<i>Hordeum vulgare</i>	6	Cossette y Pauze, 1983
<i>Nicotiana tabacum</i>	2	Nitsch y Nitsch, 1969
<i>Solanum melongena</i>	3	Raina e Iyer, 1973
<i>Triticum aestivum</i>	10	Pan y Kao, 1981
<i>Zea mays</i>	12	Ku et al, 1981

Además del papel nutricional de la sacarosa en el medio de cultivo, está relacionada con la regulación osmótica durante la inducción de la embriogénesis, especialmente en las especies que requieren niveles altos de sacarosa. En flor de nabo una vez que el crecimiento se ha iniciado los niveles altos de sacarosa ya no surten efecto y pueden ser dañinos para el crecimiento posterior a la inducción; por lo tanto, las anteras deben transferirse a un medio bajo en azúcar, tan pronto como la inducción de embriones ha ocurrido (Keller et al, 1975; citados en Sunderland, 1977).

HORMONAS

El requerimiento de hormonas en el medio de cultivo varía entre especies y cultivares de la misma especie. Las auxinas son las de mayor importancia y en algunos casos resultan esenciales. Las citocininas (en especial la Kinetina) son benéficas en muchas especies

de solanáceas. Algunas otras hormonas, como el ácido abscísico y el giberélico han sido escasamente empleadas y su efecto es poco claro.

De acuerdo con el requerimiento de hormonas, Sunderland y Dunwell (1977) dividen a las especies estudiadas en cultivo de anteras en 2 categorías: (1) independientes de hormonas y (2) dependientes de hormonas. En el primer grupo se encuentran muchas solanáceas (toloache, tabaco, tabaco silvestre, peonía y beleño), las que presentan androgénesis en un medio basal simple con vitaminas y concentraciones bajas de sacarosa (2-5%), y la adición de hormonas puede inhibir la respuesta *in vitro* u originar la formación de callo. Las especies dependientes de hormonas son algunas gramíneas y crucíferas (cebada, arroz, trigo, triticale, flor de nabo y espárrago). Al igual que en el otro grupo, la sacarosa debe estar presente para asegurar la inducción de embriogénesis, la mayor efectividad se obtiene con concentraciones altas (5-15%), lo cual permite el uso de niveles de auxinas relativamente elevados, ya que se contrarresta el efecto de las hormonas sobre el crecimiento del callo.

Para promover la embriogénesis directa, un medio simple con bajas concentraciones de auxinas es recomendable. De éstas, las más empleadas son el 2,4-D (ácido 2,4-Diclorofenoxiacético), el AIA (ácido indolacético) y el ANA (ácido naftalenacético). Con la primera, las concentraciones arriba de 0.1 mg/L inhibieron la embriogénesis directa en arroz y promovieron la formación de callo. En cebada un medio con 2,4-D rindió tres veces más estructuras derivadas de las microsporas que con AIA (considerado como una auxina menos activa); sin embargo, la frecuencia de regeneración fue baja en el

medio con 2,4-D y más alta con AIA (Lin *et al*, 1984; citados en Dunwell, 1985).

En general los medios ricos en hormonas promueven el crecimiento del tejido diploide de la antera hacia la formación de callo, aunque también es factible inducirlo de las microsporas, especialmente en cereales (Chu, 1982). La regeneración de plantas del callo se logra principalmente por un cambio en la composición de hormonas o por la omisión de éstas. El nivel de sacarosa invariablemente debe reducirse a 2-3% en el medio de regeneración (Sunderland y Dunwell, 1977).

CARBÓN ACTIVADO

Para mejorar la eficiencia de la regeneración, el carbón activado se ha usado en cultivo de anteras de tabaco, papa, colza, triticale, maíz y arroz, en concentraciones de 0.5-5%. En tabaco cv. Badischer Burley, el porcentaje de anteras embriogénicas se incrementó de 41 a 91% al adicionar carbón al 2% al medio basal, asimismo el número de plantas por antera se incrementó y la regeneración de las mismas se aceleró (Bajaj *et al*, 1977). Se estima que el efecto del carbón se debe a que puede remover inhibidores del crecimiento presentes en pequeñas cantidades en el medio de cultivo, o productos tóxicos que emanan de las células senescentes de la pared de la antera (Sunderland y Dunwell, 1977). Se ha demostrado que el carbón es capaz de absorber el ácido p-hidroxibenzoico, un inhibidor de la embriogénesis en zanahoria, y el 5-hidroximetilfurfural, sustancia inhibitoria del crecimiento en tabaco, producida por la degradación de la sacarosa durante la

esterilización del medio de cultivo (Margara, 1988). En otras especies, no produce ningún efecto o puede ser inhibitorio del crecimiento, debido a la adsorción de reguladores del crecimiento contenidos en el medio; por lo tanto, se recomienda la adición de carbón activado al medio, sólo cuando se usan niveles altos de reguladores del crecimiento (Zaid, 1987).

AMINOÁCIDOS

La adición de aminoácidos al medio de cultivo ha mejorado notablemente la frecuencia de inducción de embriones en algunas especies, entre ellas maíz (Miao *et al*, 1981), trigo (Shimada, 1981), tabaco (Harada e Imamura, 1983), arroz (Chen, 1983) y toloache (Nitsch, 1983). La glutamina parece ser el más importante y en menor extensión, L-serina, prolina, ácido aspártico y D-alanina. Las concentraciones empleadas fluctúan entre los 100 y 800 mg/L y es usual utilizar hidrolizado de caseína (500 mg/l) como fuente de aminoácidos (Chu, 1981). Los niveles altos de éstos, necesarios para la formación de embriones, sugieren que tales compuestos forman parte del tejido nutritivo de la pared de la antera (Sunderland, 1981). En tabaco cv. Burley, un análisis de los aminoácidos presentes en extractos acuosos de anteras androgénicas mostró que la glutamina era el único presente en cantidades significativamente mayores en relación con anteras no androgénicas (Horner y Pratt, 1979).

SUPLEMENTOS ORGÁNICOS

Otros suplementos orgánicos benéficos para el cultivo de anteras incluyen: hidrolizado de lactoalbúmina y de ácidos nucleicos, extracto de levadura y agua de coco, los cuales son utilizados escasamente debido a que su composición es variable. En el caso de tabaco los extractos de anteras embriogénicas han sido utilizados con éxito, al igual que el extracto de papa en arroz (Bajaj, 1983). Asimismo, algunos agentes reductores, entre ellos el ácido ascórbico ($100 \mu\text{g/ml}$), mercaptoetanol (10^{-6} M - 10^{-3} M) y ditioneitol (10 - $100 \mu\text{g/ml}$) incrementaron en tabaco cv. Samsun el porcentaje de anteras con plántulas y el número promedio de plántulas por antera (Harada e Imamura, 1983).

4.2.6. Ambiente de incubación

LUZ

Las variables relacionadas con el ambiente de cultivo se han estudiado mínimamente. En relación al factor luz se han reportado resultados contradictorios, dependiendo de las especies probadas. En toloache y triticales los efectos inhibitorios de la luz continua sobre la embriogénesis del polen son marcados (Sopory y Maheshwari, 1976; citados en Chu, 1982). En contraste en algunos cultivares de tabaco promueve considerablemente la producción de embriones (Phillips y Collins, 1977; citados en Chu, 1982).

TEMPERATURA

La temperatura del cultivo es un factor crítico en Brassica spp. y Capsicum annum, un período inicial de cultivo de las anteras a temperaturas elevadas (35° C) por 1-2 días seguido de una temperatura más baja (25° C), ha demostrado ser altamente benéfico. La razón para este efecto crítico no se conoce bien, sin embargo se estima que está ligada con la inhibición de la síntesis de proteínas relacionadas con la síntesis gametofítica, lo cual permitiría la inducción esporofítica de las microsporas (Dunwell, 1985; Keller *et al*, 1987). En gramíneas un incremento en la temperatura provoca un aumento de la producción de plantas albinas (Wang *et al*, 1977; citados en Chu, 1982). En toloache y trigo las anteras cultivadas a 30° C produjeron más callo que aquellas a 25° C o menos (Sopory *et al*, 1976; citados en Chu, 1982).

INTERCAMBIO DE GASES

El aspecto gaseoso del ambiente de incubación también parece ser importante en el cultivo de anteras. Las tensiones reducidas de oxígeno pueden promover la embriogénesis en tabaco (Dunwell, 1985; Harada e Imamura, 1983); el interior de la antera puede estar en condiciones anaeróbicas y al mantener esta condición es probable que aumente la viabilidad de las microsporas durante las fases tempranas del cultivo. Johansson y Eriksson (1984) reportaron que la presencia de CO₂ al 2% estimuló la formación de embriones en cultivo de anteras de varias especies. Al parecer el etileno es un inhibidor de la embriogénesis; en papa, la aplicación de etefón al medio de cultivo redujo drásticamente la formación de embriones

(Tiainen, 1991), al igual que en col de Bruselas (Biddington y Robinson, 1991), mientras que la inclusión de nitrato de plata y de otros inhibidores del etileno, la promovieron.

Otras variables relacionadas con el intercambio de gases se han estudiado por separado en algunas especies y son: el volumen de la vasija de cultivo, densidad de siembra de las anteras y la posición de la antera en la superficie del agar (Sunderland y Dunwell, 1977). Las anteras de tabaco cv. Badischer Burley, cultivadas en contacto estrecho mostraron mayor frecuencia de androgénesis que aquellas inoculadas a 1 cm de distancia (Bajaj *et al*, 1977). En cebada densidades de más de 60 anteras por ml de medio (líquido) son óptimas (Xu y Sunderland, 1983), mientras que en colza, el óptimo es cercano a 6 anteras por ml (Keller *et al*, 1987); se considera que los efectos de densidad están relacionados con el acondicionamiento del medio. En relación a la *orientación de las anteras*, en toloache y tabaco, las anteras sembradas en la superficie del medio sin ser sumergidas produjeron los mayores rendimientos de embriones (Dunwell, 1985), mientras que en maíz la orientación de las anteras sobre uno de sus bordes favoreció la formación de embrioides (Tsay *et al*, 1986). El efecto más marcado de la orientación se encontró en cebada, donde las anteras sembradas con un solo lóculo en contacto con el medio produjeron callo hasta en un 48% de los casos, en comparación de un 3% de respuesta en anteras sembradas planas (Shannon *et al*, 1985).

4.3. Ploidía de las plantas obtenidas

En poblaciones de plantas regeneradas a partir de anteras cultivadas, además de haploides se obtienen no haploides (en la mayoría de las especies probadas), incluyendo diploides, poliploides, mixoploides y aneuploides, principalmente; para una revisión véase Ziauddin y Kasha, 1990.

La no haploidía se presenta tanto en especies que muestran embriogénesis directa, como en aquellas que producen callo; en general, la frecuencia de anormalidades es mayor en plantas regeneradas de un callo (Sunderland y Dunwell, 1977). Los mecanismos de diplo y poliploidización incluyen fusión nuclear y endomitosis durante las etapas tempranas del cultivo, se cree que los aneuploides son formados por una mitosis irregular de las células del callo o del polen (Chu, 1982).

Las plantas diploides encontradas en anteras cultivadas pueden haberse desarrollado de tejidos somáticos o directamente de las microsporas, en este último caso, generalmente ocurre una diploidización espontánea. Tales haploides doblados se han detectado en muchas especies, en cebada hasta el 74% de las plantas regeneradas fueron haploides doblados espontáneamente (Islam *et al*, 1992), y en arroz, cerca del 46% (Guiderdoni *et al*, 1992).

La frecuencia de aparición de plantas con niveles de ploidía superiores o diferentes al estado haploide parece estar afectada por algunas variables, entre ellas el genotipo y cultivar empleado, así como la edad de las anteras. En varias especies de *Nicotiana* (*N. knightiana*, *N. raimondii* y *N. attenuata*) casi todas las plantas

regeneradas son haploides, mientras que en *N. tabacum*, puede obtenerse hasta el 20% de diploides, así como aneuploides (Sunderland y Dunwell, 1977). En toloache y tabaco, los diploides y poliploides se incrementan cuando se cultivan anteras viejas (Chu, 1982). En toloache, mediante el cultivo de anteras sólo el 41% de las plantas obtenidas fueron haploides, mientras que mediante el cultivo de polen, se obtuvieron hasta el 98% de haploides.

Otras posibles fuentes de la variación genética encontrada en el cultivo *in vitro* de anteras pueden ser la variabilidad genética pre-existente en la planta madre, así como las condiciones de cultivo empleadas (Ziauddin y Kasha, 1990). Un estudio detallado con triticale reveló que muchas variaciones citológicas detectadas en plantas derivadas de anteras, probablemente ya existían en las microsporas *in vivo* y pudieron haber sido causadas por irregularidades meióticas (Charmet *et al*, 1986).

Para propósitos de mejoramiento, los haploides deben ser diploidizados. El doblamiento de cromosomas puede lograrse por tratamientos con colchicina, dimetil sulfóxido u otros agentes antimitóticos. Para obtener plantas homocigotas, las anteras deben sumergirse tan pronto como las plántulas empiezan a emerger, en una solución de colchicina 0.5% por 24-48 h y después deben lavarse completamente y sembrarse aparte (Bajaj, 1983). Las plantas maduras también pueden tratarse con colchicina en forma de pasta de lanolina (0.4%) aplicada a las yemas axilares de plantas decapitadas, o una solución al 0.1%, aplicada a las inflorescencias completas durante 1 ó 2 días (Sunderland y Dunwell, 1977).

II. METODOLOGIA

II.1. Material Biológico

El material utilizado en los experimentos fue el cultivar Rendidora, selección masal 4, obtenido mediante 4 ciclos de selección masal visual estratificada, en el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH); las semillas fueron donadas por el M. C. Aureliano Peña Lomelí ¹

Las semillas se pusieron a germinar en charolas de unicel con Peat moss como sustrato, trasplantándose 15 días después a bolsas de plástico (de 25 cm de alto) con tierra de campo; todo esto bajo condiciones de invernadero.

La fase del cultivo *in vitro* se llevó a cabo en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del Departamento de Fitotecnia de la UACH, durante el período Julio de 1993 a Diciembre de 1994.

II.2. Medios de Cultivo

Los medios de cultivo empleados fueron el MS (Murashige y Skoog, 1962), Nitsch y Nitsch (1969), y el N6 (Chu, 1981); la composición se muestra en el cuadro 5.

¹ Profesor-Investigador del Departamento de Fitotecnia de la UACH. Chapingo, México. C. P. 56230.

Cuadro 5. Composición (Macro y micronutrientes) de los medios utilizados para el cultivo de anteras de tomate (en mg/L).

Componente	MS	Medios N6	NN	Solución Concentrada
KNO ₃	1900	2830	950	A
NH ₄ NO ₃	1650	-	720	A
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	463	-	B
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185	190.9	B
MnSO ₄ ·H ₂ O	15.6	-	-	B
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	4.4	25	B
MnSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	10	B
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	-	0.025	B
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	1.5	10	B
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	166	166	C
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	-	-	C
KI	0.83	0.83	-	C
KH ₂ PO ₄	170	400	68	D
H ₃ BO ₃	6.2	1.6	10	D
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	-	0.25	D
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	27.8	27.8	E
Na ₂ -EDTA	37.3	37.3	37.3	E

Todos los reactivos utilizados fueron de grado reactivo, de las casas J. T. Baker, Merck y Sigma.

Para la elaboración de los medios de cultivo, se prepararon soluciones concentradas 100 veces. Un litro de medio de cultivo basal se preparó de la siguiente manera:

En 400 mL de agua destilada desionizada se añadieron 10 mL de cada solución concentrada, con agitación constante. Después se agregaron los siguientes compuestos orgánicos:

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN (mg/L)
Glicina	2
Tiamina-HCl	0.5
Piridoxina-HCl	0.5
Acido nicotínico	0.5
Acido fólico	0.5
Biotina	0.05
Myo-inositol	100

Posteriormente se agregó sacarosa (30 g/L) y se llevó el medio a un volumen de un litro; el pH se ajustó a 5.5-5.7 con un potenciómetro y con la ayuda de HCl o NaOH 1N. Al final se añadieron 8 g/L de agar Merck y se fundió en una placa de calentamiento. El medio se vertió (15 mL) en frascos gerber y se esterilizó durante 15 minutos a 110° C y 1 kg/cm² de presión.

II.3. Establecimiento de la metodología básica

La estrategia seguida para el cultivo *in vitro* de anteras fue ensayar una metodología básica para establecer el cultivo aséptico, al mismo tiempo que se determinaban algunas variables importantes como el tamaño del botón floral y el tiempo de desinfestación con cloro; este paso fue fundamental para adquirir habilidad en la disección adecuada de las anteras.

La metodología seguida fue la siguiente:

a) Se colectaron botones florales de diferentes tamaños, 6 semanas después de la siembra, en el verano.

b) Se determinó el tamaño del botón, en el que se encontrasen microsporas en etapa uninucleada. Para ello, éste se midió a lo largo y ancho y se extrajeron las anteras. Una de éstas se colocó en un portaobjetos con una gota de acetocarmín y con el bisturí se oprimió para extraer su contenido. Los restos de las paredes de la antera se retiraron y se colocó un cubreobjetos, presionando ligeramente. La preparación se calentó a la flama y se observó en el microscopio óptico.

c) Se preparó el medio de cultivo, MS sin hormonas.

d) Los botones se desinfectaron probando varias concentraciones de cloro comercial (hipoclorito de sodio al 6%), desde 0.1 hasta 15% , durante 10, 15 y 20 minutos; la concentración más adecuada fue la de 0.5% durante 15 minutos. Los botones se mantuvieron permanentemente en la siguiente solución:

Acido cítrico	150 mg/L
Acido ascórbico	100 mg/L
L-cisteína	25 mg/L

e) Los botones se disectaron con la ayuda de una lente de aumento y se extrajeron las anteras, separándolas cuidadosamente de los tejidos envolventes. Se sembraron 10 anteras en cada frasco de cultivo; colocándose planas, con los dos lóculos en contacto con la superficie del medio.

f) El tejido se incubó bajo un fotoperíodo de 16 h diarias, a una intensidad luminosa de 1350 lux (1 lámpara de luz fluorescente blanca, de 75 W) y a $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$.

II.4. Aplicación de los tratamientos

Una vez que se estableció correctamente la metodología básica, se procedió a aplicar los tratamientos que se enlistan a continuación. En todos los casos, a menos que se indique otra cosa, se utilizaron 10 repeticiones, con 10 anteras por frasco de cultivo; los componentes de los medios, así como sus concentraciones, se detallan en la sección II.2.

1) Sales básicas de los medios:

- * Murashige y Skoog (Sólido y Líquido)
- * N6 (Sólido y Líquido)
- * Nitsch y Nitsch (Sólido y Líquido)

Los medios líquidos con agitación (80 rpm) y sin agitación.

2) Agar. Medios MS, N6 y NN con:

- * Agar (Merck) 0.8%
- * Gelgro (ICN Biochemicals) 0.4%

Cada combinación se incubó bajo luz continua (16 h) y también en la oscuridad.

3) Sacarosa. Medios MS, N6 y NN sólidos, con sacarosa al:

- * 1%
- * 3%
- * 6%
- * 12%
- * 15%

4) Hormonas. Medio N6 sólido con:

- * AIA (0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 y 0.1 mg/L)
- * AIA (0, 0.1 y 1 mg/L) + BA (0, 0.1 y 1 mg/L)
- * AIA (0, 0.1 y 1 mg/L) + K (0, 0.1, 1 y 3 mg/L)
- * ANA (0, 0.001 y 0.1 mg/L) + BA (0, 0.1 y 1 mg/L)
- * ANA (0, 0.001 y 0.1 mg/L) + K (0, 0.1, 1 y 3 mg/L)
- * 2,4-D (0, 0.1 y 1 mg/L) + K (0, 0.1, 1 y 3 mg/L)
- * K (0, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8 y 1 mg/L)

AIA = Acido indolacético

ANA= Acido naftalenacético

2,4-D= Acido 2,4-Diclorofenoxiacético

BA= Benciladenina

K= Kinetina

5 repeticiones de cada combinación hormonal, con 5 anteras por frasco. Las anteras en los medios con 2,4-D fueron resembradas una semana después a medio N6 sin hormonas.

5) Carbón activado. Medios MS, N6 y NN sólidos, con:

- * Carbón activado 0.5%
- * Sin carbón

6) Hidrolizado de caseína. Medios MS, N6 y NN sólidos, con:

- * Caseína hidrolizada 500 mg/L
- * Sin caseína

7) Aminoácidos. Medio N6 sólido con:

- * Glutamina 100 mg/L
- * Prolina 100 mg/L
- * Serina 100 mg/L
- * Glutamina + Prolina + Serina, cada una a 100 mg/L

Todos se filtraron a través de un filtro estéril de 0.2 μ m de poro, añadiéndose al medio antes de gelificar el agar.

8) Pretratamiento de las anteras. Medio N6 sólido con anteras tratadas en frío:

- * 12 h a 5° C
- * 24 h a 5° C
- * 3 días a 5° C
- * 9 días a 5° C
- * 15 días a 5° C

II.5. Análisis citogenético del material vegetal obtenido

Para determinar el nivel de ploidía de las plantas obtenidas *in vitro*, se utilizó la siguiente metodología (Curtis, 1981):

- a) Se colectaron ápices de raíces y se trataron con 8-hidroxiquinolina 0.003 M durante 8 horas a temperatura ambiente.
- b) Se fijaron en etanol-ácido acético 3:1 por 24 h.

c) Se maceraron en ácido clorhídrico 1N por 20 minutos a 60° C

d) Se enjuagaron 2 ocasiones con agua destilada.

e) Se tiñeron con el reactivo de Schiff (tinción Feulgen) durante 15 minutos, en la oscuridad.

f) Se eliminó el colorante y el tejido se enjuagó 2 veces con agua destilada.

g) El ápice se cortó en una gota de ácido acético al 45% y se presionó entre un porta y un cubreobjetos, la preparación se calentó ligeramente a la flama, antes de observar al microscopio.

II.6. Acclimatación del material vegetal

Las plantas obtenidas *in vitro* se acondicionaron de la siguiente manera:

a) Una vez que las plantas presentaron hojas verdaderas se "endurecieron" mediante la aplicación de intensidades luminosas crecientes (de 8,000 a 10,000 lux) durante 4 semanas.

b) Se sacaron del frasco de cultivo, retirándose todos los restos del agar y se asperjaron las raíces con fungicida.

c) Se trasplantaron a vasos de plástico con sustrato estéril (peat moss) y éstos se cubrieron con un capuchón de plástico.

d) Se aplicaron períodos cortos de exposición a la luz solar durante 4 semanas.

e) Se trasplantaron a macetas con suelo estéril y se alojaron en el invernadero.

II.7 Análisis estadístico

En todos los experimentos se consideró un diseño experimental completamente al azar, en aquéllos donde se estudió el efecto simultáneo de 2 factores, se llevó a cabo un diseño factorial de tratamientos.

El análisis estadístico consistió en realizar el análisis de varianza del oscurecimiento de las anteras en los diferentes tratamientos (considerando un mismo número de éstas sembradas). Cuando fue necesario, se efectuaron pruebas de comparación de medias, utilizando el procedimiento de la diferencia significativa mínima.

En el caso de la formación de callo y de la androgénesis *in vitro*, dado que se presentó mínima respuesta de las anteras, no fue posible realizar un análisis estadístico; en estos casos se manejaron porcentajes de respuesta.

III. Resultados y Discusión

III.1. Determinación del tamaño del botón floral

De acuerdo con varios autores (Sunderland y Dunwell, 1977; Bajaj, 1983) la etapa de desarrollo de las microsporas más favorable para inducir la androgénesis de las anteras en gran número de especies, es la de microspora uninucleada. En el presente trabajo durante la determinación del tamaño del botón que contenía anteras con microsporas en etapa uninucleada, se detectó que en la planta de tomate las anteras de un mismo botón son de diversos tamaños y pueden contener microsporas en diferente etapa de desarrollo. Para el cultivo *in vitro* se decidió utilizar botones de 3 y hasta 5 mm de longitud; en los que en su mayoría se encontraron anteras con microsporas en etapa uninucleada y en tétradas.

III.2. Oscurecimiento de las anteras.

A lo largo de la investigación se observó que las anteras de tomate presentaron un oscurecimiento con gran facilidad, principalmente en los primeros días después de la siembra; se designó como oscurecimiento a la aparición de un color marrón en el tejido de las anteras. Las anteras oscurecidas perdieron su turgencia y su color verde natural, adquiriendo finalmente una coloración parda (Fig. 2). Aquellas que no presentaron el fenómeno anterior adquirieron una coloración blanca, aumentando de 3 a 5 veces su tamaño (Fig. 3).

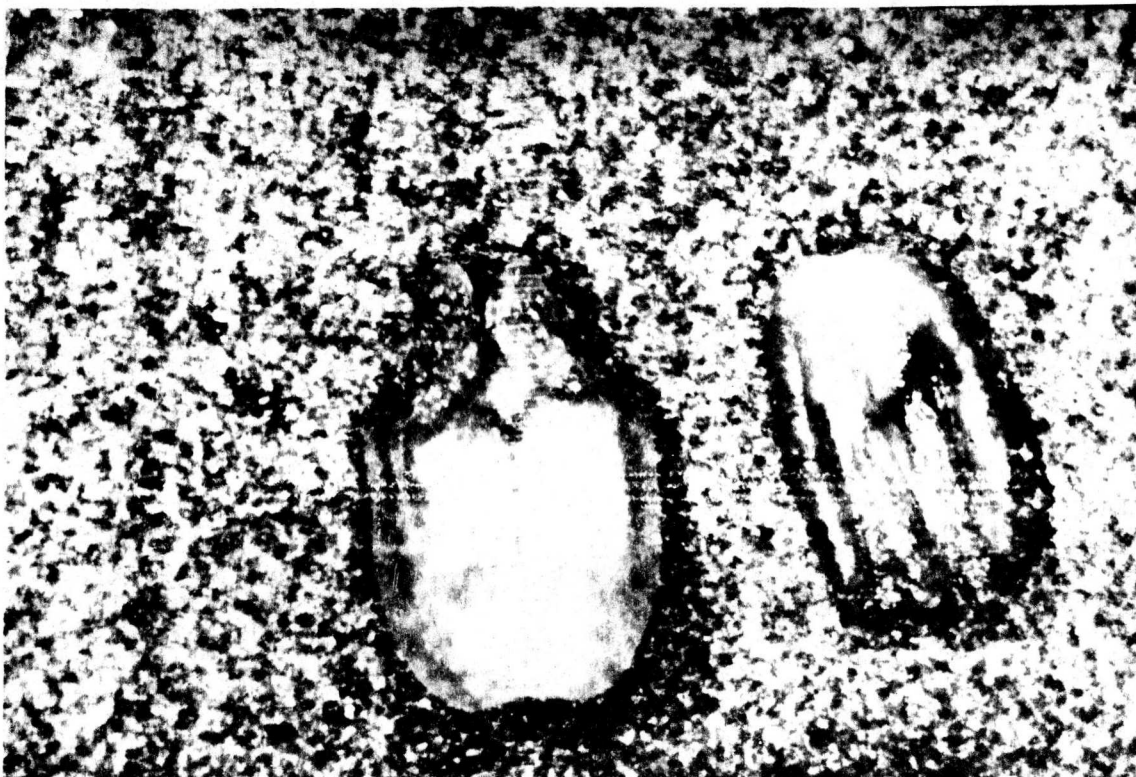


FIG. 2. DIFERENTES GRADOS DE OSCURECIMIENTO EN ANTERAS DE TOMATE DE CASCARA CULTIVADAS *In vitro*, 90x.



FIG. 3. ASPECTO DE ANTERAS DE TOMATE DE CASCARA, DESPUES DE VARIAS SEMANAS EN CULTIVO, 60x

El problema se presentó aún cuando las anteras antes de sembrarse se mantuvieron todo el tiempo en una solución antioxidante; durante la siembra se trató de hacer la disección de los botones en forma rápida, eliminándose las anteras dañadas por los instrumentos de disección, así como aquéllas previamente oscurecidas dentro del botón; en consecuencia, en la mayoría de los tratamientos se sembró un número diferente de inóculos.

Según Bidwell (1979) los cambios de coloración de este tipo son una respuesta al daño, ocurriendo una oxidación de fenoles y la producción de quinonas, compuestos tóxicos insolubles de color marrón; esta reacción es importante en la respiración pero también puede estar activa en la senescencia. El oscurecimiento del tejido es un problema común en algunas especies, en cultivo *in vitro* de tabaco llega a ser drástico en el período inicial del cultivo; se cree que el cambio de coloración puede resultar de alguna herida o de cambios fisiológicos por la separación del tejido de la planta madre (Zaid, 1987).

Considerando lo anterior y el hecho de que en ninguno de los experimentos se observó algún tipo de respuesta en las anteras oscurecidas, se consideró a este tejido como dañado; el daño a las anteras pudo haberse originado durante el manejo de los botones y la manipulación durante la siembra. Dado que en los tratamientos probados se detectaron diferencias en el número de anteras oscurecidas se trató de establecer el efecto de éstos sobre el oscurecimiento posterior a la siembra.

III.2.1. Efecto de la composición del medio de cultivo sobre el oscurecimiento de las anteras

Ninguno de los 3 medios probados en su forma basal (macro y micronutrientes+ vitaminas+ sacarosa) fue capaz de promover algún tipo de respuesta en las anteras en cultivo, tanto en forma sólida como líquida. En relación con el oscurecimiento del tejido se encontraron algunas diferencias, dependiendo del medio utilizado.

III.2.1.a. Oscurecimiento de las anteras en medio sólido

El Cuadro 6 muestra los porcentajes de oscurecimiento de las anteras en los 3 medios probados. Nótese los elevados porcentajes de oscurecimiento en los medios MS y NN, superiores al 50% y menores en el medio N6. El análisis de varianza para el número de anteras oscurecidas (Cuadro 1A), presentó diferencias altamente significativas para el tipo de medio. El medio N6 fue el de menor número de anteras oscurecidas en promedio (Cuadro 2A), por lo tanto, éste fue el que se utilizó en siembras posteriores (véase sección II.4).

Cuadro 6. Influencia de la composición del medio de cultivo y del agente gelificante sobre el oscurecimiento de anteras de tomate cultivadas *in vitro*.

Medio		Anteras sembradas	Anteras oscurecidas ^a	Oscurecimiento (%)
MS	Agar Merck	66	35	53
	Gelgro	82	56	68.3
N6	Agar Merck	77	34	44.1
	Gelgro	84	24	28.6
NN	Agar Merck	74	47	63.5
	Gelgro	81	53	65.4

^a El oscurecimiento se evaluó una semana después de la siembra.

III.2.1.b. Oscurecimiento de las anteras en medio líquido

El Cuadro 7 muestra los porcentajes de oscurecimiento de las anteras en los 3 medios líquidos probados, cada uno con y sin agitación. El análisis de varianza del número de anteras oscurecidas en estos medios (Cuadro 4A) presentó diferencias significativas para el tipo de medio, en la prueba de comparación de medias (Cuadro 5A) se encontró que el MS rindió un mayor oscurecimiento de las anteras en promedio, que los NN y N6; siendo similar en estos últimos.

En relación con la agitación del medio de cultivo, la diferencia entre el número de anteras oscurecidas en los medios con y sin agitación fue altamente significativa (Cuadro 4A), siendo claramente

menor en los medios con agitación (Cuadro 7). De estos resultados se desprende que la agitación del medio es importante para asegurar un menor oscurecimiento, lo anterior puede deberse a que el medio líquido con agitación permite una adecuada nutrición del tejido, permitiendo una mayor sobrevivencia de las anteras.

Cuadro 7. Influencia de la composición del medio de cultivo sobre el oscurecimiento de anteras de tomate cultivadas en medio líquido.

Medio		Anteras sembradas	Anteras oscurecidas ^a	Oscurecimiento (%)
MS	Sin agitación	83	79	95.2
	Con agitación	90	24	26.6
N6	Sin agitación	64	43	67.18
	Con agitación	90	16	17.7
NN	Sin agitación	81	63	77.7
	Con agitación	86	18	20.9

^a El oscurecimiento se evaluó una semana después de la siembra.

Cabe destacar que los porcentajes de oscurecimiento de las anteras en el medio N6, tanto sólido (Cuadro 6), como líquido (Cuadro 7), fueron siempre menores que aquéllos de los medios MS y NN. Se considera que este efecto está relacionado con el nitrógeno aplicado al medio de cultivo. En el cuadro 5 se observa que el medio N6 contiene más nitrógeno en forma de nitrato y menos en forma de amonio que los medios MS y NN, quizás la concentración de amonio en estos últimos es ligeramente tóxica para las anteras de tomate,

provocando mayores porcentajes de oscurecimiento; el oscurecimiento del tejido debido al amonio se ha reportado en papa, en cultivo de callo (Meulemans *et al*, 1987).

III.2.2. Efecto del tipo de Agar sobre el oscurecimiento de las anteras

De acuerdo con el análisis de varianza realizado para el número de anteras oscurecidas en medio sólido (Cuadro 1A), no hubo diferencias significativas en el uso de agar Merck o Gelgro para un mismo medio de cultivo; esto se aprecia en los porcentajes de oscurecimiento en el Cuadro 6. No obstante, la interacción entre medio de cultivo y tipo de agar fue significativamente diferente; de esta forma el oscurecimiento de las anteras en los medios con Gelgro fue diferente al pasar de un medio a otro, presentando el valor más pequeño en el medio N6 (Cuadro 3A). Quizás las diferencias en el uso de ambos tipos de agar tengan que ver con el tamaño de partícula del gel y su interacción con las sales del medio de cultivo, la combinación N6 con Gelgro podría ser más eficiente en la disponibilidad de nutrimentos para el tejido, que las combinaciones con MS y NN, permitiendo así una mejor nutrición y una mayor sobrevivencia de las anteras. A pesar de que el agar Merck y el gelgro en el medio N6 no produjeron diferencias significativas sobre el número de anteras oscurecidas, en siembras posteriores se decidió utilizar N6 con gelgro por razones prácticas: la cantidad de gelgro necesaria para lograr la consistencia adecuada del medio, es menor que en el caso del agar Merck y además se obtiene un medio más claro y transparente.

III.2.3. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el oscurecimiento de las anteras

El análisis de varianza para el oscurecimiento de las anteras en medios sólidos con distintas concentraciones de sacarosa mostró diferencias significativas entre los medios utilizados y las concentraciones de sacarosa (Cuadro 6A). El medio N6 fue el que produjo menos anteras oscurecidas en promedio, en comparación con MS y NN (Cuadro 7A). Por otro lado, el oscurecimiento de las anteras en los medios con sacarosa al 1, 3 y 6% fue significativamente menor que en los medios con sacarosa al 12 y 15% (Cuadro 8A). Lo anterior se observa en el Cuadro 8, las concentraciones altas de sacarosa (12 y 15%) produjeron altos porcentajes de oscurecimiento en los 3 medios, lo cual sugiere que puede producirse algún compuesto tóxico producto de la degradación de la sacarosa durante la esterilización del medio, tal y como lo han señalado varios autores (Sunderland y Dunwell, 1977; Margara, 1988). En los medios con concentraciones altas de sacarosa podría acumularse dicho compuesto, promoviendo un daño al tejido, lo cual se traduciría en un mayor número de anteras oscurecidas.

Cuadro 8. Efecto de la concentración de sacarosa sobre el oscurecimiento de anteras de tomate cultivadas *in vitro*.

Medio sólido	Sacarosa (%)	Anteras Sembradas	Anteras Oscurecidas ^a	Oscurecimiento (%)
MS	1	82	66	80.5
	3	72	60	83.3
	6	94	86	91.5
	12	70	66	94.3
	15	62	58	93.5
N6	1	72	41	56.9
	3	75	50	66.6
	6	72	47	65.2
	12	91	78	85.7
	15	88	78	88.6
NN	1	78	66	84.6
	3	72	58	80.5
	6	84	64	76.2
	12	82	78	95.1
	15	98	96	97.9

^a El oscurecimiento se evaluó una semana después de la siembra.

III.2.4. Efecto de la oscuridad sobre el oscurecimiento de las anteras

Los tratamientos con agente gelificante se incubaron tanto en luz continua como en la oscuridad. Se encontró que los expuestos en

oscuridad presentaron un 100 % de oscurecimiento de las anteras, este resultado pudo haberse originado al aplicar una mayor temperatura de incubación ya que los tratamientos en oscuridad se colocaron en una gaveta cerrada y sin ventilación. La susceptibilidad de las anteras a temperaturas altas de cultivo se ha reportado en jitomate, donde temperaturas de 25-27° C fueron favorables pero a 30° C o más, el tejido se oscureció totalmente (Clyah *et al*, 1990).

III.2.5. Efecto del carbón, caseína, aminoácidos y tratamiento en frío, sobre el oscurecimiento de las anteras

Estos tratamientos tuvieron un efecto similar sobre el oscurecimiento de las anteras; en general no se notaron diferencias, excepto en el caso del tratamiento en frío el cual produjo un ligero oscurecimiento de las anteras desde un inicio (Datos no mostrados).

III.3. Respuesta *in vitro* de las anteras

De todos los tratamientos probados durante la investigación, los únicos que promovieron la respuesta del tejido fueron aquellos a base de hormonas. La principal respuesta fue la formación de callo y en menor medida la androgénesis de las anteras.

III.3.1. Formación de callo en las anteras

El Cuadro 9 muestra la respuesta de las anteras de tomate de cáscara en el medio N6 con diferentes concentraciones de auxina y citocinina. Puede observarse que la formación de callo fue variable en los diferentes tratamientos, excepto en el caso del medio con ANA 0.1 mg/L + BA 1.0 mg/L, el cual parece ser el más adecuado para inducir la formación de callo (68.2%). En general el callo obtenido fue de color verde o color crema (Figs. 4 y 5), presentando un crecimiento rápido y una consistencia principalmente friable, aunque se obtuvieron algunos compactos.

El callo mostró mínima diferenciación. En el medio con AIA 1.0 mg/L se observó formación de raíces mientras que en el medio con 2,4-D 1.0 mg/L + BA 0.1 mg/l se obtuvieron raíces sin formación de callo; estas respuestas fueron claramente inducidas por la concentración de auxina. Algunos de los medios con BA 1.0 mg/L presentaron callo con formación de brotes (Figs. 6 y 7), independientemente de la concentración de auxina empleada; la BA parece ser importante para inducir la diferenciación del callo. Cabe destacar que en ninguno de los casos se observó el crecimiento de los brotes, sólo su diferenciación.

Cuadro 9. Respuesta de las anteras de tomate en el medio N6 bajo diferentes concentraciones de hormonas.

Auxina (mg/L)	Citocinina (mg/L)	Anteras sembradas	Anteras con callo ^a	Otro tipo de respuesta ^{b,c}
-	-	21	1 (4.7)	
AIA 0.02	-	19	3 (15.8)	Planta completa (1)
0.04	-	22	4 (18.2)	
0.06	-	26	5 (19.2)	Planta completa (2)
0.08	-	21	4 (19)	
-	K 0.1	23	0	
-	0.2	21	1 (4.7)	
-	0.4	21	0	
-	0.6	23	1 (4.3)	Planta completa (1)
-	0.8	21	0	
-	1.0	24	4 (16.6)	
-	3.0	26	2 (7.7)	
0.1	-	16	0	
0.1	0.1	21	1 (4.7)	
0.1	1.0	21	1	
0.1	3.0	22	0	
1.0	-	24	1 (4.2)	Callo con raíces (1)
1.0	0.1	18	1 (5.5)	
1.0	1.0	20	4 (20)	
1.0	3.0	18	2 (11.1)	
-	BA 0.1	18	3 (16.6)	
-	1.0	27	4 (14.8)	Callo con brotes
0.1	0.1	24	2 (8.3)	
0.1	1.0	19	0	Callo con brotes

^aLos números entre paréntesis son porcentajes de formación de callo

^bLa respuesta se evaluó 6 semanas después de la siembra

^cLas plantas obtenidas fueron diploides

Continuación Cuadro 9.

Auxina (mg/L)	Citocinina (mg/L)	Anteras sembradas	Anteras con callo ^{a,b,c}	Otro tipo de respuesta
AIA 1.0	BA 0.1	23	8 (34.8)	
1.0	1.0	13	6 (46.15)	Callo con brotes
ANA 0.001	-	23	3 (13)	
0.001	K 0.1	27	1 (3.7)	
0.001	1.0	27	2 (7.4)	
0.001	3.0	24	1 (4.1)	
0.1	-	25	0	
0.1	0.1	25	0	
0.1	1.0	22	1 (4.5)	
0.1	3.0	30	0	
0.001	-	19	3 (15.8)	
0.001	BA 0.1	21	3 (14.3)	
0.001	1.0	24	2 (8.3)	Callo con brotes
0.1	-	21	5 (23.8)	
0.1	0.1	20	5 (25)	
0.1	1.0	22	15(68.2)	Callo con brotes
2,4-D 0.1	-	24	2 (8.3)	
0.1	0.1	21	2 (9.5)	
0.1	1.0	24	3 (12.5)	
0.1	3.0	26	0	
1.0	-	24	1 (4.16)	
1.0	0.1	26	0	Raíces (2)
1.0	1.0	25	0	
1.0	3.0	24	0	

^aLos números entre paréntesis son porcentajes de formación de callo

^bLa respuesta se evaluó 6 semanas después de la siembra

^cEl callo fue de color verde y crema.



FIG. 4. ANTERAS CON FORMACION DE CALLO CULTIVADAS EN MEDIO SOLIDO, 90x.



FIG. 5. ANTERA CON FORMACION DE CALLO CULTIVADA EN MEDIO LIQUIDO, 60x.



FIG. 6. BROTOS DE TOMATE DE CASCARA INICIANDOSE DEL CALLO. MEDIO N6 CON BA A 1.0 mg/L, 60x.

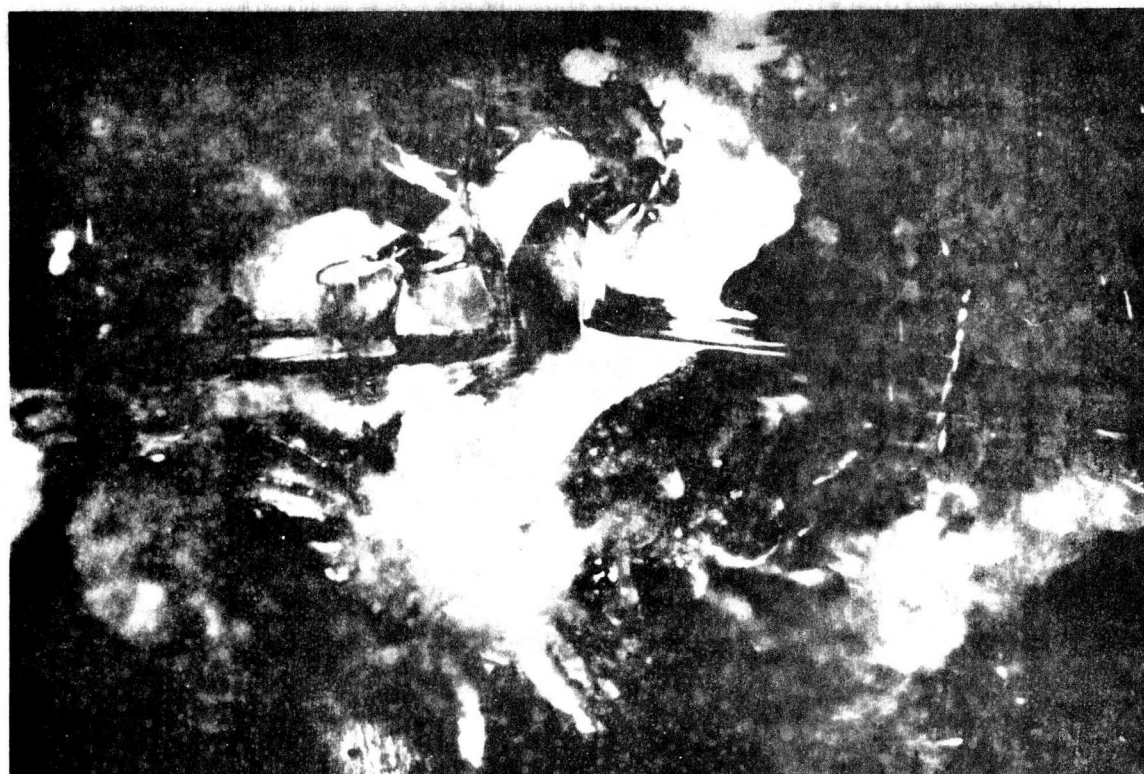


FIG. 7. FORMACION DE BROTOS MULTIPLES. MEDIO N6 CON BA A 1.0 mg/L, 60x.

El callo obtenido de la siembra de anteras en medio N6 con diferentes concentraciones de hormonas, fue trasplantado a medio fresco con distintas concentraciones de auxinas (AIA, ANA y 2,4-D) y citocininas (K y BA), con el fin de inducir organogénesis; los resultados se muestran en el Cuadro 10. En ninguno de los casos fue posible inducir organogénesis del callo y los inóculos con brotes permanecieron sin cambio; las únicas respuestas fueron la formación de callo nuevo y raíces, en este último caso, tal vez por efecto de la concentración de auxinas. Es probable que el callo requiera una serie de subcultivos antes de poder lograr la organogénesis.

III.3.2. Androgénesis de las anteras

La androgénesis de las anteras, es decir, la inducción, iniciación y desarrollo de embriones, se logró en el medio N6 con bajas concentraciones de AIA (0.02 ó 0.06 mg/L), así como con K 0.6 mg/L (Cuadro 9, Figs. 8 y 9). Las plantas formadas (1 planta por antera) fueron normales, con sus 2 cotiledones y raíz principal detectándose a simple vista después de 6 semanas. La tasa de respuesta fue baja, de 7.6% en el medio con AIA 0.06 mg/L y alrededor del 4.5% en los otros casos.

Cuadro 10. Respuesta del callo de tomate en el medio N6 con diferentes concentraciones de hormonas.

	Auxina (mg/L)		Citocinina (mg/L)	Inóculos sembrados	Inóculos con callo nuevo ^a
AIA	-		-	14	4
	0.1		-	10	1
	0.1	K	0.1	9	0
	0.1		1.0	17	0
	0.1		3.0	12	0
	1.0		-	10	1
	1.0		0.1	10	2
	1.0		1.0	9	2
	1.0		3.0	15	2
	-		0.1	15	1
	-		1.0	13	3
	-		3.0	12	2
	-	BA	0.1	14	3
	-		1.0	15	4
	0.1		0.1	12	1
	0.1		1.0	10	3
ANA	1.0		0.1	10	6 Raíces
	1.0		1.0	13	9 Raíces
	0.1		1.0	13	0
	0.1		2.0	14	7
	0.1		3.0	8	2
	0.2		1.0	11	1
	0.2		2.0	16	6
	0.2		3.0	13	5
	0.3		1.0	8	2 Raíces
	0.3		2.0	7	3
	0.3		3.0	18	11 Raíces
2,4-D	0.1	K	-	12	0
	0.1		0.1	10	1
	0.1		1.0	11	4
	0.1		3.0	12	2
	1.0		-	7	0
	1.0		0.1	7	2 Raíces
	1.0		1.0	10	0
	1.0		3.0	11	5

^a6 semanas después de la siembra.

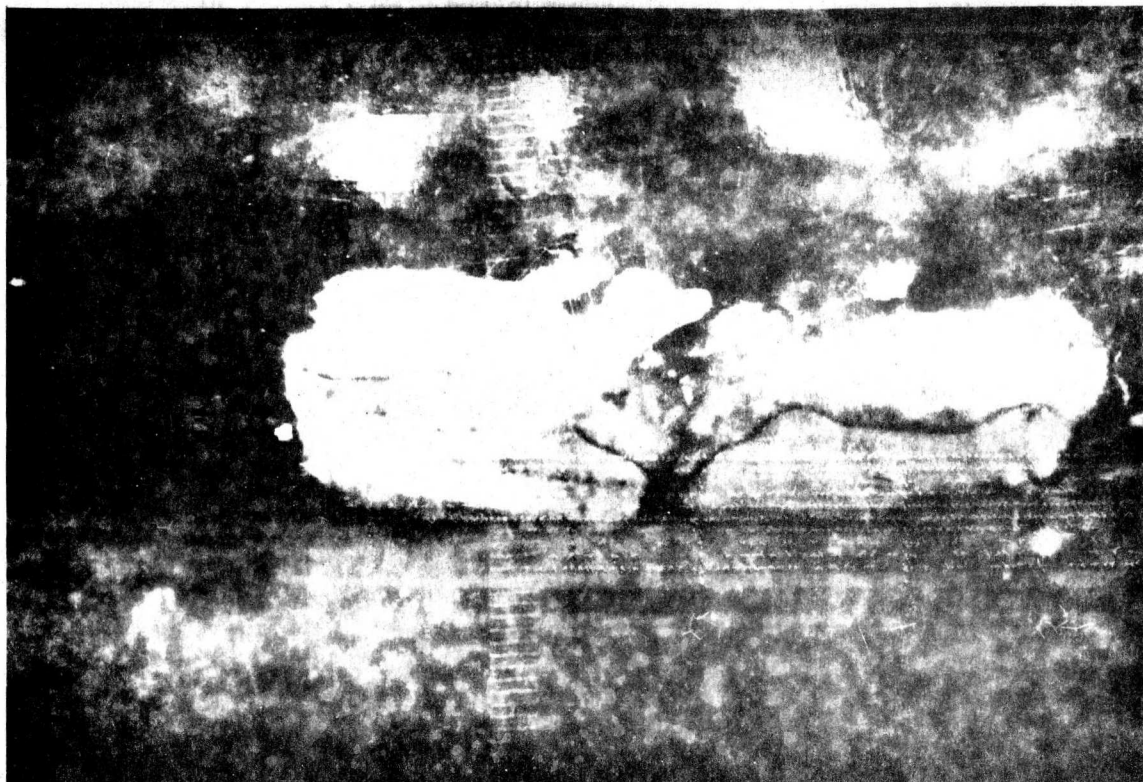


FIG. 8. ANDROGENESIS EN UNA ANTERA DE TOMATE DE CASCARA. MEDIO N6 CON AIA 0.02 mg/L, 60x.

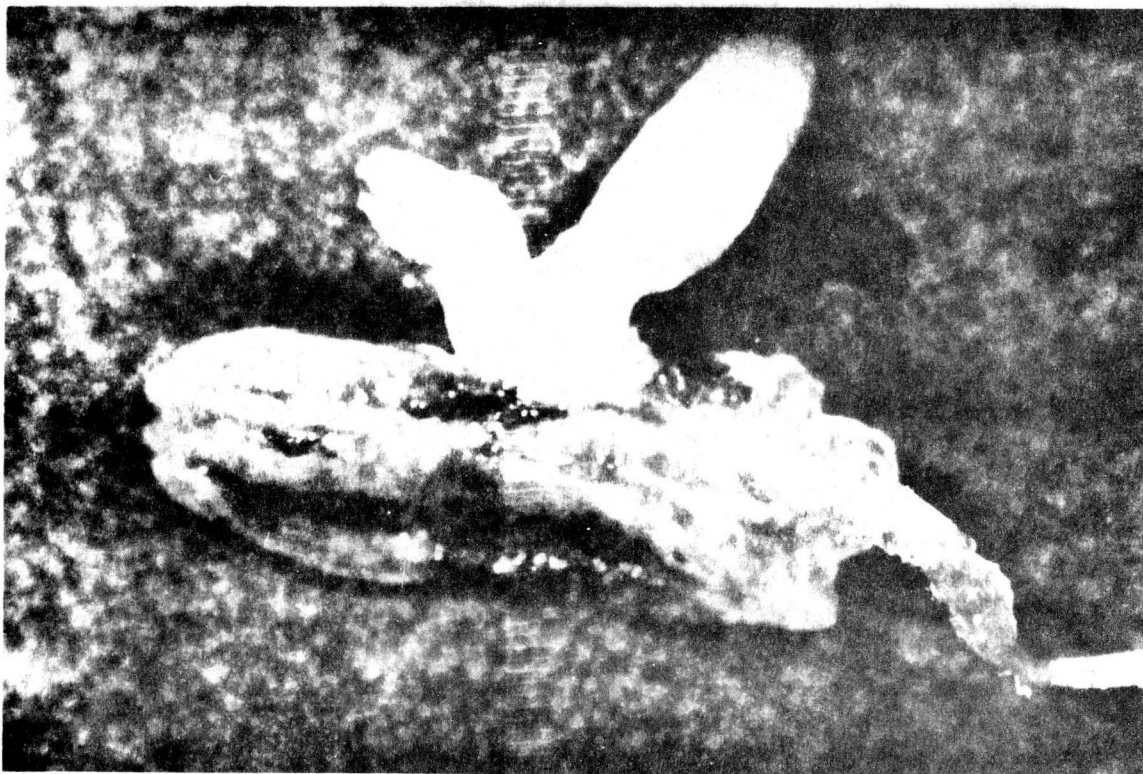


FIG. 9. FORMACION DE UNA PLANTA DE TOMATE DE CASCARA A PARTIR DE UNA ANTERA CULTIVADA *In vitro*. MEDIO N6 CON AIA 0.06 mg/L, 60x.

Con el fin de contar con mayor cantidad de material para analizar, se repitió la siembra de anteras en el medio N6 con AIA 0.02 mg/L, AIA 0.06 mg/L y K 0.6 mg/L, tanto sólido como líquido (en agitación). Se encontró que sólo la respuesta del medio N6 sólido con AIA 0.06 mg/L fue reproducible. Con base en la mayor tasa de respuesta de las anteras y a la reproducibilidad de los resultados, se concluyó que, de las hormonas probadas, el AIA a 0.06 mg/L, fue la más adecuada para el cultivo *in vitro* de anteras de tomate de cáscara.

En esta segunda siembra se obtuvieron hasta 2 plantas por antera (Fig. 10), pero éstas presentaron un solo cotiledón en forma de corola (Fig. 11) y un hábito de crecimiento múltiple (Fig. 12).

El requerimiento de bajas concentraciones de auxinas (en este caso AIA) por parte de las anteras no coincide con lo señalado por Sunderland y Dunwell (1977), en el sentido de que las solanáceas son especies independientes de hormonas para el cultivo de anteras *in vitro*. No obstante, puede señalarse que al igual que en otras especies de solanáceas, se logró inducir la androgénesis en un medio basal simple, con vitaminas y una concentración baja de sacarosa (3%).

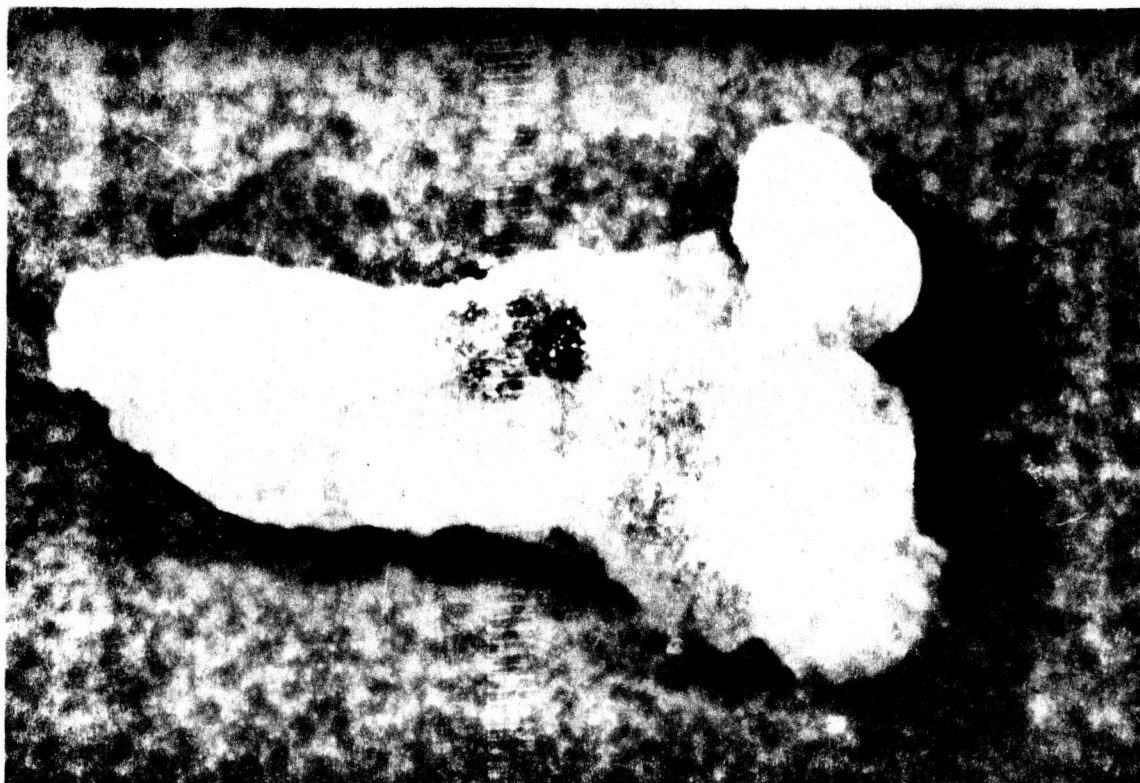


FIG. 10. BROTACION DE EMBRIONES EN UNA ANTERA DE TOMATE DE CASCARA. MEDIO N6 CON AIA 0.06 mg/L, 90x.



FIG. 11. PLANTA MIXOPLOIDE DE TOMATE DE CASCARA OBTENIDA POR ANDROGENESIS DE LAS ANTERAS, 60x.



FIG. 12. HOJA DE UNA PLANTA MIXOPLOIDE OBTENIDA
In vitro, 60x.



FIG. 13. PLANTA DE TOMATE DE CASCARA EN PROCESO DE
ACLIMATACION.

III.4. Análisis citogenético de las plantas obtenidas

El análisis de la ploidía de las plantas obtenidas demostró que éstas eran diploides, con 24 cromosomas. La explicación a este resultado puede deberse a: (1) Que las plantas se formaron a partir de algún tejido diploide de la antera, o (2) Proviene del tejido haploide de las microsporas y doblaron su número cromosómico en forma espontánea durante algún momento de su desarrollo, ya que esto se ha detectado en especies como cebada (Islam *et al*, 1992) y arroz (Guiderdoni *et al*, 1992).

Las plantas anormales de la segunda siembra con AIA 0.06 mg/L fueron mixoploides, con 12, 24, 36 y 48 cromosomas en sus células (Fig. 14). Con base en este resultado se puede apoyar la idea del origen haploide de las plantas obtenidas *in vitro* y su posterior doblamiento de cromosomas en forma espontánea.

III.5. Aclimatación de las plantas obtenidas

Todas las plantas obtenidas *in vitro* se acondicionaron siguiendo la metodología detallada en la sección II.6 (Fig.13), la cual no fue adecuada para aclimatar eficientemente el material vegetal. Las escasas plantas obtenidas se deshidrataron en las últimas semanas, marchitándose por completo al alojarlas en el invernadero.

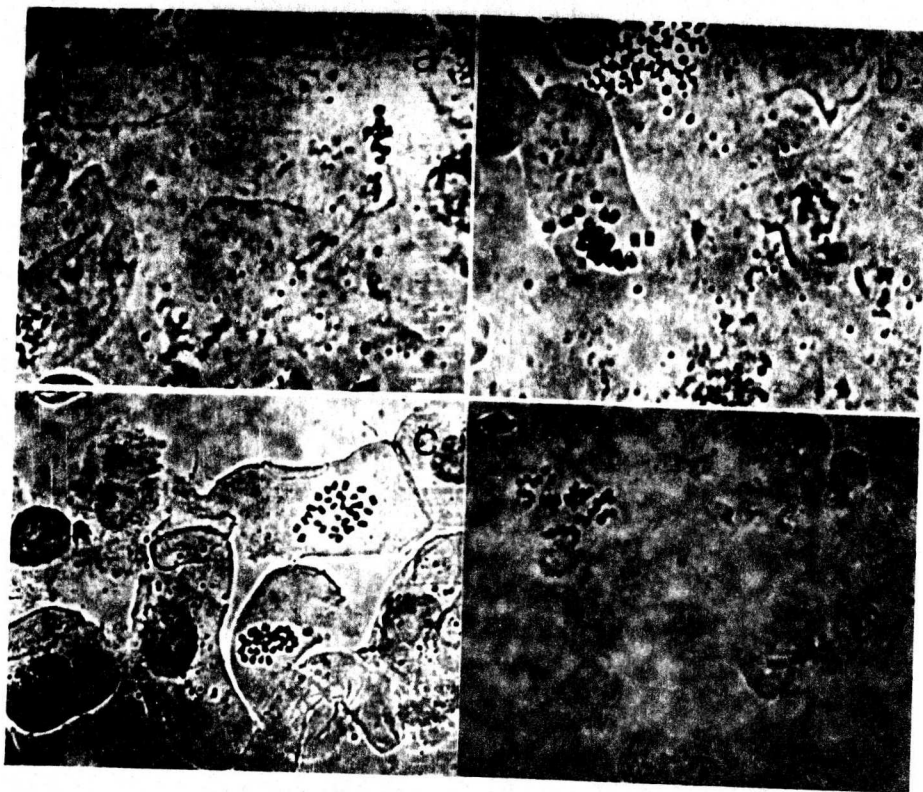


Fig. 14. Células de ápices de raíces de tomate de cáscara mostrando (a) 12, (b) 24, (c) 24, 36 y (d) 48 cromosomas. Escala: $50\ \mu\text{m}$

III.6. Metodología para el cultivo de anteras en tomate de cáscara

La figura 15 presenta la metodología que se estableció para el cultivo de anteras de tomate de cáscara. Las variables más importantes fueron el tamaño del botón floral, 3-5 mm de longitud; la desinfestación de los botones usando cloro comercial al 0.5% por 15 minutos; el medio de cultivo, N6 con vitaminas completas (Glicina 2 mg/L, tiamina-HCl 0.5 mg/L, piridoxina-HCl 0.5 mg/L, ácido nicotínico 0.5 mg/L, ácido fólico 0.5 mg/L y biotina 0.05 mg/L), myo-inositol 100 mg/L, sacarosa 3%, gelgro 0.4%, y finalmente la composición de hormonas, en este caso AIA 0.06 mg/L. Dichas condiciones permitieron inducir en un bajo porcentaje (7.6%) la androgénesis de las anteras de tomate de cáscara cultivar Rendidora (Figs. 16 y 17).

Siembra de semilla bajo condiciones de invernadero



Colecta de botones florales de 3-5 mm de longitud, en solución antioxidante (Ac. cítrico 150 mg/L + Ac. ascórbico 100 mg/L + Cisteína 25 mg/L)



Desinfestación de los botones con cloro comercial al 0.5% por 15 minutos



Siembra de anteras *in vitro* (10 anteras por frasco de cultivo) en el medio N6 con vitaminas, myo-inositol 100 mg/L, sacarosa 3%, gelgro 0.4% y AIA 0.06 mg/L



Incubación del tejido bajo luz continua (1350 lux) y a $25 \pm 2^{\circ} \text{C}$



Regeneración de plantas después de 6 semanas

Fig. 15. Metodología establecida para el cultivo de anteras de tomate de cáscara, cultivar Rendidora.



FIG. 16. PLANTA DIPLOIDE DE TOMATE DE CASCARA OBTENIDA MEDIANTE EL CULTIVO DE LAS ANTERAS *In vitro*.



FIG. 17. PLANTA DIPLOIDE DE TOMATE DE CASCARA DE 7 SEMANAS DE EDAD.

Conclusiones

Se logró establecer una metodología adecuada para el cultivo *in vitro* de anteras de tomate de cáscara, obteniéndose plantas después de 6 semanas; la tasa de respuesta fue de 4.5- 7.6%.

El medio de cultivo adecuado fue el N6 con vitaminas completas (Glicina 2 mg/L, tiamina-HCl 0.5 mg/L, piridoxina-HCl 0.5 mg/L, ácido nicotínico 0.5 mg/L, ácido fólico 0.5 mg/L y biotina 0.05 mg/L), myo-inositol 100 mg/L, sacarosa 3%, geigro 0.4% y AIA 0.06 mg/L.

Las plantas obtenidas fueron diploides ($2n=24$) y mixoploides ($n=12$, $2n=24$, $3n=36$ y $4n=48$).

BIBLIOGRAFIA

Anand, V. V. y A. K. Govindappa. 1979. *In vitro* culture of excised anthers of *Solanum mammosum* L. Indian J. Exp. Biol. 17:444- 445.

Bajaj, Y. P. S. 1983. *In vitro* production of haploids. En: Handbook of plant cell culture. Vol I. D. A. Evans, W. R. Sharp, P. V. Ammirato y Y. Yamada (Editores). Mc Millan Pub. Co. New York. pp. 228-287.

Bajaj, Y. P. S.; J. Reinert y E. Heberle-Bors. 1977. Factors enhancing *in vitro* production of haploid plants in anthers and isolated microspores. En: La culture des tissus et des cellules des végétaux. R. J. Gautheret (Editor). París. pp. 47-58.

Bajaj, Y. P. S. 1990. *In vitro* production of haploid and their use in cell genetics and plant breeding. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 3-44.

Bapat, V. A. y G. Wenzel. 1982. *In vitro* haploid plantlet induction in *Physalis ixocarpa* Brot. through microspore embryogenesis. Plant Cell Rep. Berlín. 1: 154-156.

Biddington, N. L. y H. T. Robinson. 1991. Ethylene production during anther culture of Brussels sprouts (*Brassica oleracea* var. gemmifera) and its relationships with factors that affect embryo production. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 25(3): 169-177.

Bidwell, R. G. S. 1979. Plant Physiology. Mc Millan Pub. Co., Inc. New York. pp. 128-129.

Binding, H. 1972. Nuclear and cell divisions in isolated pollen of *Petunia hybrida* in agar suspension cultures. Nature New Biol. 237: 283-285.

Bourgin, J. P. y J. P. Nitsch. 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. Ann. Physiol Veg.(París) 9: 377-382.

Cappadocia, M. y K. S. Ramulu. 1980. Plant regeneration from *in vitro* cultures of anthers and stem internodes in an interspecific hybrid, *Lycopersicon esculentum* L. x *L. peruvianum* Mill. and cytogenetic analysis of the regenerated plants. Plant Sci. Lett. 20: 157-166.

Cappadocia, M.; D. S. K. Cheng y R. Ludlum-Simonette. 1984. Plant regeneration from *in vitro* culture of anthers of *Solanum chacoense* Bitt. and interspecific diploid hybrids *S. tuberosum* L. x *S. chacoense* Bitt. Theor. Appl. Genet. 69: 139-143.

Chlyah, A.; H. Taarji y H. Chlyah. 1990. Tomato (*Lycopersicon esculentum* L.): Anther culture and induction of androgenesis. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 442-457.

Collins, G. B.; P. D. Legg y M. S. Kasperbauer. 1972. Chromosome numbers in anther-derived haploids of two *Nicotiana* species— *N. tabacum* and *N. otophora* Gris. J. Hered. 63: 113-118.

Collins, G. B. y N. Sunderland. 1974. Pollen-derived haploids of *Nicotiana knightiana*, *N. raimondii* and *N. attenuata* J. Exp. Bot. 25: 1030-1039.

Cossette, F. y F. J. Pauze. 1983. Production of haploid and homozygous diploid lines in barley by anther culture. Rev. Can. Biol. Exp. 42(1): 45-49.

Cronquist, A. 1984. Introducción a la Botánica. 2a Ed. Ed. CECSA. México. pp. 593-594.

Curtis, J. 1981. Manual para la elaboración de preparaciones cromosómicas en plantas. Universidad Autónoma Chapingo. México. pp. 32-33.

Charmet, G.; S. Bernard y M. Bernard. 1986. Origin of aneuploid plants obtained by anther culture in Triticale. Can. J. Genet. Cytol. 28: 444-452.

Chen, Y. 1983. Anther and pollen culture of rice in China. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press and International Rice Research Institute. Beijing. pp. 11-26.

Chowdhury, M. 1984. An improved method for dihaploid production in *Nicotiana rustica* through anther culture. Theor. Appl. Genet. 69(2): 199-204.

Chu, C. C. 1981. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. En: Proceedings of Symposium on Plant tissue culture, 1978. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking. pp. 35-42.

Chu, C. C. 1982. Haploids in plant improvement. En: Plant improvement and somatic cell genetics. I. K. Vasil, W. R. Scowcroft y K. J. Frey (Editores). Academic Press Inc. Florida. pp. 129-158.

David, S. B. y G. S. Chinchankar. 1980. Anther culture of *Solanum indicum*. En: Plant tissue culture, genetic manipulation and somatic hybridization of plant cells. P. S. Rao (Editor). Bhabha Atomic Research Centre, Bombay. pp. 79-84.

Debergh, P. y C. Nitsch. 1973. Premiers résultats sur la culture *in vitro* de grains de pollen isolés chez la tomate. C. R. Hebd. Séanc. Acad. Sci. París. 276: 1281-1284.

Deyao, Z. y P. Xigan, 1990. Rice (*Oryza sativa* L.): Guan 18 - an improved variety through anther culture. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 204-211.

Dodds, J. H. y L. W. Roberts. 1988. Experiments in Plant Tissue Culture. 2ª Ed. Cambridge University Press. New York. pp. 157-171.

Doré, C. 1990. *Asparagus* anther culture and field traits of dihaploids and F1 hybrids. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 322-345.

Dunwell, J. M. 1985. Embryogenesis from pollen *in vitro*. En: Biotechnology in plant science. M. Zaitlin, P. Day y A. Hollaender (Editores). Academic Press Inc. New York. pp. 49-76.

Dunwell, J. M. y N. Sunderland. 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. Euphytica. 22: 317-323.

Durr, A. y J. Fleck. 1980. Production of haploid plants of *Nicotiana langsdorfii*. Plant Sci. Lett. 18: 75-79.

Engvild, K. C. 1973. Triploid Petunias from anther cultures. Hereditas 74: 144-147.

García Sánchez, F. 1975. El género *Physalis* (Solanaceae) en el Valle de México. Tesis de Licenciatura. E. N. C. B., Instituto Politécnico Nacional. México. 70 pp.

George, L. y P. S. Rao. 1979. experimental induction of triploid plants of *Physalis* through anther culture. Protoplasma 100: 13-19.

Genovesi, A. D. 1990. Maize (*Zea mays* L.): *in vitro* production of haploids. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 176-203.

Gresshoff, P. M. y C. H. Doy. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161-170.

Guiderdoni, E.; E. Galinato; J. Luistro y G. Vergara. 1992. Anther culture of tropical japonica times indica hybrids of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica 62(3): 219-224.

Guha, S. C. y S. C. Maheshwari. 1964. *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497.

Guha, S. C. y S. C. Maheshwari. 1967. Development of embryoids from pollen grains of *Datura in vitro*. Phytomorphology 17: 454-461.

Guo, C. 1972. Effects of chemical and physical factors on the chromosome number in *Nicotiana* anther callus cultures. In vitro 7: 381-386.

Gupta, P.P. 1983. Microspore-derived haploid, diploid and triploid plants in *Petunia violacea* Lindl. Plant Cell Rep. 2: 255-256.

Gupta, S. C. y S. B. Babbar. 1980. Enhancement of plantlet formation in anther cultures of *Datura metel* L. by pre-chilling of buds. Z. Pflanzenphysiol. 96: 465-470.

Harada, H. y J. Imamura. 1983. Factors that stimulate pollen embryogenesis. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press and International Rice Research Institute. Beijing. pp. 145-158.

Harn, C. 1972. Production of plants from anthers of *Solanum nigrum* cultivated *in vitro*. Caryologia 25: 429-437.

Heberle-Bors, E. y J. Reinert. 1979. Androgenesis in isolated pollen cultures of *Nicotiana tabacum*: Dependence upon pollen development. Protoplasma 99: 237-245.

Horner, M. y M. L. Pratt. 1979. Aminoacid analysis of *in vivo* and androgenic anthers of *Nicotiana tabacum*. Protoplasma 98: 279-282.

Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). 1981. Logros y aportación de la investigación agrícola en el estado de Puebla. Campo Agrícola experimental Tecamachalco, México. pp. 24-26.

Islam, M. R.; S. kintzios y G. Fischbeck. 1992. Anther culture responsiveness of *Hordeum spontaneum* derived spring barley lines and a genetic analysis of plant regeneration. Plant Cell Tissue and Organ Culture 29(3): 235-239.

Jaiswal, V. S. y P. Narayan. 1981. Induction of pollen embryoids in *Solanum torvum* Swartz. Curr. Sci. 50: 998-999.

Johansson, L. y T. Eriksson. 1984. Effects of carbon dioxide on anther cultures. Physiol. Plant. 60: 26-30.

Keller, W. A.; P. G. Arnison y B. J. Cardy. 1987. Haploids from gametophytic cells. Recents developments and future prospects. En: Plant tissue and cell culture. C. E. Green, D. A. Somers, W. P. Hackett y D. D. Biesboer (Editores). Alan R. Liss Inc. New York. pp. 223-241.

Kohlenback, H. W. y T. Geier. 1972. Embryonen aus *in vitro* kultivierten antheren von *Datura meteloides* Dun, *Datura wrightii* and *Solanum tuberosum* L. Z. Pflanzenphysiol. 67: 161-165.

Ku, M.; W. Cheng; L. Kuo; Y. Kuan; H. An y C. Huang. 1981. Induction factors and morpho-cytological characteristics of pollen-derived plants in maize (*Zea mays*). En: Proccedings of Symposium on Plant tissue culture, 1978. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking. pp. 35-42.

Kuo, J. S.; Y. Y. Wang; N. F. Chien; S. K. Ju; M. L. Kung y H. C. Hsu. 1973. Investigations on the anther culture *in vitro* of *Nicotiana tabacum* L. and *Capsicum annuum* L. Acta Bot. Sinica 15: 36-52.

Margara, J. 1988. Multiplicación vegetativa y cultivo *in vitro*. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid. pp. 171-197.

Matsubayashi, M. y K. Kuranuki. 1975. Embryogenic responses of the pollen to varied sucrose concentrations in anther culture. Sci. Rept. Fac. Agric. Kobe Univ. 11: 215-230.

Meulemans, M.; D. Dekegel y G. Vanheule. 1987. Ammonium toxicity in potato shoot culture. Acta Horticulturae. No. 212: 263-266.

Miao, S.-H.; C.-S. Kuo; Y.-L. Kue; A.-T. Sun; S.-Y. Ku; W.-L. Lu y Y.-Y. Wang. 1981. Induction of pollen plants of maize and observations on their progeny. En: Proceedings of Symposium on Plant tissue culture, 1978. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking. pp. 23-33.

Möllers, C.; M. C. Igbaly G. Röbbelen. 1994. Efficient production of doubled haploid *Brassica napus* plants by colchicine treatment of microspores. Euphytica 75:95-104.

Morrison, R. A.; R. E. Koning y D. A. Evans. 1986. Anther culture of an interspecific hybrid of *Capsicum*. J. Plant Physiol. 126(1): 1-9.

Murashige, T. y F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. Physiologia Plantarum 15: 473-497.

Nakamura, A.; T. Yamada; N. Kadotani; R. Itagaki y M. Oka. 1974. Studies on the haploid method of breeding in tobacco. SABRAO, Newsletter 6: 107-131.

Narayanaswamy, S. y L. P. Chandy. 1971. *In vitro* induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Datura metel* L. Ann. Bot. 35: 535-542.

Navarro, W.; P. S. Baenziger; K. Eskridge; D. Shelton; V. Gustafson y M. Hugo. 1994. Effect of sugars in wheat anther culture media. Plant Breeding 112(1): 53-62.

Nitsch, J. P. 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology 19: 389-404.

Nitsch, J. P. y C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains. Science 163: 85-87.

Nitsch, C. 1967. Haploid plants from pollen. Z. Pflanzenzuechtung 67: 3-18.

Nitsch, C. 1983. Progress in anther and pollen culture techniques. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press and International Rice Research Institute. Beijing. pp. 1-10.

Nitsch, C. y B. Norreel. 1973. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene du pollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l'anthere. C. R. Acad. Sci. Ser. D. 276: 303-306.

Novák, F. J. 1974. Induction of a haploid callus in anther cultures of *Capsicum* spp. Z. Pflanzenzuecht 72: 46-54.

Pan, C. C. y K. Kao. 1981. The production of wheat pollen embryo and the influence of some factors on its frequency of induction. En: Proceedings of Symposium on Plant tissue culture, 1978. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking. pp. 133-142.

Pan, J.- L.; G.-H. Gao y D. Hai. 1983. Initial types of wheat pollen cells and their development in anther culture. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press and International Rice Research Institute. Beijing. pp. 117-129.

Pandey, K. K. 1957. Genetics of self-incompatibility in *Physalis ixocarpa* Brot. a new system. Am. J. Bot. 44: 879-887.

Peña, L. A. y F. Márquez S. 1990. Mejoramiento genético de tomate de cáscara. revista Chapingo XV(71-72): 84-88.

Picard, E.; A. Rode; G. Doussinault; M. Rousset y M. Rives. 1990. Wheat (*Triticum aestivum*): *In vitro* production and utilization of doubled haploids. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 101-124.

Raina, S. K. y R. D. Iyer. 1973. Differentiation of diploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. Z. Pflanzenzuecht 70: 275-280.

Raghavan, V. 1975. Induction of haploid plants from anther culture of henbane. Z. Pflanzenphysiol. 76: 89-92.

Raghavan, V. 1979. Totipotency of plant cells: Evidence for the totipotency of male germ cells from anther and pollen cultures studies. En: Plant Cell and Tissue Culture. Principles and applications. W. R. Sharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock y Raghavan (Editores). Ohio State University Press. Ohio. pp. 155-178.

Raquin, C. y V. Pilet. 1972. Production de plantules a partir d'antheres de Petunias cultivees *in vitro*. C. R. Acad. Sci. Ser. D. 274: 1019-1022.

Reynolds, T. L. 1984. Callus formation and organogenesis in anther cultures of *Solanum carolinense* L. Plant Physiol. 117: 157-161.

Saray, C. R. 1977. Tomate de cáscara, algunos aspectos sobre su fisiología e investigación. Campo Agrícola Experimental Zacatepec. CIAMEC-INIA-SARH. México.

Shannon, P. R.; A. E. Nicholson; J. M. Dunwell y D. R. Davies. 1985. Effect of orientation of anthers on microspore callus production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture 4: 271-280.

Sharp, W. R.; D. K. Dougall y E. F. Paddock. 1971. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. Bull. Torrey Bot. Club 98: 219-222.

Shimada, T. 1981. Haploid plants regenerated from the pollen callus of wheat (*Triticum aestivum* L.). Jpn. J. Genet. 56: 581-588.

Shouyi, L. y H. Shouyin. 1991. Huayu 15, a high-yielding rice variety bred by anther culture. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 14. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 230-247.

Sinha, S.; K. K. Jha y R. P. Roy. 1979. Callus formation and shoot bud differentiation in anther culture of *Solanum surattense*. Can.J. Bot. 57: 2524-2527.

Smith, H. H. 1974. Model genetic systems for studying mutation, differentiation and somatic cell hybridization in plants. En: Polyploidy and induced mutations in Plant Breeding. Proceedings of Eucarpia/FAO/IAEA Conference. Italy 1972. p. 274.

Stansfield, W. D. 1987. Genética. 2a. Ed. Ed. Mc Graw-Hill. México. pp. 11-14.

Sun, Z. X.; H. M. Si; S. H. Cheng y X. Y. Zhan. 1993. Effect of maltose on efficiency of anther culture of rice. Chinese Journal of Rice Science 7(4): 227-231.

Sunderland, N. 1979. Comparative studies of anther and pollen culture. En: Plant Cell and Tissue Culture. Principles and applications. W. R. Sharp, P. O. Larsen, E. F. Paddock y V. Raghavan (Editores). Ohio State University Press. Ohio. pp. 155-178.

Sunderland, N. 1981. Strategies in the improvement of yields in anther culture. En: Proceedings of Symposium on Plant tissue culture, 1978. Pitman Pub. Ltd. and The Science Press. Peking. pp. 65-86.

Sunderland, N. y J. M. Dunwell. 1977. Anther and pollen culture. En: Plant tissue and cell culture. H. E. Street (Editor). University of California Press. pp. 223-265.

Tiainen, T. 1991. The role of ethylene and reducing agents on anther culture response of tetraploid tomato (*Solanum tuberosum* L.). Plant Cell Rep. 10(12): 604-607.

Tran Than Van, K. y T. H. Trinh. 1980. Embryogenetic capacity of anthers from flowers formed *in vitro* on thin cell layers and of anthers excised from the mother plant of *Nicotiana tabacum* L. and *N. plumbaginifolia*. Z. Pflanzenphysiol. 100: 379-388.

Tsay, H. S.; S. H. Miao y J. M. Widholm. 1986. Factors affecting haploid plant regeneration from maize anther culture. Plant Physiol. 126(1): 33-40.

Tyagi, A. K.; A. Rashid y S. C. Maheshwari. 1979. High frequency production of embryos in *Datura innoxia* from isolated pollen grains by combined cold treatment and serial culture of anthers in liquid medium. Protoplasma 99: 11-17.

Vagera, J. 1990. Pepper (*Capsicum* spp.): *In vitro* induction of haploids. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 374-392.

Vishnoi, A. S. B. Babbar y S. C. Gupta. 1979. Induction of androgenesis in anther cultures of *Withania somnifera*. Z. Pflanzenphysiol. 94: 169-171.

Vyskot, B. y F. J. Novak. 1974. Experimental androgenesis *in vitro* in *Nicotiana_clevelandii* Gray. and *N. sanderae* hort. Theor. Appl. Genet. 44: 138-140.

Weatherhaed, M. A. y G. G. Henshaw. 1979. The production of homozygous diploid plants of *Solanum verrucosum* by tissue culture techniques. Euphytica 29: 765-768.

Wernicke, W. y H. W. kohlenback. 1975. Antherenkulturen bei *Scopolia*. Z. Pflanzenphysiol. 77: 89-93.

Wernicke, W.; H. Lorz y E. Thomas. 1979. Plant regeneration from leaf protoplasts of haploid *Hyoscyamus muticus* L. produced via anther culture. Plant Sci. Lett. 15: 239-250.

Xu, Z. y N. Sunderland. 1983. Inoculation density in the culture of barley anthers. Scientia Sinica 25B: 961-968.

Youliang, Z.; H. Xianchang; W. Jinlian y L. WenXuan. 1991. Anther culture 28 -A new disease -resistant and high -yielding variety of winter wheat. En: Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 13. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 353-362.

Zaid, A. 1987. *In vitro* browning of tissues and media with special emphasis to date palm cultures -A review. Acta Horticulturae No. 212: 561-566.

Zapata, F. J.; G. S. Khush; J. P. Crill; M. H. Neu; R. O. Romero; L. B. Torrizo y M. Alejar. 1983. Rice anther culture at IRRI. En: Cell and tissue culture techniques for cereal crop improvement. Science Press and International Rice Research Institute. Beijing. pp. 27-46.

Zenkteler, M. 1971. *In vitro* production of haploid plants from pollen grains of *Atropa belladonna* L. *Experientia* 27: 1087.

Zenkteler, M. 1972. Development of embryos and seedlings from pollen grains in *Lycium halimifolium* Mill. in the *in vitro* culture. *Biol. Plant.* 14: 420-422.

Zenkteler, M. 1973. *In vitro* development of embryos and seedlings from pollen grains of *Solanum dulcamara*. *Z. Pflanzenphysiol.* 69: 189-192.

Ziauddin, A.; E. Simion y K. J. Kasha. 1990. Improved plant regeneration from shed microspore culture in barley (*Hordeum vulgare* L.) cv. Igri. *Plant Cell Rep.* 9: 69-72.

Ziauddin, A. y K. J. Kasha. 1990. Genetic stability in haploid cell cultures. En: *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 12. Y. P. S. Bajaj (Editor). Springer-Verlag. Berlín. pp. 83-98.

APENDICE

Cuadro 1A. Análisis de varianza para la variable número de anteras oscuras en medios de cultivo sólidos, con 2 tipos de agar.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F calculada
Medio de cultivo	2	32.15	21.28 **
Marca de Agar	1	0.066	0.04
Medio x Agar	2	8.516	5.64 *
Error	54	1.511	

* Significancia al 5%

** Significancia al 1%

Cuadro 2A. Comparación de medias del número de anteras oscuras en los medios sólidos utilizados.

Medio de Cultivo	Media	Grupo
MS	5.05	A
NN	5.4	A
N6	3.05	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05)

DMS = 0.78

Cuadro 3A. Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios de cultivo, para cada marca de agar.

Marca de Agar	Medio de Cultivo		
	MS	N6	NN
Agar Merck	4.4 a	3.7 a	5.3 b
Gelgro	5.7 a	2.4 b	5.5 c

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05)

DMS = 1.1

Cuadro 4A. Análisis de varianza para la variable número de anteras oscurecidas en medios líquidos con y sin agitación.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F calculada
Medio de cultivo	2	14.716	6.4 *
Agitación	1	410.816	178.76 **
Medio x Agitación	2	4.116	1.79
Error	54	2.298	

* Significancia al 5%

** Significancia al 1%

Cuadro 5A. Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios líquidos utilizados.

Medio de Cultivo	Media	Grupo
MS	5.5	A
NN	4.45	B
N6	3.8	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05)

DMS = 0.96

Cuadro 6A. Análisis de varianza para la variable número de anteras oscurecidas en medios sólidos con diferentes concentraciones de sacarosa.

Fuentes de Variación	Grados de libertad	Cuadrados Medios	F calculada
Medio de cultivo	2	19.62	9.08 *
Sacarosa	4	12.84	5.94 *
Medio x Sacarosa	8	1.92	0.89
Error	135	2.16	

* Significancia al 5%

** Significancia al 1%

Cuadro 7A. Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en los medios con diferentes concentraciones de sacarosa.

Medio de Cultivo	Media	Grupo
MS	6.38	A
NN	6.26	A
N6	5.24	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05)

DMS = 0.58

Cuadro 8A. Comparación de medias del número de anteras oscurecidas en diferentes concentraciones de sacarosa.

Sacarosa (%)	Media	Grupo
15	6.73	A
12	6.6	A
6	5.6	B
3	5.53	B
1	5.33	B

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (alfa = 0.05)

DMS = 0.75

Cuadro 9A. Nombres comunes y científicos de las plantas mencionadas en el texto.

Nombre común	Nombre científico
Alamo	<i>Populus</i> spp.
Arroz	<i>Oryza sativa</i>
Beleño	<i>Hyoscyamus niger</i>
Belladona	<i>Atropa belladonna</i>
Berenjena	<i>Solanum melongena</i>
Berenjena cimarrona	<i>Solanum torvum</i>
Berenjena peluda	<i>Solanum mammosum</i>
Berro oreja de ratón	<i>Arabidopsis thaliana</i>
Brócoli	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>italica</i>
Caña de azúcar	<i>Saccharum</i> spp.
Caucho	<i>Hevea brasiliensis</i>
Cebada	<i>Hordeum vulgare</i>
Cebada bulbosa	<i>Hordeum bulbosum</i>
Col de Bruselas	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>gemmifera</i>
Coliflor	<i>Brassica oleracea</i> var. <i>botrytis</i>
Colza, nabo	<i>Brassica napus</i>
Chile	<i>Capsicum annum</i>
Chile de árbol	<i>Capsicum frutescens</i>
Chichiquelite	<i>Solanum nigrum</i>
Espárrago	<i>Asparagus officinalis</i>
Flor de Gloria	<i>Solanum dulcamara</i>
Flor de nabo	<i>Brassica campestris</i>
Girasol	<i>Helianthus annuus</i>

Continúa

Cuadro 9A. Continuación.

Nombre común	Nombre científico
Jitomate	<i>Lycopersicon esculentum</i>
Papa	<i>Solanum tuberosum</i>
Peonía	<i>Paeonia hybrida</i>
Petunia	<i>Petunia hybrida</i>
Remolacha, acelga	<i>Beta vulgaris</i>
Tabaco	<i>Nicotiana tabacum</i>
Tabaco de perro	<i>Nicotiana clevelandii</i>
Tabaco macuche	<i>Nicotiana rustica</i>
Tabaco silvestre	<i>Nicotiana sylvestris</i>
Tabaquillo	<i>Nicotiana plumbaginifolia</i>
Toloache	<i>Datura innoxia</i>
Toloache, estramonio	<i>Datura stramonium</i>
Tomate de cáscara	<i>Physalis ixocarpa</i>
Trigo	<i>Triticum aestivum</i>
Vid	<i>Vitis spp..</i>