

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES AGRONOMICAS

EVALUACION DE LA RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO Y  
REGENERACION DE PLANTAS DE CINCO GENOTIPOS DE TRIGO

(*triticum aestivum* L.) A TRAVES DEL CULTIVO DE  
ANTERAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO



EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

En el grado académico de

LICENCIADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

7-19-1992

Guatemala, Julio de 1992

DL  
01  
T(1348)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA

RECTOR

DR. ALFONSO FUENTES SORIA

JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA

DECANO	:	Ing. Agr. Efraín Medina G.
VOCAL PRIMERO	:	Ing. Agr. Mynor Estrada
VOCAL SEGUNDO	:	Ing. Agr. Waldemar Nufio
VOCAL TERCERO	:	
VOCAL CUARTO	:	Br. Elias Raimundo
VOCAL QUINTO	:	P. Agr. Francisco Ibarra
SECRETARIO	:	Ing. Agr. Marco Romilio Estrada M.

Guatemala, 25 de Junio, 1992

Señores  
Honorable Junta Directiva  
Facultad de Agronomía  
Universidad de San Carlos.

De conformidad con las normas establecidas en la ley orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, tengo el honor de someter a su consideración el trabajo de tesis titulado:

**"EVALUACION DE LA RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS DE CINCO GENOTIPOS DE TRIGO (Triticum aestivum L.) A TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO"**

Presentado como requisito previo a optar al título de Ingeniero Agrónomo en Sistemas de Producción Agrícola, en el grado de Licenciado.

Esperando contar con la aprobación del mismo.

Atentamente,

Gustavo Adolfo Alvarez V.

## ACTO QUE DEDICO

- A MI PADRE            Luis Arturo Alvarez Barrera (QEPD)  
                          Como un tributo a su memoria en agradecimiento  
                          a sus sabias enseñanzas.
- A MI MADRE            Maria del Carmen Valenzuela Monterroso  
                          En agradecimiento por sus esfuerzos,  
                          sacrificios y desvelos para mi superación.
- A MIS HERMANOS      Alba Patricia  
                          Aura Marina  
                          Maria del Carmen  
                          Luis Arturo
- A MI ESPOSA           Odilia M. Villatoro de Alvarez  
                          Con todo el amor que le profesó.
- A MIS HIJOS           Carmen Odilia  
                          Gustavo Adolfo  
                          Que este pequeño triunfo sea un estimulo para  
                          sus vidas.
- A MI FAMILIA EN GENERAL
- A MIS AMIGOS        Sergio Alberto Borrayo  
                          Pablo Alvarez  
                          Elder Castillo  
                          Mynor Pinto

## TESIS QUE DEDICO

A: Guatemala.

A: Universidad de San Carlos de Guatemala.

A: Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

Al: Instituto Nacional Central Para Varones.

A: Mis amigos y compañeros:

José Humberto Calderón

Luz Ximena Morales

Manuel Tum Canto

Victoria Miranda Zambrano

Hector Ramazzini

Ana Renee Abril

Luis A. Caniz Terreaux

Heidy Ovalle

Carlos Caxaj Q.E.P.D.

Argentina Berganza

A: Los trabajadores de la Facultad de Agronomía,  
especialmente a:

Norma Leticia Zeledón

Elsa Odilia Vásquez

Juan José Silva

Julio Peña

Al: Campesino guatemalteco que diariamente labra  
el progreso de la patria.

## AGRADECIMIENTOS

- A1:        Ing. Agr. MSC. Edgar Oswaldo Franco por su eficiente y excelente asesoria; también por el apoyo brindado para la ejecución y redacción del presente trabajo.
- A:         Los Ing. Agr. José Humberto Calderón, Manuel Tum Canto y Rolando Udine por el apoyo moral, intelectual y físico para la ejecución, redacción final, levantado de texto y sugerencias al presente trabajo.
- A:         La señora Elma Q. de De León y a la señorita Victoria Miranda Zambrano por la ayuda brindada en el levantamiento del texto y su valiosa amistad.
- A:         Don Gustavo Pivaral y Don Santiago Rodriguez Trejo, así como a todo el personal de la finca EL NARANJITO por la ayuda brindada durante mi práctica profesional.
- A:         Mis profesores de la Facultad de Agronomía y muy especialmente a los Ingenieros Edil Rodriguez Quezada, Rolando Aguilera, Alvaro Hernandez y al Doctor José de Jesus Castro por los conocimientos que me brindaron.
- A:         Don Pascual Mendez F. y Maggie Villaseñor por la confianza depositada en mis servicios profesionales.

## CONTENIDO

		Página
	RESUMEN	iv
1.	INTRODUCCION	1
2.	PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3.	MARCO TEORICO	5
	3.1 MARCO CONCEPTUAL	5
	3.1.1 Cultivo de trigo ( <i>triticum aestivum</i> L.)	5
	A) Zonificación del cultivo	5
	B) Situación del cultivo del trigo en Guatemala.	5
	3.1.2 El cultivo de tejidos	9
	A) Antecedentes históricos	9
	3.1.3 Aplicación del cultivo de anteras en el mejoramiento de cultivos	12
	A) Desarrollo de nuevas variedades	12
	B) Producción de haploides	12
	3.1.4 Mejoramiento del trigo a través del cultivo de anteras	14
	3.1.5 Factores que influyen en la respuesta del cultivo de anteras	14
	A) Genotipo y estado fisiológico de la planta madre	14
	B) Etapa de desarrollo de la microspora	16
	C) Mejoramiento del medio de cultivo	16

D) Mejoramiento de las condiciones de cultivo	21
3.1.6 Otros estudios efectuados en trigo	22
3.2 Marco Referencial	23
3.2.1 Area experimental	23
A) Localización	23
3.2.2 Materiales y equipo	24
A) Material vegetal	24
B) Materiales y equipo de laboratorio	25
4. OBJETIVOS	26
5. HIPOTESIS	27
6. METODOLOGIA	28
6.1 Etapa de campo	28
6.1.1 Siembra de variedades de trigo	28
6.1.2 Fertilización	28
6.1.3 Manejo	28
6.2 Etapa de laboratorio	29
6.2.1 Determinación del estado uninucleado de las anteras.	29
6.2.2 Medios de inducción de callo	29
6.2.3 Extracción de anteras	31
6.2.4 Regeneración de plantas	32
6.3 Diseño experimental	33
6.4 Análisis estadístico	34
6.4.1 Modelo estadístico	34
6.4.2 Variables evaluadas	35

7. RESULTADOS	36
7.1 Inducción de callo	36
7.2 Regeneración de plantas	38
8. CONCLUSIONES	41
9. RECOMENDACIONES	42
10. BIBLIOGRAFIA	43
11. APENDICE	45

## INDICE DE CUADROS

Cuadro No.		Página
1	Porcentaje de la producción de trigo por departamento, 1982.	6
2	Producción nacional de trigo y superficie sembrada en Guatemala durante los últimos doce años.	7
3	Producción y rendimiento nacional del cultivo del trigo.	9
4	Componentes de los medios N <sub>6</sub> , Papa II y MS.	30
5	Concentración de los reguladores del crecimiento utilizados con los medios basales N <sub>6</sub> y Papa II, en la inducción de callo en anteras de trigo.	31
6	Combinación de auxinas y citoquininas utilizadas en los medios de regeneración de plantas a partir de callos en trigo.	33
7	Respuesta de la variedad ICTA-Comalapa a los medios de inducción de callo.	37
8	Respuesta a los medios de regeneración de plantas de callos derivados de medios de inducción.	39
9	Análisis de varianza realizado para los datos de la evaluación de los medios de inducción de callo para la variedad ICTA Comalapa.	46
10	Comparación de los tratamientos utilizando las varianzas del resultados de la regeneración de plantas a partir de callos inducidos.	46
11	Cuadro de datos de los callos obtenidos de los medios de inducción de callo N <sub>6</sub> y Papa II y las diferentes combinaciones de reguladores del crecimiento.	47

**EVALUACION DE LA RESPUESTA A LA INDUCCION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS DE CINCO GENOTIPOS DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.) A TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVO.**

**RESPONSE EVALUATION OF CALLUS INDUCTION AND PLANTS REGENERATION OF FIVE WHEAT GENOTYPES (*Triticum aestivum* L.) THROUGH ANTHHER CULTURE ON DIFFERENT CULTURE MEDIA.**

**RESUMEN**

El trigo es un cereal de mucha importancia en el mundo. La producción de nuevas variedades más productivas y resistentes a plagas y enfermedades es una lucha constante de los fitomejoradores.

La técnica del cultivo de anteras es uno de los métodos por los cuales se puede acelerar el proceso de producción de nuevas variedades. Para ello, como paso previo a la aplicación de técnicas, es necesario conocer la respuesta de cada uno de los genotipos a utilizar.

En el presente estudio se evaluó la capacidad de respuesta de inducción de callo y regeneración de plantas en cinco genotipos de trigo siendo estas variedades ICTA-Sara, ICTA-Saragoza, ICTA-Comalapa, Nariño 59 y la línea Mon's Imuri. Los medios de inducción de callo evaluados estuvieron constituidos por los medios basales N<sub>6</sub> y Papa II y los reguladores de crecimiento, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y ácido Naftalenacético (ANA). Para la regeneración de plantas se utilizó el medio basal de Murashige y Skoog (MS) y los reguladores del crecimiento Bencil Adenina (BA) y ácido Indolacético (AIA).

La variedad ICTA-Comalapa, tuvo respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas.

La mayor respuesta a la inducción de callo fue obtenida en el medio de inducción constituido por el medio basal N<sub>6</sub> suplementado con 2 mg/l de 2,4-D más 2 mg/l de ANA, en este medio se obtuvo el 3.66% de respuesta. En el medio de inducción de callo constituido por el medio basal Papa II suplementado con 2 mg/l de ANA se obtuvo el 2.33% de respuesta constituyendo el segundo mejor tratamiento de

inducción de callo, así mismo se observó que los callos provenientes del medio N<sub>6</sub> y la combinación hormonal indicada anteriormente, regeneración de plantas en un medio basal MS sin suplementación de hormonas, así como también los callos provenientes del medio Papa II suplementado con 2 mg/l de ANA regeneró plantas en el medio basal MS suplementado con 1 mg/l de Bencil Adenina más 0.5 mg/l de ácido Indoleacético.

Se observó que las variedades ICTA-Sara, ICTA-Saragoza, Nariño 59 y la línea Mon's Imuri no responden a la inducción de callo en los medios de inducción de callo que fueron evaluados.

## 1. INTRODUCCION

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es el cereal más importante en el mundo y en Guatemala su importancia se compara a la del maíz y el frijol en el aspecto alimenticio. Este cultivo tiene una gran significación para el país, pero la producción nacional está muy por debajo de la demanda, lo que obliga a importar grandes cantidades para satisfacer las necesidades nacionales.

Los factores que influyen en la baja producción nacional son el área de cultivo con que se cuenta, debido a sus requerimientos climáticos y la poca capacidad económica de tricultores de darle al cultivo el manejo adecuado para que las variedades expresen su potencial en el rendimiento. Así también un factor limitante de importancia es la susceptibilidad de las variedades a las enfermedades

Dentro de las técnicas de mejoramiento de las plantas actualmente se está implementando el mejoramiento "in vitro" que cubre desde el cultivo de tejidos de plantas (hojas, tallos, yemas, meristemas, embriones) hasta el cultivo de anteras e ingeniería genética.

El cultivo de anteras es una técnica relativamente nueva y tiene la ventaja de que reduce ostensiblemente el tiempo de producción de nuevas variedades. Con esta técnica se puede mejorar las características de rendimiento, resistencia a plagas y enfermedades y otras que se deseen mejorar en el trigo. Con ello se puede lograr el incremento de la producción nacional al contar con variedades más rendidoras y con características deseables.

El objeto del presente trabajo fue la evaluación de la respuesta de cinco genotipos de trigo a la inducción de callo y regeneración de plantas a través del cultivo de anteras. Se

evaluó la respuesta de las variedades de trigo ICTA-Sara, ICTA-Saragoza, ICTA-Comalapa, Nariño 59 y la línea Mon's Imuri. De los genotipos evaluados únicamente se obtuvo respuesta en la inducción de callo y regeneración de plantas en la variedad ICTA-Comalapa.

Para la evaluación de la respuesta a la inducción de callo de los cinco genotipos se utilizaron medios constituidos por los medios basales N<sub>6</sub> y Papa II suplementados con reguladores del crecimiento.

La regeneración de plantas a partir de los callos inducidos se efectuó en el medio basal de Murashige y Skoog (MS) suplementado con reguladores del crecimiento.

La variable respuesta evaluada fue la producción de callos de cada variedad en los medios de inducción y la regeneración de plantas a partir del cultivo de los callos obtenidos de los medios de inducción.

Este estudio es parte del proyecto "Mejoramiento del arroz y trigo por medio del cultivo de anteras y mutaciones inducidas" apoyado por el Organismo Internacional de Energía Atómica y que se desarrolla en la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

## 2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los métodos tradicionales de mejoramiento de plantas autógamias tienen el problema de que la producción de nuevas variedades mejoradas tardan seis o más años y la resistencia a enfermedades se pierde más rápidamente debido a la larga exposición de los materiales genéticamente avanzados a los patógenos, los cuales desarrollan nuevas razas. Al salir la nueva variedad el nivel de inóculo de la raza a la que es susceptible es alto lo que hace que la misma deba ser sustituida en corto tiempo.

El trigo (Triticum aestivum L.) es una planta autógrama de gran importancia en alimentación de nuestro país, por ello se necesita renovar constantemente las variedades, las cuales deben responder a las necesidades de rendimiento o resistencia a plagas y enfermedades, expansión del cultivo a nuevas áreas para poder satisfacer la demanda nacional.

A los métodos de mejoramiento tradicionales se han adaptado nuevas técnicas para reducir el período de producción de nuevas variedades; la más comúnmente adaptada es la del cultivo de tejidos y para el trigo muy especialmente el cultivo de anteras. El cultivo de anteras se basa en el fundamento de que una célula es totipotente y para todo caso los granos de polen son células haploides es decir que su juego cromosómico es "n", al reproducir estas células "n", en los callos, obtener plantas e inducir su diploidía, es de gran aplicación en los híbridos a los cuales ya no tendrá que

hacerse la nueva selección de campo hasta obtener líneas puras.

Por lo anteriormente expuesto, una alternativa para acelerar el proceso de producción de nuevas y mejores variedades es el cultivo de anteras "in vitro", porque a través de esta técnica se puede reducir el tiempo de obtención de variedades de trigo con las características deseadas, lo cual se lograría en la mitad de tiempo que se usa actualmente con los métodos tradicionales.

Para utilizar la técnica del cultivo de anteras en el mejoramiento se hace necesario como paso preliminar conocer la respuesta de las diferentes variedades a los medios de cultivo en la inducción de callo y regeneración de plantas, debido a que la respuesta es específica para cada genotipo.

Los genotipos con mayor respuesta son los que se utilizan para aplicar esta metodología. En Guatemala no se conoce la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas de los genotipos de trigo que se cultivan, por ello se planteó el presente estudio.

### 3. MARCO TEORICO

#### 3.1 Marco conceptual

##### 3.1.1 CULTIVO DE TRIGO (*Triticum aestivum* L.)

###### A) Zonificación del cultivo

Guatemala cuenta con áreas aptas para el cultivo de trigo. Las áreas de mayor importancia en producción están enmarcadas en las zonas agrícolas de Quetzaltenango, San Marcos, Totonicapán, Sololá, Huehuetenango, Quiché, Chimaltenango, Guatemala y Jalapa (9). El cuadro 1 muestra la producción de trigo por departamento.

###### B) Situación del cultivo de trigo en Guatemala.

Durante los últimos catorce años, la producción de trigo ha sido de 777.900 toneladas, producidas en una extensión de 464,660 hectáreas, la producción promedio anual es de 49487.5 toneladas. El cuadro 2 muestra la producción nacional de trigo y superficie sembrada en los últimos doce años. (9)

En Guatemala se producen unicamente trigos suaves y los niveles de producción estan por debajo de la demanda nacional, lo que hace importar además de la totalidad de trigos duros, cantidades de trigos suaves para

Cuadro 1. PORCENTAJE DE LA PRODUCCION DE TRIGO POR  
DEPARTAMENTO, 1982

DEPARTAMENTO	% PRODUCCION
Quetzaltenango	30.8
Chimaltenango	20.7
San Marcos	15.3
Totonicapan	13.4
Huehuetenango	6.0
Sololá	7.8
Jalapa	2.1
Quiché	1.5
Sacatepéquez	1.1
Guatemala	1.0
Santa Rosa	<u>0.3</u>
TOTAL	100.0%

FUENTE: Gremial Nacional de Trigueros

Departamento de Estadística, 1986.

CUADRO 2. PRODUCCION NACIONAL DE TRIGO Y SUPERFICIE SEMBRADA EN  
GUATEMALA DURANTE LOS ULTIMOS 12 AÑOS.

AÑOS	TONELADAS	HECTAREAS
1975/1976	49330	38640
1976/1977	62700	44870
1977/1978	39300	26740
1978/1979	60000	36120
1979/1980	63000	31500
1980/1981	50000	31500
1981/1982	45750	31500
1982/1983	46320	29610
1983/1984	60000	33180
1984/1985	55000	32200
1985/1986	78000	31500
1986/1987	58500	31500
1987/1988	60000	33600
1988/1989	50000	32200
<b>TOTAL</b>	<b>777900</b>	<b>464660</b>
<b>PROMEDIO</b>	<b>55564.28</b>	<b>33190.00</b>
Rendimiento promedio 14 años Ton/Ha. 1.67		

FUENTE: Instituto Nacional de Estadística, Gremial Nacional de Trigueros y Departamento de Cambios, Banco de Guatemala. 1989.

satisfacer la demanda nacional (14).

Actualmente se importa trigo en cantidades que superan la oferta nacional, en el periodo 1986-1987 se importaron 147,841.05 toneladas, lo que representa el 71.65% de la demanda nacional. (6,14)

Para el periodo 1987-1988 se importaron 118,471.10 toneladas de trigos duros y 16,018.37 toneladas de trigos suaves, lo que hace un 69.15% de la demanda nacional (6).

Para el periodo 1988-1989 se importaron 114,058.65 toneladas de trigos duros y 20,898.08 toneladas de trigos suaves lo que hace un 72.97% de la demanda nacional (6,14).

A consecuencia del alza de los precios de los fertilizantes en los años ochenta, el área cultivada en 1983 decreció en 6% en relación al porcentaje de 1979-1982, el rendimiento en 1983 decreció 21% en relación al porcentaje de 1979-1982. La tasa de crecimiento del área desde 1961-1965 a 1980-1982, ha sido del 2.9, el rendimiento ha aumentado en un 0.6% y la producción total se ha incrementado en un 2.5%. El cuadro 3 muestra la producción y rendimiento nacional del cultivo del trigo.

CUADRO 3. PRODUCCION Y RENDIMIENTO NACIONAL DEL CULTIVO DEL TRIGO.

DEPARTAMENTO	No. DE FINCAS	SUPERFICIE (Ha.)	PRODUCCION (Tons.)	Ton/Ha.
Quetzaltenango	9076	6167.00	10353.55	1.68
San Marcos	12933	6711.60	8358.45	1.25
Chimaltenango	5452	4027.80	7313.60	1.82
Huehuetenango	6632	4116.70	4309.75	1.05
Totonicapán	5724	2251.90	3821.30	1.70
Sololá	3444	1787.10	1282.20	0.70
Guatemala	24	238.00	311.10	1.30
Quiché	1049	569.10	700.20	1.23
Jalapa	641	448.70	644.20	1.43
Santa Rosa	21	133.70	337.30	2.52
Sacatepéquez	19	119.00	236.90	1.99
Baja Verapaz	3	8.40	12.70	1.51
Alta Verapaz	1	0.35	0.20	0.57

FUENTE: Censo Nacional Agropecuario 1979.

### 3.1.2 EL CULTIVO DE TEJIDOS

#### A) Antecedentes históricos

Mucho antes de que fuera conocida la naturaleza del ADN y el Código Genético y mucho antes de que un término como "Ingeniería Genética" se hiciera parte de nuestro vocabulario, los científicos se preguntaban si una célula vegetal aislada era "Totipotente" (contenía la información completa sobre el desarrollo de la planta entera), pregunta ésta que parecía muy académica y teórica en esa época. (16).

Haberlandt en 1902 vaticinó que podría ser posible cultivar células somáticas en medios de

cultivo. El indicaba que el medio de cultivo podía ser manipulado de tal manera que las células vegetales pudieran reproducir "in vitro" la secuencia de desarrollo que ocurre en una planta intacta. Esto induciría a su vez partiendo de una célula aislada su desarrollo hasta formar una planta completa y viable. Si ésto es demostrado, entonces estaría probado que una célula aislada es totipotente (16).

Los primeros experimentos para probar esta hipótesis fallaron porque a los científicos les faltaba experiencia en trabajar en ambientes asépticos y debido a los conocimientos deficientes sobre los requisitos de crecimiento del tejido vegetal (16).

White en 1934, treinta años después de las predicciones de Haberlandt, aisló tejido de segmentos de puntos de raíz de tomate y cultivo durante períodos prolongados en un medio líquido que contenía sales inorgánicas, extracto de levadura y sacarosa. Poco tiempo después, reemplazo exitosamente el extracto de levadura por tres vitaminas: tiamina, piridoxina y ácido nicotínico (16).

Al mismo tiempo, Gautheret en 1934 logró promover el desarrollo de callo en tejido de sauce y de otras especies leñosas, indujo al crecimiento agregando al cultivo las vitaminas de White y la auxina ácido indol- acético, que acaba de ser descubierto. En 1939, Gautheret logró establecer un cultivo de callo de la planta de tabaco con un crecimiento potencialmente ilimitado.

Las técnicas de cultivo de tejidos fueron avanzando a medida que nueva información sobre reguladores del crecimiento se generaba. Al

comienzo de los años 40, por ejemplo, se descubrió que la leche de coco estimulaba el crecimiento de los embriones de *Datura*. Además demostró que la auxina sintética ácido 2,4-diclorifenoxi-acético (2,4-D) promovía la división de células en especies vegetales que antes presentaban dificultades para hacer crecer en medios de cultivo (16).

Skoog en 1954, descubrió que el callo del tabaco proliferaba cuando se cultivaba en un medio que tenía como uno de sus ingredientes una muestra de ADN proveniente del semen de pescado. El componente activo responsable de este crecimiento prolífico fue la 6-furfurilpurina, a la que le dió el nombre de "cinetina". Cuando se agregó cinétina a los medios de cultivos, fue posible inducir la formación y proliferación de callos de un gran número de especies de plantas. Skoog y Miller 1957, lograron que las células de callos se desarrollaran como raíces o yemas, o las dos cosas, en cultivo de tejido de tabaco. Ellos comprobaron que la diferencia en raíces dependía de la proporción entre cinétina y auxina en el medio de cultivo, demostrando así la importancia de la composición del sustrato. Murashige y Skoog en 1962 publicaron un trabajo sobre composición de un medio de cultivo de tejidos de tabaco, que posteriormente fue útil para muchas especies de plantas (17).

En los años siguientes, se logró en muchas especies de plantas el completo desarrollo a partir de células aisladas, el desarrollo de plantas haploides a partir de granos inmaduros de polen mediante el cultivo de anteras y de regeneración de plantas a partir de protoplastos.

La totipotencia de una célula vegetal aislada quedó finalmente probada.

### 3.1.3 APLICACION DEL CULTIVO DE ANTERAS EN EL MEJORAMIENTO DE CULTIVOS

#### A) Desarrollo de nuevas variedades

De acuerdo a resultados obtenidos cerca de un 90% de plantas obtenidas de polen de trigo son haploides o diploides y la configuración de cromosomas de estas plantas son estables. Esto indica que las técnicas de cultivo de anteras puede ser aplicada directamente en programas de mejoramiento, las anteras de progenie de híbridos, especialmente de híbridos F1 pueden usarse como material inicial. Las buenas características complementarias de los dos padres pueden combinarse en el mejoramiento de polen haploide y se puede obtener plantas homocigóticas directamente en una generación simple, las cuales pueden evaluarse en la generación siguiente. Estas características son importantes para desarrollar en un período corto de 3 a 4 generaciones, materiales haploides o diploides en comparación al uso de métodos convencionales de mejoramiento (17).

#### B) Producción de Haploides

En años recientes científicos de China y otros países en sus investigaciones reportan que el proceso del cultivo de anteras cambia el número y estructura de cromosomas, ordenamiento de los cromosomas y fusión nuclear.

Otras características de la ingeniería de cromosomas del polen de las plantas es que no presentan apareamiento y sobrecruzamiento de sus cromosomas en la meiosis de híbridos destintos, lo que dificulta para transferir genes deseables

dentro de cultivares de distintas hibridaciones. Pero a través del cultivo de anteras combinado con distintas hibridaciones, puede ocurrir un intercambio de cromosomas y un ordenamiento de los mismos, la frecuencia de estos cambios genéticos puede incrementarse. Durante el cultivo de anteras diferentes tipos de gametos pueden fácilmente aparearse, por lo que puede obtener regeneración de plantas de varios tipos recombinantes con diferentes adiciones, sustituciones y traslocaciones (3).

#### 3.1.4 MEJORAMIENTO DEL TRIGO A TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS

El desarrollo de embriones haploides a partir de microsporas de *Datura innoxia* por cultivo de anteras se reporta por Gua Ha y Maheshwari en 1964. Desde entonces muchos científicos en China y otros países han puesto gran atención a la producción de haploides androgenéticos, principalmente porque el cultivo de anteras proporciona un excelente medio para la producción de plantas haploides, las cuales son utilizadas en la investigación básica de genética y mejoramiento de plantas. El primer trabajo de investigación en el cultivo de anteras en trigo que fue hecho por Fujii en 1970, quien utilizó seis especies; obtuvo callos en *Triticum aegilopoides* *T. diccoides*, pero con las anteras de *Triticum aestivum* no se obtuvo ninguna respuesta. Las primeras plantas originadas de anteras fueron obtenidas por J. Ouyang y compañeros en 1973 (17).

Durante la década de 1970 se lograron éxitos significativos en el cultivo de anteras por los chinos dentro de ellos J. Ouyang y compañeros; Chu y compañeros y H. Hu y compañeros, por los franceses De Buyser y Henry y los trabajos efectuados por los estadounidenses Schafeer y Baenzinger (17).

El orden de incremento en la frecuencia de inducción

de plantas verdes a partir del cultivo de anteras se ha logrado investigar los siguientes aspectos:

a) Investigaciones sistemáticas de varios factores que influyen en la respuesta en el cultivo de anteras. Por ejemplo con el mejoramiento del medio de cultivo, el promedio de incremento en la frecuencia de inducción de plantas de trigo a partir del cultivo de anteras ha aumentado de un 0.7% a 5%.

b) Se ha enfocado la utilización de la técnica del cultivo de anteras en el mejoramiento de plantas, muchas variedades nuevas y líneas de trigo obtenidas por medio del cultivo de anteras se ha desarrollado y liberado para su cultivo.

c) Se ha investigado la genética y citogenética de plantas obtenidas de cultivo de anteras de trigo, así también se han estudiado otros aspectos que incluyen las características concernientes a la habilidad de regeneración de las plantas de trigo, estabilidad genética y la variabilidad de las plantas regeneradas (15).

### 3.1.5 FACTORES QUE INFLUYEN EN LA RESPUESTA DEL CULTIVO DE ANTERAS

La frecuencia de regeneración de plantas provenientes de cultivo de anteras se ha incrementado, los siguientes factores son importantes:

1. Genotipo y estado fisiológico de la planta madre.
2. El estado de desarrollo de la microspora.
3. Medio de cultivo.
4. Condiciones de cultivo.

#### A) Genotipo y estado fisiológico de la planta madre.

El genotipo de las plantas donantes tiene una gran influencia sobre la respuesta de cultivo de anteras. En estudios realizados se observo diferencias significativas en la formación de

callos usando varias variedades y cruces diferentes. J. Ouyang y compañeros en 1983 estudiaron las bases genéticas de diferentes genotipos relacionados con la formación de callo. Lo anterior se llevó a cabo utilizando varias variedades, híbridos F1 y anteras derivadas de líneas de trigo, se evaluó la habilidad para producir callo en anteras a partir de líneas padres y diferentes híbridos F1. En la mayoría de las F1 los casos de habilidad fueron significativamente más altos que las líneas madres. Por ejemplo, cuando se usan las variedades Xiaoyan 759 y la Ketog 58 como progenitores la frecuencia de inducción callo y regeneración de plantas de híbridos F1 fueron significativamente más altas que el de los progenitores. El cultivo de anteras de líneas derivadas de F1 (Jinghong 5 x Xiaoyan 759) con fuerte vigor híbrido, no presentaron en sus progenies segregación mendeliana, para la frecuencia en la inducción de callo, así también se tuvieron tres tipos con diferentes grados de frecuencia de inducción más altos que los progenitores, inferior a los progenitores y tipo intermedio, pero todos más bajos que los híbridos F1 (15).

De acuerdo con los resultados que se han obtenido es el cultivo de anteras se puede considerar lo siguiente:

- a) La transferencia "in vitro" de la habilidad androgenética de híbridos F1 no dependen del citoplasma materno.
- b) La frecuencia de inducción de callo y regeneración de plantas es un característica heredable controlada cuantitativamente.

c) La frecuencia en la inducción de vigor híbrido solamente existe en los heterocigóticos F<sub>1</sub>, pero se puede perder en líneas homocigotas.

Esto indica que la expresión del vigor híbrido está fuertemente ligado al genotipo de la antera, pero no del genotipo del polen.

En adición, al genotipo de las plantas donantes la naturaleza de las variedades de trigo (trigo de verano o de invierno) también afecta la frecuencia en la inducción de callo y regeneración de plantas.

B) Etapa de desarrollo de la microspora.

El estado de desarrollo de la microspora es un factor importante que afecta los resultados del cultivo de anteras. Se han estudiado las fases morfológicas de desarrollo de la microspora de trigo en detalle y se ha evaluado la respuesta de las anteras en diferentes estados de desarrollo. se ha determinado que sólo aquellas anteras con microsporas en estado uninucleado medio o tardío responden a la inducción de callo y regeneración de plantas, la frecuencia de inducción en estos estados son altos (11).

C) Mejoramiento del medio de cultivo.

El medio de cultivo es uno de los factores que tienen importancia en el cultivo de anteras, su composición puede tener influencia en la frecuencia de androgénesis, algunos aspectos importantes del medio de cultivo son:

a) Concentración de Sucrosa.

Inicialmente se creyó que la concentración de sucrosa era un factor importante en el cultivo de anteras. En un principio las primeras plantas obtenidas en cultivo de anteras

utilizando una concentración de sucrosa en un rango de 3 a 6%. Puede ser que la sucrosa no solamente sea un regulador osmótico del medio pero puede ser también además una efectiva fuente de carbohidratos. En la actualidad se ha determinado que un 9% de sucrosa es apropiado para el cultivo de anteras de trigo (13).

b) Regulación del óptimo Nitrógeno-Amoníaco  
Relación Amonio-Nitrato.

Lapham en 1973 y Chu compañeros afirman que una alta concentración de iones de amonio inhiben la formación de callo de polen en cebada y arroz respectivamente. Basado en estos resultados, se ha desarrollado un nuevo medio denominado  $N_6$ , en el cual se reduce la concentración de iones amonio del medio y regula la relación óptima entre amonio y nitrógeno.

Está probado que el medio  $N_6$  es más eficiente que otros medios sintéticos para el cultivo de anteras de arroz y otros cereales incluyendo el trigo (2).

c) Desarrollo del medio de papa.

Extractos naturales de papa, camote, ñame, tomate, endospermo de arroz, y maíz cuando el grano ha empezado a llenar, fueron probados reemplazando otros componentes en un medio sintético. De los extractos arriba mencionados el extracto acuoso de papa ha mostrado buenos resultados, debido a que presenta alta frecuencia en la inducción de callo

en anteras y regeneración de plantas. El contenido de sales de papa puede variar considerablemente de acuerdo al material utilizado, ésto produce efectos en el medio. El medio de papa fue mejorado por Chung y compañeros en 1978, quienes desarrollaron un nuevo medio de papa llamado Papa II, conteniendo un 10% de extracto acuoso de papa, 1/2 macroelementos de un medio W4, hierro y la tiamina de un medio MS. La frecuencia de inducción de callo en este medio fue mucho más alta que en otros medios sintéticos para el cultivo de anteras (17).

d) Los reguladores del crecimiento

Los reguladores del crecimiento más frecuentemente utilizados son la auxinas y las citokininas.

El término de "hormona" ha sido reservado para ciertos compuesto naturales que ocurren en las plantas como reguladores del crecimiento. Aunque el ácido  $\alpha$  naftalenacético ( $\alpha$  ANA), el ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) y la Kinetina son reguladores del crecimiento no son considerados como hormonas. Las Auxinas, un grupo de compuestos que promueven la elongación celular de nuevos brotes, uno de ellos el ácido Indoleacético en ese espectro de actividad. Las citokininas las cuales promueven la división celular en los tejidos vegetales bajo ciertas condiciones de bioensayos, regula el

desarrollo y el crecimiento de alguna forma como la Kinetina (6-Furfuril-aminopurina).

La combinación de Auxinas-Citokininas es un importante suplemento en los medios de cultivo para la regulación de la división celular y la formación de órganos.

La Giberelinas no son muy utilizadas en los medios de cultivo, aunque el ácido Giberelico (GA3) ha sido usado en cultivo de meristemos.

Entre otros reguladores del crecimiento a los cuales se les ha iniciado su estudio, están el etileno en trabajos de iniciación de brotes y diferenciación de elementos traqueidales, relativamente pocos estudios han utilizado el ácido abscísico como suplemento en los medios de cultivo.

La auxinas más frecuentemente utilizadas son el ácido Indoleacético (AIA) el ácido  $\alpha$  Naftalenacético ( $\alpha$  ANA) y el ácido dos, cuatro-diclorofenoxiacético (2,4-D). En cuanto al ANA ambos isómeros  $\alpha$  y  $\beta$  están disponibles comercialmente, pero el isómero  $\alpha$  es siempre utilizado en los medios de cultivo. El isómero  $\beta$  es una auxina débil con relativamente pequeña actividad fisiológica.

La formación de callo en el cultivo de tejidos en cereales es estimulada por el ácido dos, cuatro, cinco-Triclorofeno-

xiacético (2,4,5-T), el ácido Indole-  
tres-Butírico (IBA) y el ácido P-Cloro-  
fenoxiacético (4-CPA) son también  
efectivas auxinas. El IBA es particu-  
larmente un efectivo agente enraizador.

El AIA ocurre naturalmente como  
auxina pero desafortunadamente es  
rápidamente degradada con la luz y la  
oxidación enzimática por que la AIA-  
oxidasa puede estar presente en los  
tejidos cultivados, el AIA es agregado  
a los medios en altas concentraciones  
relativamente. Aunque el  $\alpha$  ANA es un  
químico sintético , éste no está sujeto  
a la degradación enzimática como el AIA  
por lo que puede agregarse a los medios  
en bajas concentraciones. La auxina más  
efectiva para la inducción de callo en  
los medios de cultivo es el 2,4-D  
frecuentemente en ausencia de alguna  
citokinina exógena. Este herbicida es un  
poderoso supresante de la organogénesis  
y por eso no es usado en experimentos  
que involucran la inducción de raíces y  
brotes. Existen algunas excepciones  
para el requerimiento dual de auxinas y  
citokininas. Algunos cultivos requieren  
auxinas exógenas en el medio. Aunque  
algunos explantes de tejidos iniciales  
pueden tener niveles de auxinas  
endógenas el tejido cultivado  
aparentemente desarrolla una ruta de  
auxinas biosintéticas. En otros cultivos  
se ha establecido que requieren la  
adición de auxinas pero no de

citokininas.

Las citokininas más frecuentemente utilizadas en medios de cultivo son Kinetina, Benzil-adenina y Zeatina. La Kinetina y la Benzil-adenina son compuestos sintéticos mientras que la Zeatina ocurre naturalmente. Otras citokininas que ocurren naturalmente, las cuales son más costosas que la Zeatina son la Dimetil-aminopurina y la Isopentil-adenina (4).

#### D) Mejoramiento en condiciones de cultivo

##### a) Pretratamiento en frío

El tratamiento en frío antes de la inoculación de anteras puede incrementar la frecuencia en la inducción de callo. En un experimento con dos cruzamientos de trigo (Orofen x Xiaoyan 759) y (Xianyang 4 x 7497), las espigas de trigo fueron pretratadas a 4°C por 48 horas. Los resultados indicaron un aumento en el porcentaje de anteras que forman callo, en el cruce (Orofen x Xiaoyan 759) que fue un 11.7% sin tratamiento y un 20.6% con tratamiento con frío y en (Xianyang 4 X 7497) fue de 4.2% y 8.9% respectivamente. Tenemos así que la frecuencia de inducción de callo fue incrementado dos veces cuando las espigas fueron tratadas a baja temperatura (2).

##### b) Temperatura

Cuando la temperatura de los cultivos ha sido elevada o cambiada, la frecuencia de inducción de callos en trigo ha sido incrementada. Por ejemplo

en un experimento las anteras de trigo fueron incubadas a elevadas temperaturas por pocos días, luego transferidas a una temperatura normal, la frecuencia en la inducción de callo fue incrementada. El incremento de plantas verdes también se incrementó notablemente. La frecuencia de inducción de plantas verdes en la variedad Orofen fue cerca de un 10% (en un experimento de 100 anteras pueden producirse 10 plantas verdes de polen). Por lo tanto la presencia en un sólo período (cerca de 2 a 3 semanas) solamente 1 o 2 personas son necesarias para involucrarse en la inoculación de anteras para producir 400 a 500 plantas (3).

### 3.1.6 OTROS ESTUDIOS EFECTUADOS EN TRIGO

Andersen, Due y Olesen en 1987, utilizando el medio Papa II para la inducción de callo en anteras de 215 cultivares de trigo de invierno, manteniéndolas a 33 °C durante los primeros tres días y 26°C el resto del período con 15 W/m<sup>2</sup> de radiación, obtuvieron 1.3 plantas por cada 100 anteras cultivadas (1).

Ouyang y compañeros en 1984 evaluaron la respuesta del cultivo de anteras de trigo, mostrando a diferentes temperaturas usando los medios Papa II y Papa IV, evaluaron cinco variedades, tres híbridos F1 y dos líneas derivadas del cultivo de anteras y cuatro híbridos de variedades de trigo de invierno.

Se estableció que el rango de temperaturas para inducción de callo varía conforme el genotipo entre 26°C-30°C.

La gran mayoría de variedades responden entre 28-30°C. El genotipo más variable en la respuesta en comparación con el resto necesitó 33°C por ocho días y luego 25°C por el resto del período (15).

C. C. Chu y R. D. Hill en 1988 evaluaron medios mejorados por métodos de esterilización, el medio evaluado fue el N<sub>6</sub> con un suplemento en 2 mg/l de 2,4-D más 1 mg/l de ANA, más 9% de sucrosa, los medios evaluados fueron: a) medio solidificado autoclaveado, b) medio líquido autoclaveado y c) medio líquido esterilizado por filtración. Los resultados obtenidos indican que las anteras responden a la formación de callo en mayor grado en el medio esterilizado por filtración, seguido por el medio líquido autoclaveado y por último la respuesta más baja en inducción se obtuvo en medio sólido (2).

### 3.2 MARCO REFERENCIAL

#### 3.2.1 AREA EXPERIMENTAL

##### A) Localización

El presente trabajo de investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos vegetales de la Subárea de Manejo y Mejoramiento de Plantas de la Facultad de Agronomía.

El trigo para el estudio se cultivo en los campos del Centro Experimental Docente (CEDA) de la Facultad de Agronomía. El Centro Experimental de la Facultad de Agronomía se encuentra en la parte Sur de la Ciudad Universitaria, 14° 35' 11" LN y 90° 31' 18" LO y con una elevación de 1502 metros sobre el nivel del mar. En cuanto a la zona de vida, según De la Cruz, el CEDA se

encuentra en la faja termométrica altitudinal subtropical húmeda y según Holdridge, en la zona de vida del bosque montano bajo tropical. Simmons y compañeros establecen que el suelo posee una textura y consistencia franco arcillosa friable, serie Guatemala, formado de cenizas volcánicas.

Se reporta, con información de los últimos cuarenta y dos años, una precipitación media anual de 1247 mm, temperatura media de 18° , humedad relativa media de 79% y velocidad media del viento de 15.4 Km/hora (18).

### 3.2.2 MATERIALES Y EQUIPO

#### A) Material vegetal

ICTA-COMALAPA, variedad desarrollada en 1984, adaptable al altiplano central, se cultiva de 900 a 2000 msnm y a temperaturas de 10 a 26°C, su altura promedio es de 75 cm, su ciclo de siembra a madurez fisiológica es de 125 días y se puede cosechar a los 140 días, tiene un sistema radicular desarrollado lo que la hace resistente al acame, su rendimiento promedio es de 4.3 toneladas por hectarea (8).

ICTA-SARA, variedad desarrollada en 1982 adaptable al altiplano occidental, se cultiva desde 2000 a 3000 msnm y a temperaturas de 8 a 24°C su altura promedio es de 102 cms, su ciclo de siembra a la madurez fisiológica es de 134 días, su rendimiento promedio es de 6 toneladas por hectarea (8).

NARIÑO 59, variedad desarrollada en 1959 adaptable al altiplano occidental, se cultiva desde los 2000 a 3000 msnm y a temperaturas de 8 a 24°C su altura promedio es de 100 a 120

cms. es susceptible al acame, se desgrana mucho, grano de color blanco y suave, su rendimiento promedio es de 2.8 toneladas por hectarea, es resistente a *Puccinia graminis tritici* y a *Puccinia recondita* (7).

MON'S IMURI, linea en desarrollo aún no liberada por el ICTA como variedad.

ICTA SARAGOZA-87, variedad desarrollada en 1987, adaptable al altiplano central, se cultiva de 900 a 2000 msnm y a temperaturas de 10 a 26°C su altura promedio es de 75 centímetros, resistente al acame, grano de color rojo, su madurez se dá a los 120 días, su rendimiento promedio 4.3 toneladas por hectarea, es resistente a *Puccinia graminis tritici* y a *Puccinia recondita*, tolerante a *Septoria tritici* y a *Fusarium nivale* (10).

#### B) Materiales y equipo de laboratorio

Se utilizó el equipo e instalaciones del laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, balanza analítica, potenciómetro, destilador de agua, cámara de crecimiento, cuarto de crecimiento, autoclave, además cristalería e instrumental de laboratorio.

Para la elaboración de los medios de cultivo se utilizaron las sales que constituyen los medios N6, Papa II y Murashige y Skoog (MS). El cuadro 4 muestra las diferentes proporciones de las mismas en los medios de cultivo mencionados.

Para la suplementación de los medios de cultivo se utilizaron los reguladores de crecimiento, ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D), ácido indoleacético (AIA), ácido naftalenacético (ANA) y Bencil adenina (BA).

#### **4. OBJETIVOS**

- 4.1 Evaluar la respuesta en la inducción de callo en cinco genotipos de trigo a través del cultivo de anteras.**
  
- 4.2 Evaluar la respuesta en la regeneración de plantas de cinco genotipos de trigo a partir de callos provenientes del cultivo de anteras.**

## **5. HIPOTESIS**

- 5.1 Los cinco genotipos de trigo a evaluar tienen la misma capacidad de producir callo en medios de inducción de callo a través del cultivo de anteras.**
  
- 5.2 Los cinco genotipos de trigo a evaluar tienen la misma capacidad de regenerar plantas a partir de callos producidos a través del cultivo de anteras.**

## 6. METODOLOGIA

### 6.1 ETAPA DE CAMPO

#### 6.1.1 Siembra de variedades de trigo.

Para llevar a cabo esta actividad se preparó el suelo en el CEDA. La semilla de trigo fue proporcionada por el Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícola.

La siembra se realizó durante los meses de octubre y noviembre de 1983 y enero, febrero y marzo de 1989 con intervalos de ocho días se sembraron cuatro surcos de cinco metros de largo de cada uno de las variedades de trigo.

#### 6.1.2 Fertilización

Se fertilizó al momento de la siembra con 15-15-15 en una dosis de 6.8 quintales por hectarea, posteriormente se hizo una segunda fertilización con urea (46% N) a los 30 días a razón de 2.2 quintales por hectarea cuando se inició el amacollamiento del trigo; esto se hizo en base a las recomendaciones del ICTA para dichas variedades (10).

#### 6.1.3 Manejo

El control de malezas se efectuó en forma manual a los 15, 30 y 45 días después de la siembra. El riego fue aplicado por aspersión dos veces por semana a lo largo del cultivo hasta que llegó el momento del corte de las espigas para trasladarlas al laboratorio.

## 6.2 ETAPA DE LABORATORIO

### 6.2.1 Determinación del estado uninucleado de las anteras.

Para conocer el estado de desarrollo de la espiga en la cual se presenta el estado uninucleado, se observó el desarrollo de las variedades. Se determinó el momento en que el trigo inicia la formación de la inflorescencia y se estableció el estado uninucleado de las anteras para cada una de las variedades, para ello se hizo lo siguiente:

#### A) Fijación

Se fijaron las anteras en una solución compuesta por tres partes de etanol al 95% una parte de ácido acético glacial y 0.1% de cloruro férrico, por 45 minutos a 70°C.

#### B) Tinción

Las anteras se maceraron y tiñeron con una solución al 0.5% de acetocarmin, una vez teñidas las microsporas se observan los estados de desarrollo bajo un microscopio (12).

Una vez determinado el estado uninucleado de las microsporas en las anteras para cada una de las variedades, se colectaron las espigas en el punto de desarrollo que contenían microsporas en este estado.

### 6.2.2 MEDIOS DE INDUCCION DE CALLO

Se utilizaron como medios basales en la inducción de callo el medio Papa II y el medio N<sub>6</sub>. El cuadro 4 muestra la composición de cada uno de los medios basales utilizados.

Los medios basales fueron suplementados con reguladores de crecimiento, se utilizó el 2,4-D y el ANA. El cuadro 5 muestra las combinaciones de reguladores del crecimiento utilizados en la inducción de callo.

CUADRO 4. COMPONENTES DE LOS MEDIOS N<sub>6</sub>, PAPA II Y MS (mg/l).

COMPONENTES	N <sub>6</sub>	PAPA II	MS
Medio acuoso de papa	----	10%	----
KNO <sub>3</sub>	2830	1000	1900
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	----	100	----
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	400	125	170
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	----	----	1650
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	463	100	----
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	400	200	----
KCl <sub>2</sub>	----	35	----
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	166	----	440
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27.8	27.8	27.8
NaEDTA·2H <sub>2</sub> O	37.3	37.3	37.3
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	3.3	----	----
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	----	----	22.3
FeSO <sub>4</sub>	----	----	27.8
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	1.6	----	6.2
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.5	----	----
ZnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	----	----	8.6
KI	0.8	----	----
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	----	----	0.25
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	----	----	0.025
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	----	----	0.025
Tiamina-HCl	1.0	1.0	0.1
Acido Aminoacético	2.0	----	----
Piridoxina	0.5	----	0.5
Myo-inositol	----	----	100
Acido Nicotínico	0.5	----	0.5
Glicina	----	----	2.0
Sucrosa	6%	6%	1%
Agar	----	----	0.6%
pH	5.8	5.8	5.8

Se evaluaron diez tratamientos, constituidos por los dos medios basales N<sub>6</sub> y Papa II, con cinco combinaciones de los reguladores del crecimiento 2,4-D y ANA.

Para preparar los medios de cultivo se utilizaron soluciones de concentración conocida, las cuales de acuerdo a la concentración de los compuestos se prepararon en concentraciones de 10x, 100x y 1000x.

Para la inducción de callo se utilizaron medios líquidos, se colocaron 15 ml. de medio en frascos de vidrio de 120 ml. éstos fueron esterilizados en autoclave a 121°C 15 libras de presión por 15 minutos.

**CUADRO 5. CONCENTRACION DE LOS REGULADORES DEL CRECIMIENTO UTILIZADOS CON LOS MEDIOS BASALES N<sub>6</sub> Y PAPA II EN LA INDUCCION DE CALLO EN ANTERAS DE TRIGO.**

2,4-D (mg/l)	ANA (mg/l)
0.0	0.0
2.0	0.0
0.0	2.0
2.0	0.5
0.5	2.0

### 6.2.3 EXTRACCION DE ANTERAS

Una vez determinado el estado de desarrollo de las espigas en las cuales se encuentra el estado uninucleado de las microsporas, éstas fueron colectadas en el campo por la mañana, antes de las diez horas, se colocaron en papel toalla humedecida con agua destilada, se introdujeron en una bolsa de polietileno y se colocaron en un refrigerador a 6°C, durante siete días.

La extracción de las anteras se hizo en forma

aséptica para lo cual las espigas fueron esterilizadas por diez minutos en una solución de hipoclorito de sodio mediante tres lavados consecutivos con agua destilada estéril. El área de trabajo fue esterilizada con una solución de etanol al 70%.

Se procedió a la extracción de las anteras de cada espiguilla con una pinza y se colocaron en el medio preparado previamente en frascos. En cada frasco se colocaron 60 anteras provenientes de una espiga, cada tratamiento fue identificado convenientemente.

Las anteras en el medio de inducción de callo fueron incubadas en una cámara de crecimiento a temperatura constante de 28°C en la obscuridad.

La lectura de la respuesta a la inducción de callo en los medios de cultivo se realizó a los 35 días después de la siembra. Se determinó el número de callos producidos en cada uno de los tratamientos.

Una vez determinada la respuesta de los genotipos a la inducción de callos se procedió a cultivar anteras en los medios en que se obtuvo respuesta para obtener los callos necesarios para la evaluación de regeneración de plantas.

#### 6.2.4 REGENERACION DE PLANTAS

Los callos provenientes de los medios de inducción fueron trasladados al medio de regeneración, los callos inducidos en un mismo medio se mantuvieron separados.

Para la regeneración de plantas se utilizó como medio basal el medio Murashige y Skoog (MS) cuya composición se muestra en el cuadro 4.

El medio basal fue suplementado con los reguladores del crecimiento: ácido indoleacético (AIA) y Bencil Adenina (BA). El cuadro 6 muestra la concentración de los reguladores del crecimiento utilizados en el medio de regeneración de plantas.

**CUADRO 6. COMBINACION DE AUXINAS Y CITOQUININAS UTILIZADAS EN LOS MEDIOS DE REGENERACION DE PLANTAS A PARTIR DE CALLOS EN TRIGO.**

MEDIO BASAL	BA (mg/l)	AIA (mg/l)
MS - 1	0.0	0.0
MS - 2	1.0	0.5
MS - 3	2.0	0.0
MS - 4	2.0	0.5

Se tomaron 40 callos de cada medio de inducción que tuvo respuesta y se sembraron 10 callos en cada uno de los medios de regeneración. El medio de regeneración fue colocados en tubos de ensayo de 50 ml agregandole 20 ml de medio a cada tubo, en cada tubo se colocó un callo.

Los callos transferidos al medio de regeneración fueron transferidos nuevamente a los 21 días al medio basal sin reguladores del crecimiento para permitir el desarrollo de la embriogénesis y organogénesis. Las plantulas regeneradas fueron separadas del callo cuando tenían aproximadamente 3 centímetros de altura, luego fueron transferidas al medio basal MS para su posterior crecimiento.

### 6.3 DISEÑO EXPERIMENTAL

#### 6.3.1 Inducción de callo.

Se utilizó un diseño experimental estrictamente al azar con cinco repeticiones, cada frasco con 60 anteras constituía una unidad experimental. La evaluación de la respuesta de las variedades a los medios de inducción de callo se hizo en forma independiente.

### 6.3.2 Regeneración de plantas.

Se utilizó un diseño experimental estrictamente al azar, con 10 repeticiones, cada tubo con un callo constituía una repetición, los callos provenientes de un medio de inducción determinado se mantuvieron separados para esta evaluación.

## 6.4 ANALISIS ESTADISTICO

### 6.4.1 Modelo estadístico.

Para la evaluación de la respuesta de cada una de las variedades a los medios de inducción de callo se utilizó el modelo siguiente:

$$Y_{ij} = M + T_i + E_{ij}$$

Donde:

Y = Variable respuesta de la  $i$ ésima unidad experimental.

$i$  = 1, 2, 3.....10 tratamientos.

$j$  = 1, 2, 3.....5 repetición.

M = Media general de la población.

$T_i$  = Efecto del  $i$ ésimo tratamiento.

$E_{ij}$  = Efecto del error experimental asociado a la  $i$ ésima unidad experimental.

Para la evaluación de la respuesta de los callos inducidos a la regeneración de plantas se compararon las varianzas para ver si existe diferencia entre los tratamientos. Se debió utilizar este tipo de análisis debido a la naturaleza de los datos, ya que solo se obtuvo respuesta en dos de los tratamientos de regeneración.

#### 6.4.2 Variables que se evaluaron.

En los medios de inducción de callo se determinó el número de anteras que formaron callo en cada uno de los medios y su respectiva combinación hormonal en cada una de las variedades, este dato se tomó treinta y cinco días después de iniciado el cultivo de anteras.

En los medios de regeneración de plantas se determinó el número de plantas regeneradas en cada medio de regeneración. Estos datos se tomaron cuarenta y dos días después de transferidos los callos al medio de regeneración de plantas.

## 7. RESULTADOS

### 7.1 INDUCCION DE CALLO

De los cinco genotipos de trigo evaluados unicamente la variedad ICTA-Comalapa dió respuesta a la inducción de callo, siendo el tratamiento que mayor cantidad de callos produjo en el que contiene el medio basal  $N_6$  suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D más 2.0 mg/l de ANA, con este medio se obtuvo el 3.66% de respuesta. El medio de inducción de callo que contenía el medio basal Papa II suplementado con 2.0 mg/l de ANA mostro el 2.33% de respuesta a la inducción de callo y fue el segundo mejor tratamiento. Los callos obtenidos en ambos medios al momento de la lectura manifestaban una consistencia friable y una coloración blanca y con un diámetro mayor de 2 milímetros.

Sin embargo al realizar el análisis estadístico no muestra diferencia significativa entre medios de inducción de callo para la variedad ICTA-Comalapa.

Las variedades ICTA-Sara, ICTA-Saragoza, Nariño 59 y la línea Mon's Imuri no mostraron respuesta en los diferentes medios de inducción de callo evaluados.

La diferencia en respuesta a la inducción de callo entre los diferentes genotipos de trigo ha sido reportada por varios autores (1, 2, 11, 13, 15), quienes han observado que no todos los genotipos responden a los medios ensayados, requiriendo estos otros tipos de medios, incremento de reguladores, cantidades de nutrientes diferentes, uso de luz artificial por determinados períodos así como diferentes rangos de temperatura.

Se reporta que la mayor respuesta que se obtiene en medios de inducción de callo que tienen como medio basal  $N_6$  en comparación con otros medios basales se debe a la relación que existe entre el amonio y el nitrato. La alta concentración de  $KNO_3$  y baja de  $(NH_4)_2SO_4$  en el

medio N<sub>6</sub> influye considerablemente ya que las dos fuentes de nitrógeno (NO<sub>3</sub><sup>-</sup> y NH<sub>4</sub><sup>+</sup>) en las que se descomponen, son utilizadas para satisfacer las diferentes demandas por las anteras de trigo en el medio de cultivo (4, 5, 11).

C.C. Chu y R.D. Hill (2) reportan que la adición de 2,4-D y ANA en concentraciones de 2.0 y 1.0 mg/l respectivamente al medio basal N<sub>6</sub> produce respuesta en la inducción de callo en genotipos de trigo.

No se obtuvo respuesta a la inducción de callo en la variedad ICTA-Comalapa cuando el medio de inducción de callo no contenía reguladores del crecimiento, lo que indica que los reguladores del crecimiento son importantes para la formación de callos. El cuadro 7 muestra la respuesta de la variedad ICTA-Comalapa a la inducción de callo a los medios evaluados.

CUADRO 7. RESPUESTA DE LA VARIEDAD ICTA-COMALAPA A LOS MEDIOS DE INDUCCION DE CALLO.

MEDIO DE INDUCCION				
MEDIO BASAL	COMBINACION DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO		ANA	FORMACION DE CALLO %
	2,4-D	(mg/l)		
N <sub>6</sub> - 1	0.0		0.0	0.00
N <sub>6</sub> - 2	2.0		0.0	0.33
N <sub>6</sub> - 3	0.0		2.0	1.00
N <sub>6</sub> - 4	2.0		0.5	1.33
N <sub>6</sub> - 5	0.5		2.0	3.66
Papa II - 1	0.0		0.0	0.33
Papa II - 2	2.0		0.0	1.33
Papa II - 3	0.0		2.0	2.33
Papa II - 4	2.0		0.5	0.66
Papa II - 5	0.5		2.0	1.00

La respuesta de los medios de inducción de callo que contenían el medio basal Papa II suplementado con 2,4-D y ANA están dentro del rango de respuesta en la inducción de callo reportado por C.C. Chu y R.D. Hill, quienes obtuvieron una respuesta máxima de 3.3% en estudios realizados con distintas variedades (3).

Para la variedad de trigo ICTA-Comalapa la influencia de los reguladores del crecimiento está estrechamente relacionada al tipo de medio, al analizar los resultados se puede observar que el medio N6 ofrece una mejor respuesta cuando se combinan el 2,4-D y el ANA que cuando uno de éstos está solo, a diferencia del medio Papa II el cual responde mejor cuando solo está presente una de las auxinas ya sea el 2,4-D ó el ANA, que cuando éstas se encuentran combinadas en el medio, esto puede deberse a la naturaleza de los medios, ya que el medio N6 es completamente sintético a diferencia del medio Papa II que contiene un agregado de extracto acuoso de papa, en el cual van compuestos orgánicos.

Adicionalmente a esto se puede agregar que la influencia del ANA en ambos casos es determinante cuando la concentración es de 2 mg/l ya que aquí es cuando se observa la mayor respuesta de inducción de callo, estos resultados se observaron a los 35 días después de la siembra de las anteras en el medio.

## 7.2 REGENERACION DE PLANTAS

De los medios en los cuales se indujo formación de callos, regeneraron plantas los callos provenientes de los medios de inducción compuestos por el medio basal suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D más 2.0 mg/l de ANA así como del medio basal Papa II suplementado con 2.0 mg/l de ANA.

Los callos provenientes del primer medio de inducción indicado regeneraron plantas la ser transferidos al medio de regeneración compuesto

unicamente por el medio basal MS sin el suplemento de reguladores del crecimiento.

La respuesta en la regeneración fue de 170%, de los cuales el 76% de plantas fueron verdes y el 24% albinas.

Los callos provenientes del segundo medio de inducción de callo mencionado regeneraron plantas al ser transferidos al medio de regeneración compuesto por el medio basal MS suplementado con 1.0 mg/l de BA más 0.5 mg/l de AIA. En este medio se obtuvo un 60% de regeneración, de las cuales 67% fueron plantas verdes y el 33% plantas albinas. El cuadro 8 muestra la respuesta a la regeneración de plantas de los callos derivados de los medios de inducción.

Existe diferencia estadística significativa en la regeneración de plantas que se obtuvo. La mejor respuesta se obtuvo de callos cultivados en medio basal MS provenientes del medio de inducción constituido por el medio basal N<sub>6</sub> suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D más 2.0 mg/l de ANA.

CUADRO 8. RESPUESTA A LOS MEDIOS DE REGENERACION DE PLANTAS DE CALLOS DERIVADOS DE MEDIOS DE INDUCCION.

MEDIO DE ORIGEN	MEDIO DE REGENERACION	PLANTAS REGENERADAS %	PLANTAS VERDES %	PLANTAS ALBINAS %
N <sub>6</sub> - 5 (a)	MS - 1 (c)	170	76.47	23.53
PAPA II - 3 (b)	MS - 2 (d)	60	66.66	33.33

- a) N<sub>6</sub> + 0.5 mg/l de 2,4-D + 2 mg/l de ANA.  
 b) Papa II + 2 mg/l de ANA.  
 c) MS sin reguladores del crecimiento.  
 d) MS + 1.0 mg/l de BA + 0.5 mg/l de AIA.

La alta capacidad de regeneración de plantas en el medio MS sin reguladores del crecimiento se debe

basicamente a la baja concentración de 2,4-D en el medio de inducción de callo y el complemento de ANA. Según Chu y Hill (2), la baja cantidad de 2,4-D (0.25 mg/l) induce la formación de callo embriogénicos en mayor frecuencia, los cuales pueden transferirse para su posterior desarrollo a un medio sin reguladores del crecimiento.

## 8. CONCLUSIONES

1. Las variedades ICTA-Sara, ICTA-Saragoza, Nariño 59 y la línea Mon's Imuri no tienen respuesta en la inducción de callo en el cultivo de anteras, en los medios de condiciones dadas.
2. La variedad de trigo ICTA-Comalapa sí responde a la inducción de callo y regeneración de plantas utilizando el cultivo de anteras. La respuesta de ésta variedad está en el rango de respuesta de otras variedades que se han reportado.
3. Para la variedad ICTA-Comalapa el medio de inducción de callo que da mejor respuesta es el medio basal N<sub>6</sub> suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D más 2 mg/l de ANA y los callos originados por este medio regeneran plantas en un medio de regeneración a base del medio basal MS sin suplementación de hormonas.
4. Es posible utilizar la variedad de trigo ICTA-Comalapa en programas de mejoramiento utilizando el cultivo de anteras.

## 9. RECOMENDACIONES

1. Para posteriores evaluaciones in vitro con la variedad de trigo ICTA-Comalapa, se recomienda el medio de inducción de callo N<sub>6</sub> suplementado con 0.5 mg/l de 2,4-D más 2.0 mg/l de ANA y el medio de regeneración de plantas MS sin adición de reguladores del crecimiento.
2. Para el caso de las variedades ICTA-Sara, ICTA-Saragoza, Nariño 59 y la línea Mon's Imuri, se recomienda evaluar otros medios basales y otras combinaciones de reguladores del crecimiento, así como también evaluar otros factores físicos, tales como uso de luz artificial por períodos y diferentes rangos de temperatura que puedan afectar la inducción de callo.

## 10. BIBLIOGRAFIA

1. ANDERSEN, S.B.; DUE, T.K.; OLESEN, A. 1987. The response of anther culture in a genetically wide material of winter wheat (Triticum aestivum L.). *Plant Breeding* (Inglaterra) 99:181-186.
2. CHU, C.C.; HILL, R.D. 1988. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryos in Triticum aestivum L. *Plant Science* (Irlanda) 55:75-81.
3. DE BUYSER, J.; HENRY, Y. 1986. Wheat: production of haploid performance of double haploid, and yield trials. In *Biotechnology in Agriculture and Forestry*. Berlin, Springer-Verlag. p. 205-219
4. DOODS, J.H.; ROBERTS, L.W. 1985. Experiments in plant tissue culture. Estados Unidos de Norte America, Cambridge University Press. 211 p.
5. FENG, G.H.; OUYANG, J.W. 1988. The effects of KNO<sub>3</sub> concentration in callus induction medium for wheat anther culture. *Plan Cell, Tissue and Organ Culture* (Holanda) 12:3-12.
6. GUATEMALA. BANCO DE GUATEMALA. 1989. Estadística de productos agrícolas. Guatemala. 47 p.
7. -----. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS. 1979. El cultivo del trigo en la región I. Guatemala, ICTA. Folleto Técnico 8. 16 p.
8. -----. 1984. Informe técnico, programa de trigo región I. Guatemala. 53 p.
9. -----. 1986. Programa nacional del trigo. Guatemala. 62 p.
10. -----. 1987. Informe técnico, programa nacional de trigo región I. Guatemala. 55 p.
11. HAN, H. 1978. Wheat improvement through anther culture. Beijing, China, Academia Sinica, Institute of Genetics. 219 p.
12. KHAN, S.H. 1982. Technique for staining rice-chromosomes, cytología. s.n.t. 1 p.  
  
Solo sumario.

13. LIANG, G.H. et al. 1982. Polynaploid production through anther culture in common wheat. The Journal of Heredity (EE.UU.) 73:360-364.
14. OFICINA REGULADORA DE IMPORTACIONES DE TRIGO (Gua.). Libro de control de importaciones de trigo. 1980-1989. Guatemala.
- Sin publicar.
15. QUYANG, J.W.; ZHOU, S.M.; JIA, S.E. 1984. The response of anther culture temperature in wheat (Triticum aestivum L.). Theor-Appl. Genet. (EE.UU.) 67:439-442.
16. SCHILDE, L.; SCHIMMEDIÈRE, P. 1984. El cultivo de tejidos, su pasado, presente y futuro. Lima, Peru, Centro Internacional de la Papa. Circular v.11. 7 p.
17. THORPE, T.A. 1981. Plant tissue culture; methods and applications in agriculture. EE.UU. Academic Press. 379 p.
18. UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA. FACULTAD DE AGRONOMIA. 1990. Carta informativa del CELA (Gua) 1:1.

Vo. Bo.  
*Petrucci*



11. APENDICE

COMUNIDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
Biblioteca

APENDICE 1.

Análisis de varianza realizado para los datos de la evaluación de los medios de inducción de callo para la variedad ICTA-Comalapa (1989).

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.
Tratamiento	9	19.62	2.18	1.82
Error	40	4.80	1.20	
Total	49	67.62		

Según el análisis estadístico es NO Significativo, no existen diferencias entre los tratamientos.

APENDICE 2.

Comparación de dos tratamientos utilizando las varianzas del resultado de la regeneración de plantas a partir de callos inducidos, de la variedad ICTA-Comalapa (1989).

REPETICION	PLANTAS REGENERADAS DE CALLOS PROVENIENTES DEL MEDIO DE N <sub>a</sub> - 5.	REPETICION.	PLANTAS REGENERADAS DE CALLOS PROVENIENTES DEL MEDIO PAPA II 3.
1	1	1	1
2	1	2	1
3	1	3	1
4	3	4	1
5	1	5	0
6	2	6	0
7	1	7	1
8	3	8	1
9	1	9	0
10	3	10	0

$$H_0 \quad 2A = 2B$$

$$H_a \quad 2A \neq 2B$$

$$F_c = 3.37$$

$$F_t = 3.18$$

## Regla de Decisión:

$F_c > F_t$  se rechaza  $H_0$  y se acepta con un nivel de significancia de 0.05. Existe diferencia significativa entre los tratamientos de regeneración de plantas.

APENDICE 3. CUADRO DE DATOS DE LOS CALLOS OBTENIDOS DE LOS MEDIOS DE INDUCCION DE CALLO N<sub>a</sub> Y PAPA II Y LAS DIFERENTES COMBINACIONES DE REGULADORES DEL CRECIMIENTO, PARA LA VARIEDAD ICTA-COMALAPA (1989).

TRATA- MIENTO	MEDIO DE INDUC- CION.	CALLOS FORMADOS EN CADA REPETION					TOTAL DE CALLOS.	% DE FORMACION DE CALLO.
		1	2	3	4	5		
1	N <sub>a</sub> - 1	0	0	0	0	0	0	0.00
2	N <sub>a</sub> - 2	0	1	0	0	0	1	0.33
3	N <sub>a</sub> - 3	0	1	1	1	0	3	1.00
4	N <sub>a</sub> - 4	0	3	0	0	0	4	1.33
5	N <sub>a</sub> - 5	3	0	4	4	4	11	3.66
6	PAPA II-1	0	0	1	1	0	1	0.33
7	PAPA II-2	0	0	2	2	2	4	1.33
8	PAPA II-3	0	3	2	2	0	7	2.33
9	PAPA II-4	0	0	2	2	0	2	0.66
10	PAPA II-5	0	0	0	0	0	4	1.00

1. N<sub>a</sub> sin reguladores del crecimiento.
2. N<sub>a</sub> más 2.0 mg/l 2,4-D.
3. N<sub>a</sub> más 2.0 mg/l ANA.
4. N<sub>a</sub> más 2.0 mg/l 2,4-D más 0.5 mg/l ANA.
5. N<sub>a</sub> más 0.5 mg/l 2,4-D más 2.0 mg/l ANA.
6. PAPA II sin reguladores del crecimiento.
7. PAPA II más 2.0 mg/l 2,4-D.
8. PAPA II más 2.0 mg/l ANA.
9. PAPA II más 2.0 mg/l 2,4-D más 0.5 mg/l ANA.
10. PAPA II más 0.5 mg/l 2,4-D más 2.0 mg/l ANA.



UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE AGRONOMIA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES  
AGRONOMICAS

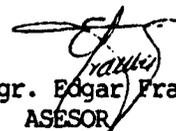
LA TESIS TITULADA: "EVALUACION DE LA RESPUESTA Y LA INDUCCION DEL CALLO Y  
REGENERACION DE PLANTAS DE CINCO GENOTIPOS DE TRIGO (Triticum aestivum L.)  
A TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS EN DIFERENTES MEDIOS DE CULTIVOS."

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: GUSTAVO ADOLFO ALVAREZ VALENZUELA

CARNET NO: 7805341

Ha sido evaluada por los profesionales: Ingenieros Agrónomos Fernando  
Rodríguez y Carlos Orozco.

El Asesor y las Autoridades de la Facultad de Agronomía hacen constar que  
ha cumplido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de  
Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

  
Ing. Agr. Edgar Franco  
ASESOR

  
Dr. Luis Mejía de León



IMPRIMASE:

  
Ing. Agr. Efraín Medina  
DECANO



lm/sler.