

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

IRRADIACION DE SEMILLAS CON RAYOS GAMMA DE 7 GENOTIPOS DE TRIGO
(*Triticum aestivum* L.) PARA EVALUAR SU RESPUESTA A LA
FORMACION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS A
TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS.

TESIS
PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA
POR

HERNAN PERLA GONZALEZ

EN EL ACTO DE INVESTIDURA COMO

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA

EN EL GRADO ACADEMICO DE

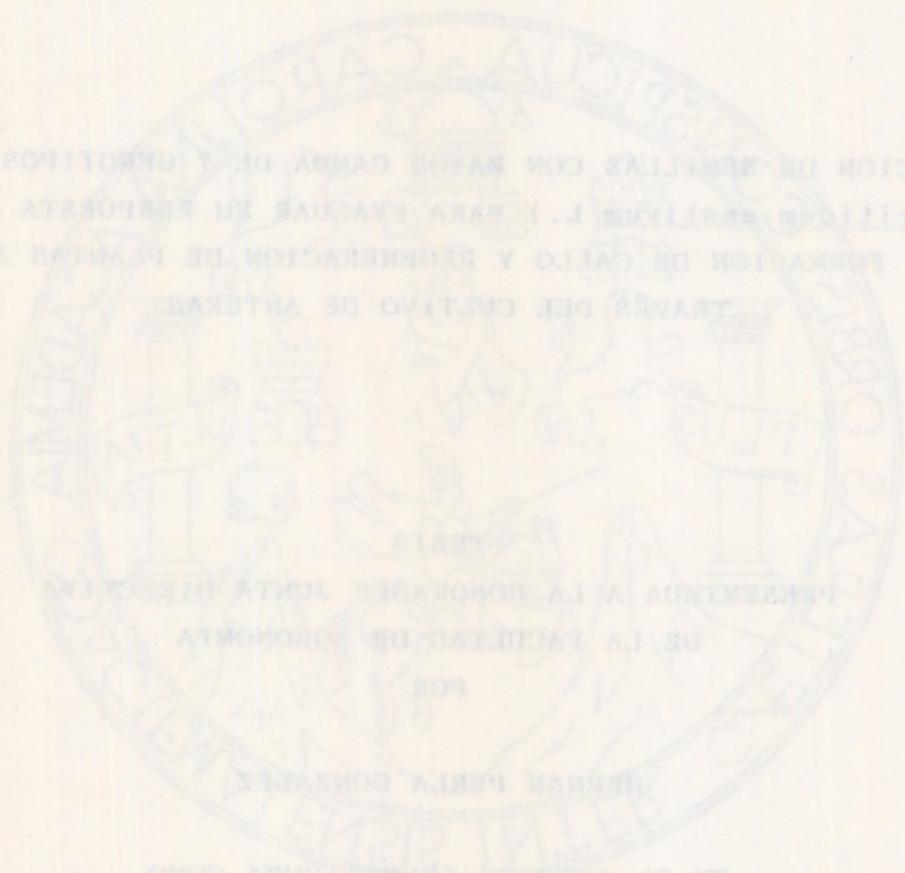
INGENIERO AGRONOMO

GUATEMALA, OCTUBRE DE 1993

PROPIEDAD DE LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

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

IRRADIACION DE SEMILLAS CON RAYOS GAMMA DE Y GRANITOS DE TRIGO
(TILLER, ROSSIGNOL J.) PARA EVALUAR SU RESPUESTA A LA
FORMACION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS A
TRAVES DEL CULTIVO DE ANTENAS



PRESENTADA A LA HONORABLE JUNTA DIRECTIVA
DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA
POR
BERNABE PERLA GONZALEZ

EN EL ACTO DE INSCRIPCION COMO

INGENIERO AGRONOMO

EN

SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA
EN EL GRADO ACADÉMICO DE

GUATEMALA, OCTUBRE DE 1993

PROPIEDAD DE LA BIBLIOTECA DE SAN CARLOS DE GUATEMALA
Biblioteca Central

DL
01
T(1410)

UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA 1963

RECTOR

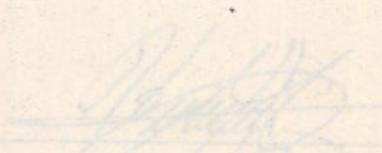
HONORABLE JUNTA DIRECTIVA DOCTOR ALFONSO FUENTES SORIA
HONORABLE TRIBUNAL EXAMINADOR
FACULTAD DE AGRONOMIA

Distinguidos señores:

De conformidad con las normas establecidas en la Ley Orgánica de la Universidad de San Carlos de Guatemala, como requisito para optar al título de INGENIERO AGRONOMO EN SISTEMAS DE PRODUCCION AGRICOLA en el grado académico de JUNTA DIRECTIVA DE LA FACULTAD DE AGRONOMIA, honor de someter a la consideración de ustedes el trabajo de tesis titulado:

- DECANO: ING. AGR. EFRAIN MEDINA GUERRA
- VOCAL PRIMERO: ING. AGR. MAYNOR ESTRADA
- VOCAL SEGUNDO: ING. AGR. WALDEMAR NUFIO REYES
- VOCAL TERCERO: ING. AGR. CARLOS R. MOTTA
- VOCAL CUARTO: P.A. ABEL SANDOVAL
- VOCAL QUINTO: BR. JUAN GERARDO DE LEON
- SECRETARIO: ING. AGR. MARCO R. ESTRADA MUY

Respetuosamente:


P.A. Bernán Perla González

ACTO QUE DEDICO

A Dios.

A mi madre:

Virgilia González Barrera

Este es un logro suyo.

Infinitas gracias por su
amor.

A mi padre:

Demicio Perla Rivera

Sea ésta una recompensa
a su esfuerzo y amor.

TESIS QUE DEDICO

A: Lourdes del Rosario Castro
Jessica Alejandra, César Hernán
y José Manuel
Mi compañera e hijos.

Andrea, Gilberto Leodán, Marta María, Leonel, Concepción y
Julio César
Mis hermanos.
Mi éxito es suyo.

Andrea Barrera Recinos
Mi abuelita.

Mis tíos, en especial a mis tías María y Cecilia.

Mis primos.

Mis sobrinos.

Mis amigos y compañeros.

Mis compañeros de trabajo.

La Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos.

Instituto Técnico de Agricultura.

La Asociación Cultural Nueva Acrópolis.

A Guatemala y su gente.

RECONOCIMIENTOS

A: Ing. M. Sc. Francisco Vásquez
Asesor.

Prof. Ernesto Carrillo
Por su orientación.

Sr. Reginaldo Soma
Por su apoyo en el trabajo de laboratorio.

Ing. Agr. Fernando Rodriguez
Ing. Agr. Héctor Ramazzini
Evaluación y correcciones finales.

Laboratorio de Cultivo de Tejidos de la Facultad de
Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala.

La Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de
Energía y Minas.

CONTENIDO

	Página
CARATULA	
CONTENIDO	
INDICE DE FIGURAS	
INDICE DE CUADROS	
RESUMEN	xiii
1. INTRODUCCION	1
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	3
3. MARCO TEORICO	4
3.1. Marco conceptual	4
3.1.1. Cultivo de tejidos	4
3.1.1.1. Historia sobre cultivo de tejidos	4
3.1.2. Cultivo de anteras	5
3.1.2.1. Inducción de embriogénesis en cultivo de anteras	5
3.1.3. Variabilidad genética en los sistemas <u>in vitro</u>	6
3.1.4. Aplicación de la mutagénesis en el mejoramiento de plantas, mediante técnicas <u>in vitro</u>	7
3.1.5. Inducción de mutaciones en anteras	8
3.1.6. Regeneración de plantas	10
3.1.7. Albinismo en cultivo de anteras	12
3.1.8. Duplicación de cromosomas	13
3.1.9. Tipo de callo y respuesta a la regeneración de plántulas de trigo	14
3.2. Marco referencial	14
3.2.1. Estudios efectuados sobre cultivo de anteras en trigo, en otros países	14
3.2.2. Estudios realizados en Guatemala con cultivo de anteras de trigo	15
4. OBJETIVOS	20
4.1. General	20
4.2. Específicos	20
5. HIPOTESIS	20

CONTENIDO

	Página
6. METODOLOGIA	20
6.1. Material experimental	20
6.1.1. Variedades de trigo	20
6.2. Area experimental	21
6.2.1. Localización	21
6.3. Irradiación de la semilla	22
6.3.1. Dosis de irradiación	22
6.3.2. Siembra de semillas irradiadas	22
6.4. Cultivo de anteras	23
6.4.1. Determinación del estado uninucleado en las microsporas de anteras.	23
6.4.2. Preparación del medio de cultivo para inducción de callos	24
6.4.3. Extracción y siembra de anteras	24
6.4.4. Regeneración de plantas	25
6.4.5.A. Medio de cultivo para regeneración	25
6.4.5.B. Transferencia de los callos a medio de regeneración	25
6.5. Diseño experimental	26
6.5.1. Inducción de callos	26
6.5.2. Diseño experimental para regeneración de plantas	27
6.6. Análisis de la información	28
6.6.1. Variables evaluadas en formación de callo	28
6.6.2. Variables evaluadas en regeneración de plantas	28
7. RESULTADOS Y DISCUSION	29
7.1. Inducción a la formación de callo	29
7.1.1. Variedades ICTA Balán, ICTA Chocoyo, ICTA Patzún, ICTA Santa Ana, ICTA Xequijel e ICTA Zaragoza	29
7.1.2. Variedad ICTA Comalapa	36
7.2. Regeneración de plantas a partir de callo	38
8. CONCLUSIONES	41
9. RECOMENDACIONES	42
10. BIBLIOGRAFIA	43

	Página
11. APENDICE	47
Apéndice 1. Composición del medio de cultivo basal N ₆ usado en la inducción de callos	47
Apéndice 2. Composición del medio de cultivo basal Murashige y Skoog -MS- (1962)	48
Apéndice 3. Cronograma	49
Apéndice 4. Glosario de términos usados en este trabajo	49

INDICE DE FIGURAS

Figura 1: Diagrama indicando el tiempo requerido para producir plantas haploides deri- vadas del cultivo de anteras (Zemetra 1990).....	12
Figura 2: Respuesta a la formación de callos de de 6 variedades de trigo según dosis de irradiación.....	32

INDICE DE CUADROS

Cuadro 1:	Efecto de dos medios basales y cinco combinaciones hormonales sobre la inducción de callo de la variedad ICTA Comalapa (Alvarez Valenzuela 1992).....	16
Cuadro 2:	Regeneración de plantas usando callos provenientes de anteras para la variedad ICTA Comalapa (Alvarez Valenzuela 1992).	17
Cuadro 3:	Resumen de los resultados obtenidos en las variedades de trigo Patzún, Chocoyo y Xequijel en los medios de inducción de callo y regeneración de plantas. (Calderón Díaz 1990).....	18
Cuadro 4:	Principales características de las variedades de trigo evaluadas.....	21
Cuadro 5:	Medio de cultivo y combinación hormonal usados en la etapa de inducción de callo para las 7 variedades de trigo estudiadas.	24
Cuadro 6:	Distribución de los tratamientos para 7 variedades de trigo.....	26
Cuadro 7:	Porcentaje de formación de callo por variedad de trigo y dosis de irradiación con rayos gamma.....	30

<p>Cuadro 8: Resultados del ANDEVA practicado al % de formación de callos, para las variedades de trigo ICTA Balán, ICTA Chocoyo, ICTA Patzún, ICTA Santa Ana, ICTA Xequijel e ICTA Zaragoza, según dosis de irradiación.....</p>	<p>33</p>
<p>Cuadro 9: Resultados de la prueba de medias Tukey practicado a la interacción Variedades * Dosis, la variable respuesta % de formación de callos se ha transformado por $(\sqrt{X+1})$. Alpha=0.05</p>	<p>35</p>
<p>Cuadro 10: Porcentaje de formación de callo para la variedad de trigo ICTA Comalapa, por dosis de irradiación.....</p>	<p>36</p>
<p>Cuadro 11: Resultados del análisis de Varianza practicado a las modalidades del factor Dosis de irradiación para la variedad de trigo ICTA Comalapa, la variable respuesta % de formación de callo se ha transformado por $(\sqrt{X+1})$.</p>	<p>37</p>
<p>Cuadro 12: Resultados de la prueba de medias Tukey practicado a las modalidades del factor dosis de irradiación para la variedad de trigo ICTA Comalapa, la variable respuesta % de formación de callo ha sido transformada por $(\sqrt{X+1})$. Alpha=0.05</p>	<p>37</p>

Cuadro 13: Resultados de regeneración de plantas de aquellos genotipos y dosis de Cobalto 60 que formaron callo a partir de anteras..... 40

Cuadro 9: Resultados de la prueba de medias Tukey practicado a la interacción Variedades x Dosis, la variable respuesta \bar{Y} de formación de callos se ha transformado por $(\sqrt{Y+1})$, Alpha=0.05..... 35

Cuadro 10: Porcentaje de formación de callo para la variedad de trigo ICTA Comalapa, por dosis de irradiación..... 38

Cuadro 11: Resultados del análisis de varianza practicado a las modalidades del factor Dosis de irradiación para la variedad de trigo ICTA Comalapa, la variable respuesta \bar{Y} de formación de callos se ha transformado por $(\sqrt{Y+1})$ 31

Cuadro 12: Resultados de la prueba de medias Tukey practicado a las modalidades del factor dosis de irradiación para la variedad de trigo ICTA Comalapa, la variable respuesta \bar{Y} de formación de callos se ha transformado por $(\sqrt{Y+1})$, Alpha=0.05..... 37

IRRADIACION DE SEMILLAS CON RAYOS GAMMA DE 7 GENOTIPOS DE TRIGO
(Triticum aestivum L.) PARA EVALUAR SU RESPUESTA A LA

FORMACION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS A
TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS.

IRRADIATION WITH GAMMA RAYS OF SEVEN GENOTYPES OF WHEAT
(Triticum aestivum L.) IN ORDER TO EVALUATE THEIR

REACTION IN THE FORMATION OF CALLUS AND THE
REGENERATION OF PLANTS THROUGH THE
CULTIVATION OF ANTERS.

RESUMEN

Este informe presenta los resultados obtenidos en la investigación realizada para evaluar la respuesta de siete genotipos de trigo (Triticum aestivum L.) a la formación de callo y regeneración de plantas, a través del cultivo de anteras, utilizando plantas provenientes de semilla irradiada con rayos gamma. El objetivo principal consistió en determinar el efecto de diferentes dosis de rayos gamma (Cobalto 60) (5, 10, 15, 20 y 25 Kilorads) y un control (0 Krads) en la respuesta a la formación de callo y regeneración de plantas, en la búsqueda de la aplicación de estas nuevas metodologías en el mejoramiento genético de nuestros materiales. Los genotipos de trigo utilizados fueron: "ICTA Balán", "ICTA Chocoyo", "ICTA Comalapa", "ICTA Patzún", "ICTA Santa Ana", "ICTA Xequijel" e "ICTA Zaragosa".

La semilla de los 7 genotipos de trigo irradiada fué cultivada en los campos del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía, de la Universidad de San Carlos de Guatemala (FAUSAC), y posteriormente se obtuvieron anteras en estado uninucleado de cada una de las variedades para su cultivo in vitro.

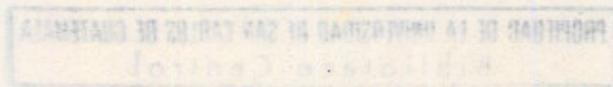
Para evaluar la formación de callo se utilizó el medio basal N₆ suplementado con 2.0 mg/L de Acido Naftalenacetico (ANA), exceptuando la variedad ICTA Comalapa, para la que se usó 1.5 mg/L de ANA + 0.5 mg/L de Kinetina. En la etapa de Regeneración de plantas se usó el medio basal MS sin hormonas para los siete genotipos.

El genotipo que presentó mejor respuesta a la inducción de callo fué "ICTA Chocoyo", con 5.4 % de formación de callo con dosis de 0 Kilorads y 2.0 % de formación de callo con la dosis de 5 Kilorads. Los materiales "ICTA Balán" e "ICTA Zaragoza" no formaron callo con ninguna dosis de irradiación. Unicamente las variedades "ICTA Chocoyo", "ICTA Patzún" e "ICTA Xequijel", fueron las que formaron callo con dosis mayores de 5 Kilorads.

En términos generales, estos resultados evidencian un efecto negativo de las radiaciones en la respuesta a la formación de callo de los diferentes genotipos de trigo.

La respuesta de los genotipos en la fase de regeneración de plantas, manifestó que el efecto de las radiaciones con rayos gamma no sigue un patrón definido como sucede en la inducción a la formación de callos. En este caso los mejores resultados fueron: "ICTA Comalapa" con dosis de irradiación de la semilla de 10 y 20 Kilorads e "ICTA Xequijel" con 5 Kilorads: 100 % de regeneración; "ICTA Patzún" con 15 Kilorads: 50.00 %; "ICTA Chocoyo" con 20 Kilorads: 66.66 % de regeneración; "ICTA Patzún" 10 y 25 Kilorads e "ICTA Zaragoza" con 0 Kilorads: 50.0 % de regeneración.

Se identificaron 3 tratamientos que reportaron resultados satisfactorios en las 2 variables de respuestas. Las variedades ICTA Comalapa con 10 y 15 Kilorads e ICTA Xequijel con 5 Kilorads, reportaron 1 % de formación de callo y 100 % de regeneración de plantas. Desde el punto de vista del mejorador lo más importante es el % de plantas regeneradas completas porque serán las que proporcionarán material genético para su programa de mejoramiento.



1. INTRODUCCION

La importancia del cultivo de trigo en Guatemala radica en que es la fuente de ingresos para buen número de agricultores del altiplano central y occidental del país. La harina de trigo es la materia prima que se usa en la elaboración de pan, pastas y otros productos, mismos que son muy usados en la dieta alimenticia humana.

Actualmente el país cuenta con un número considerable de variedades que han sido generadas por el programa de trigo del Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas (ICTA) utilizando una metodología tradicional de mejoramiento genético. La producción de trigo aún enfrenta problemas importantes entre ellos: susceptibilidad a enfermedades, ciclos productivos muy largos, baja calidad del grano y otros. Muy recientemente se está aplicando la técnica del cultivo de anteras para obtener variedades de trigo en un tiempo más corto. La interrelación entre el cultivo de anteras y la inducción de mutaciones permiten ampliar la variabilidad genética y reducir el tiempo en la generación de variedades para uso del triticulter.

En el presente estudio se evaluó la respuesta de siete variedades de trigo a la formación de callo y regeneración de plantas, utilizando la técnica de cultivo de anteras, dichas anteras eran provenientes de plantas cuyas semillas fueron irradiadas con diferentes dosis de rayos gamma. De esta forma se está generando la información básica necesaria para obtener plantas haploides que son muy importantes en programas de mejoramiento genético.

La investigación se realizó en el laboratorio de cultivo de tejidos y el Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala y forma parte del proyecto de mejoramiento de trigo que la facultad de Agronomía ha venido desarrollando con el apoyo del Organismo Internacional de Energía Atómica (OIEA).

La investigación incluyó las siguientes etapas:

1. Irradiación de la semilla de los siete genotipos de trigo; 2. Siembra de la semilla y cultivo en condiciones de campo; 3. Obtención de anteras y constatación del estado uninucleado de las microsporas; 4. Inducción a la formación de callo, mediante el cultivo de anteras en medio líquido y nutritivo; 5. Inducción a la regeneración de plantas, a través del cultivo de callos obtenidos en la etapa 4 y 6. Obtención de plántulas regeneradas a partir de callo.

De los siete genotipos evaluados, "ICTA Chocoyo" fué el que dió mejor respuesta en cuanto a formación de callo, alcanzando hasta un 5.4 % el tratamiento sin irradiación y 2.0 % para la dosis de 5 Kilorads. Por otro lado las variedades "ICTA Balán" e "ICTA Zaragoza", no formaron callo ni con la dosis mínima (5 Krads). En general las variedades que formaron callo con dosis mayores de 5 Krads. fueron: "ICTA Chocoyo", "ICTA Patzún" e "ICTA Xequijel". Lo anterior evidencia un efecto de radiación según el material genético.

Para la etapa de regeneración de plantas los mejores resultados se obtuvieron con los tratamientos: "ICTA Comalapa" con 10 y 20 Krads de irradiación a la semilla e "ICTA Xequijel" con 5 Krads de irradiación, obteniéndose 100 % de regeneración; el material "ICTA Patzún" con 15 Krads reportó 50.00 %; "ICTA Chocoyo" con 20 Krads regeneró en un 66.66 %; "ICTA Patzún" con 10 y 25 Krads. e "ICTA Zaragoza" con 0 Krads regeneraron en un 50 %.

El trabajo se realizó en el período de febrero a diciembre de 1992.

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

La búsqueda de alternativas para formular esquemas de mejoramiento genético en trigo que permitan poner a disposición de los agricultores variedades comerciales en el menor tiempo posible, es una solución viable para satisfacer la demanda de semillas mejoradas por parte de los agricultores.

Investigaciones hechas a nivel mundial en general y en Guatemala en particular, en lo que se refiere a la aplicación del cultivo de anteras en trigo, revelan la posibilidad de uso de esta metodología en los programas de mejoramiento genético de esta especie, con miras a reducir el tiempo de producción y liberación de variedades comerciales, que para Guatemala es largo. Para nuestro caso necesitamos identificar mutaciones en los genotipos a estudiar que tiendan a incrementar la tasa de formación de callo y regeneración de plantas, por tanto pretendemos obtener cambios que favorezcan la culturabilidad de los genotipos en estudio para favorecer nuestro programa de mejoramiento en esta especie. Sin embargo existe la limitante que por ser el trigo un cultivo introducido, presenta baja variabilidad genética. De la combinación del cultivo de anteras y la inducción de mutaciones puede generarse variabilidad genética de gran utilidad en programas de mejoramiento.

Se sabe que la aplicación de radiación en células, tejidos, órganos u organismos, provoca cambios en su desarrollo y en su respuesta al medio. En ese sentido hace falta establecer el efecto mutagénico de las radiaciones sobre la respuesta de algunos genotipos de trigo, a la formación de callo y regeneración de plantas con la técnica de cultivo de anteras.

3. MARCO TEORICO

La búsqueda de alternativas para formular esquemas de mejoramiento

3.1. Marco Conceptual

genético en trigo que permitan poner a disposición de las variedades comerciales en el menor tiempo posible, es una solución

3.1.1. Cultivo de Tejidos

agricultores.

3.1.1.A. Historia sobre cultivo de tejidos

Investigaciones hechas a nivel mundial en general y en Guatemala en

A lo largo de la historia se han venido sucediendo eventos que han permitido llegar a los avances actuales en el cultivo de tejidos. Así por ejemplo Hooke (1665) descubre la célula; Leeuwenhoek (1674) descubre el microscopio y permite la observación de la vida microscópica; Von Mohl (1835) describe la división celular; Schleiden y Schwann (1838-39) formulan la teoría celular; Haberlandt (1898) realizó los primeros cultivos de células (mesófilo); Kotte (1922) lleva a cabo el cultivo de ápices de raíces; Robbins, el mismo año, realiza el cultivo de raíces; Went (1926) descubre las auxinas, hormonas éstas de primordial importancia para el cultivo de tejidos; Kuster (1928) realizó trabajos con protoplastos obtenidos mecánicamente; White (1934) logró crecimiento activo de raíces; Gautheret, el mismo año, realizó cultivos a partir de cambium de plantas leñosas; White (1937) descubrió la importancia de la vitamina B para el desarrollo de raíces; Van Overbeek (1942) logró el rescate de embriones de cruces interespecíficos; Steward (1952) incorporó agua de coco al medio de cultivo; Muir (1953) realizó el cultivo de suspensiones celulares y el aislamiento de células individuales; Tulecke, ese mismo año, utilizó anteras para el cultivo de polen; Skoog (1953-55) descubre las kinetinas; Skoog y Miller (1957) obtienen regeneración de plantas a partir de callos; Murashige y Skoog (1962) establecen el medio de cultivo a partir del cultivo de tabaco; Morel (1964) logra la eliminación de virus mediante el cultivo de meristemas; Guha y Maheshwary (1964) obtienen plantas haploides a partir de anteras. (22)

3.1.2. Cultivo de anteras

El cultivo de polen *in vitro* tubo sus inicios hace unos 35 años. En 1948 La Rué fué capaz de cultivar granos de polen de *Zamia floridana*. Sin embargo antes de 1964 no se obtuvo sino únicamente formación de callo a partir de masas de granos de polen. En ese año Guha y Maheshwari reportaron que el cultivo de anteras de *Datura innoxia* originaba callo y posteriormente un gran número de embriones haploides (17).

El fin primordial de cultivar anteras y polen es llegar a obtener plantas haploides, mediante la inducción de embriogénesis a partir de microsporas o de granos de polen inmaduros (17). Al contar con plantas haploides, éstas pueden emplearse en programas de fitomejoramiento (7), o bien para desarrollar líneas homocigótas para la producción de híbridos en especies incompatibles entre sí (18). Para lograr lo anterior es requisito indispensable obtener microsporas en estado uninucleado (17).

3.1.2.A. Inducción de embriogénesis en cultivo de anteras

Para la inducción de embriogénesis pueden emplearse dos metodologías a saber:

a) Cultivar directamente las anteras aisladas en un medio con agar o en un medio líquido.

b) Extrayendo el polen de la antera, en forma mecánica o natural y cultivándolo en un medio líquido.

Reinert y Bajaj, citados por Hurtado (17), indican que si las condiciones son ideales, las plántulas haploides emergen de las anteras cultivadas entre las tres y ocho semanas después. Sin embargo, la obtención de plantas haploides puede lograrse de callos generados a partir de anteras (4).

Se ha demostrado que un tratamiento de frío a las anteras con temperaturas de 3 a 5 grados centígrados por 4 días antes de la inoculación, induce un incremento de la embriogénesis en las microsporas (20). Otros tipos de tratamientos incluyen el labado con agua de las inflorescencias por algunos días y la centrifugación de las anteras a una temperatura de 3 a 5 grados centígrados durante 30 minutos aproximadamente (17).

3.1.3. Variabilidad genética en los sistemas *in vitro*

El ambiente anómalo que se da al explante en el cultivo *in vitro*, provoca variabilidad genética (mutaciones) sin que se necesite la aplicación de mutágenos químicos o físicos. Se producen cambios en el número cromosómico (poliploidia y aneuploidia), rompimiento de los cromosomas y fragmentación nuclear, mutaciones de punto y cambios epigenéticos. A este tipo de mutaciones se le denomina "variación somaclonal".

Existe también la llamada "variación gametoclinal", que se entiende como aquella variabilidad genética que se observa en plantas derivadas del cultivo *in vitro* utilizando células gaméticas como explante (células microsporas, con número haploide de cromosomas) este tipo de variación se presenta en el cultivo de anteras y pueden identificarse variantes útiles que podrían incorporarse a un programa de mejoramiento tradicional (Vásquez, F.J. *et al.* 1991)

Algunos de los factores que influyen para que se den estos tipos de variación son:

- a) Características intrínsecas de los materiales vegetales.
- b) Uso de explantes no orgaizados como callos o células en suspensión.

- c) Stress por cambios en la temperatura y régimen de luz o por períodos muy largos de permanencia de los explantes en un medio de cultivo sin transferirse.
- d) Tipo y combinación hormonal que se use (19).

En el caso de formación de callo a partir de microsporas y también durante la inducción a la regeneración de plantas, se dan condiciones para que ocurran alteraciones en el número cromosómico (ploidías), ésto obliga a que se haga un análisis citológico para determinar que las plántulas obtenidas son realmente haploides. Se pueden originar plantas diploides heterocigóticas a partir de tejido de antera o a partir del desarrollo de las células madre de la microspora (17).

3.1.4. Aplicación de la mutagénesis en el mejoramiento de plantas, mediante técnicas in vitro

Las mutaciones inducidas han constituido una valiosa herramienta para los fitomejoradores. Al ampliarse la variabilidad genética de los cultivos, ha aumentado la posibilidad de realizar selección con mayor eficiencia en la solución de problemas que presentan los mismos (19).

La posibilidad de utilizar caracteres genéticos producidos por mutaciones inducidas, está basado en la reproducción del material producido. La base se encuentra en la posibilidad de utilizar la oportunidad de duplicación del ADN (Acido Desoxirribonucleico) para inducir mutaciones y luego reproducirlas. Por lo anterior los mecanismos utilizados por las plantas para su reproducción (totipotencia) pueden ser utilizados para producir células, tejidos u órganos mutados y con ello nuevos organismos. Por otro lado, el cultivo in vitro ofrece la posibilidad de selección a niveles iniciales de diferenciación de tejidos tratados con mutágenos (25).

La viabilidad del uso de la mutagénesis en la fitotécnia para la

mejora de cultivares de arroz, trigo y centeno ya ha quedado demostrada en diversos países, entre ellos China, Checoslovaquia, India, Indonesia, Italia, Japón y los Estados Unidos de América. Ya se han conseguido unos 240 cultivares de cereales y se han distribuido a los cultivadores entre 1976 y 1988. (25)

3.1.5. Inducción de mutaciones en anteras

La inducción de mutaciones, puede combinarse con el cultivo de anteras con fines de mejoramiento genético. El proceso tiene dos vías: una consiste en tratar la semilla con agentes mutágenos físicos o químicos, cultivar la semilla para obtener anteras de las plantas originadas y las anteras obtenidas se someten al cultivo *in vitro*. La otra vía consiste en tratar *in vitro*, los callos provenientes del cultivo de anteras obtenidas de plantas cuya semilla no ha sido irradiada. En la primera vía debe cosecharse el explante (antera), cuando ésta presenta microsporas uninucleadas en el proceso de formación del gameto masculino (19).

Las anteras con microsporas uninucleadas son extraídas y cultivadas mediante las técnicas usuales hasta la obtención de plántulas haploides, para posteriormente inducirles la duplicación cromosómica y así obtener plantas doble haploides (4, 17, 19). De esta forma se pueden obtener mutantes homocigóticos que pueden ser incluidos en un programa de mejoramiento. No solamente el tiempo requerido es corto sino, que también las posibilidades de realizar selección van más allá de las que se obtienen cuando se seleccionan plantas completas (19).

La producción de doble haploides es una técnica bien establecida para un número considerable de especies agrónomicamente importantes tales como, arroz, trigo, cebada, papa y tabaco. (25)

La progenie de una planta Doble haploide será genéticamente uniforme; de haber variaciones, serán producidas por aberraciones

cromosómicas, tales como: monosómicos, trisómicos o deleciones. Estas aberraciones darán una parcial esterilidad, lo que las evidencia (26). Las aberraciones de caracteres en plantas doble haploides, es el tipo más comunmente observado. Esto ocurrirá si las plantas obtenidas de anteras fueron genotipos F1. Las fuentes de variación de un genotipo, pueden deberse a:

Heterocigósis Residual: se dará dependiendo del método de selección utilizado y principalmente para caracteres cuantitativos. Programas donde se hace selección temprana (F2, F3 y F4), tienen gran potencial de heterocigósis residual. Este tipo de variación puede ser fijado en las plantas homocigóticas Doble haploides. La heterocigósis en plantas Doble haploides de cruzamientos F1 podría esperarse si las plantas difieren en un número grande de caracteres. Para observar esta variabilidad se necesita un número grande de plantas F1. (26)

Mutación Cromosómica: si no hay presencia de heterocigósis, pero aún se presenta variación gametoclinal, una posible causa puede ser la mutación cromosómica. La mutación cromosómica podría envolver una porción relativamente grande del ADN, que posiblemente afecta a muchos genes. Las mutaciones cromosómicas que pueden ocurrir, incluyen, inversiones y transmutaciones. Si existe una pérdida o reestructuración de una sección de un cromosoma, la expresión de muchos genes puede ser afectada. Algunos genes pueden ser expulsados por la sección de un gene, remoción de su promotor o por cambios en sus genes reguladores. Los genes pueden también ser activados por remoción de regiones del ADN regulador, o bien nuevamente afectando un gen regulador. Dependiendo de la importancia del o de los genes, el efecto puede ser grande o pequeño, pero generalmente será negativo para el comportamiento de la planta. (26)

Mutación Génica: estos cambios menores (a nivel de uno o pocos genes) pueden no ser detectados en la meiosis. La causa de este tipo de mutación podría deberse a químicos o a condiciones artificiales durante

el cultivo de tejidos, errores en la replicación y/o reparación del ADN durante la fase de callo del desarrollo del embrioides podría ser otra causa. Si el o los cambios se dan en un gen dominante, éstos serán evidentes en la planta doble haploide. (26)

3.1.6. Regeneración de plántulas

Son cuatro las áreas a superar para obtener plantas haploides a partir del cultivo de anteras, son éstas:

a) Inducción a la formación de callo

b) Regeneración de plántulas a partir del callo

c) Obtención de plantas verdes

d) Duplicación de el complemento cromosómico para obtener plantas doble haploides fértiles. (26)

La regeneración de plantas haploides a partir de callos de anteras depende del genotipo y del ambiente. Antes de iniciar un programa de cultivo de anteras, debe asegurarse que los genotipos responden al cultivo *in vitro*. Genotipos que producen buen callo podrían no producir plántulas al final del proceso, si los dos caracteres aparecen bajo diferente control genético. También el tipo de callo producido influirá en la frecuencia de regeneración. El callo embriogénico es liso, de estructuras celulares organizadas y densamente empaquetadas, puede ser oblongo o esférico dependiendo del estado de desarrollo del callo. Así el callo no embriogénico es de contorno rugoso y una estructura celular desorganizada. (26)

Se ha determinado que el medio de regeneración utilizado debe tener bajo contenido de hormonas o no tenerlas (solo medio basal) y ser

siempre sólido para obtener buena respuesta. (17,26)

El callo deberá ser transferido inmediatamente después que se ha desarrollado en el medio de inducción, principalmente si el medio de inducción es líquido; aunque también se aplica para medio sólido, debido a que si éste pasa mucho tiempo sin transferirse pierde su capacidad para regenerar plántulas. (26)

Los callos puestos en medio de regeneración desarrollan brotes y raíces entre las 2 a 5 semanas, después de ese tiempo se descarta la respuesta. Es recomendable transferir las plántulas a medio MS (Murashige y Skoog) sin hormonas para que sigan creciendo. Después de dos a cuatro semanas las plántulas podrán llevarse al campo o invernadero. A las mismas se les debe cultivar en condiciones estériles y de mucha humedad. Es recomendable eliminar parte del follaje o cubrir la parte superior de la maceta hasta que las plantas se adapten. Debe eliminarse todo el medio de las raíces para evitar contaminación por hongos. (26)

A continuación se presenta un diagrama de los pasos y tiempo requerido para obtener plantas haploides a partir del cultivo de anteras.

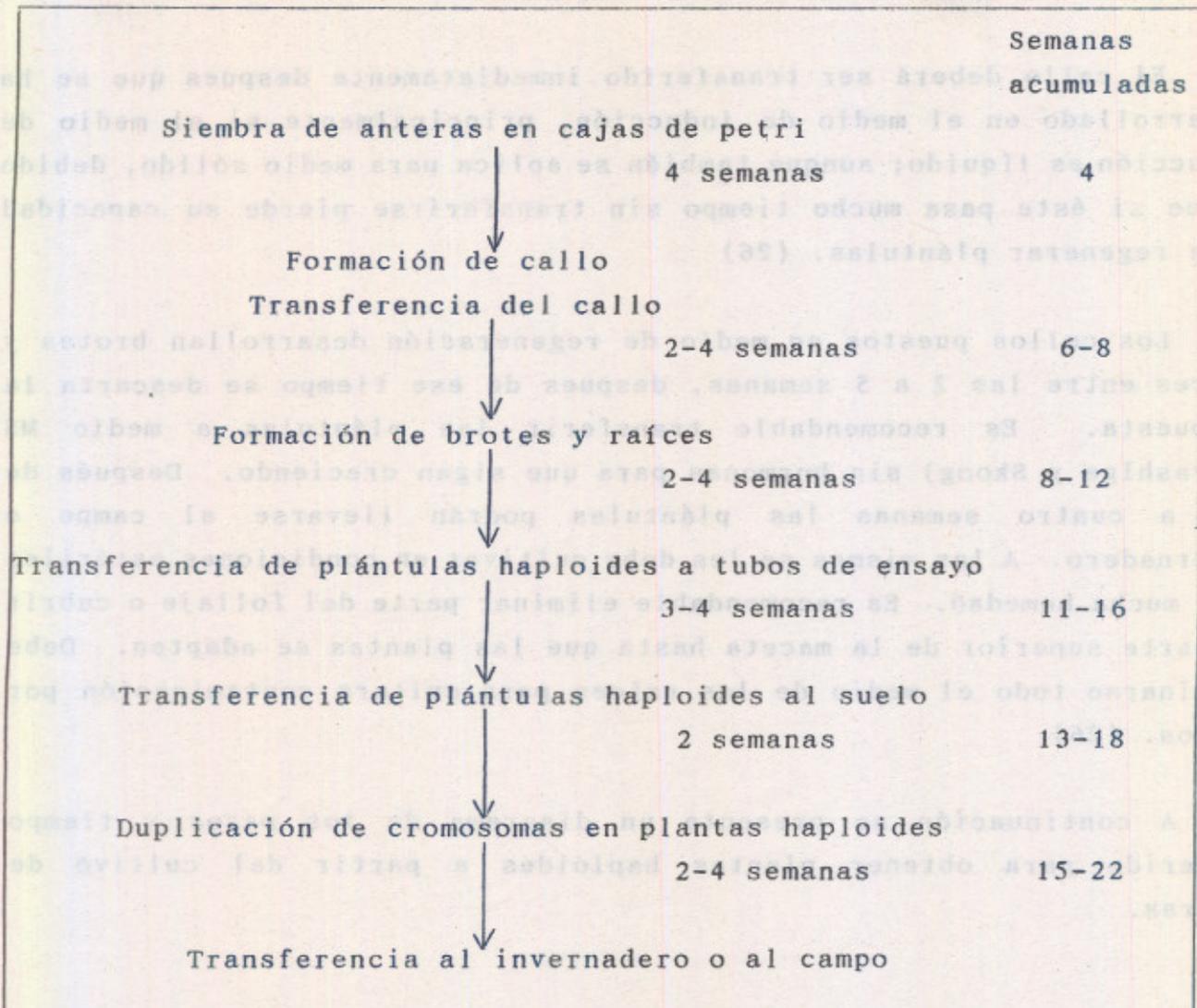


Figura 1. Diagrama indicando el tiempo requerido para producir plantas haploides derivadas del cultivo de anteras (Zemetra 1990).

3.1.7. Albinismo en cultivo de anteras

La aparición de plantas albinas, es una limitante en general en

cultivo de anteras. La causa parece ser tanto genética como ambiental, aunque se desconoce exactamente la causa genética del albinismo, sin embargo parece deberse a un cambio en la secuencia del ADN (Acido Desoxirribonucleico) en los cloroplastos. La disfunción de un cloroplasto en el trigo, resulta en una planta albina. Esta causa en el ADN del cloroplasto podría estar bajo control genético nuclear, ya que se ha observado alguna variación genotípica en la frecuencia del albinismo. (26)

La mejor hipótesis que explica la razón de la modificación del ADN del cloroplasto, es que la degradación del ADN del plastidio se inicia en la microspora reduciendo los protoplastidios en la microspora y la androtransferencia de protoplastos (herencia materna). (26)

3.1.8. Duplicación de cromosomas

El fin último del cultivo de anteras, es recuperar plantas fértiles y ésto se logra duplicando el genomio de las plantas haploides regeneradas ya que éstas son estériles. La duplicación puede ocurrir naturalmente a una tasa del 30 a 40 % de las plántulas haploides. Algunas veces puede ocurrir una no disyunción en los cromosomas durante la duplicación, resultando aneuploides. (26)

Artificialmente puede duplicarse los cromosomas, utilizando una solución de 0.1 a 0.2 % de Colchicina-2 % DMSO (Dimetyl Sulfóxido). Para un mejor resultado de la colchicina, las plantas no deberán tener las hojas recortadas sino hasta después del tratamiento. Una vez que las plantas han desarrollado 3-5 macollos se retiran del suelo y se recortan sus raíces. Las raíces y la corona, luego se ponen en la solución del colchicina-DMSO por 4-6 horas. Después del tratamiento se enjuagan con agua por 6-8 horas para eliminar los residuos de colchicina y rehidrolizar las raíces ya que el DMSO puede causar la deshidratación de las células. Se recortan los brotes del cultivo y se replanta (en la maceta) la corona. El éxito de la duplicación no se verá hasta la

formación de semilla en la postantésis o cuando se analiza citogenéticamente la primera espiga para determinar alguna anomalía en la meiosis, tales como: fragmentos, univalentes, etc. (26)

3.1.9. Tipo de callo y respuesta a la regeneración de plántulas de trigo.

La regeneración de plántulas a partir de callos provenientes de anteras de trigo, ha sido un problema difícil de vencer. La identificación de callos embriogénicos antes de inducir regeneración puede incrementar la eficiencia en la producción de plántulas (3).

Cuatro tipos de callos han sido identificados en trigo, basándose en la apariencia, después de cuatro semanas de cultivo.

Tipo I: color blanco, liso, con simetría bipolar. Se ha logrado 14 % de regeneración.

Tipo II: blanco o blanco quemado, redondo y de forma irregular. Se ha logrado un 8.8 % de regeneración.

Tipo III: blanco, liso y redondo. Porcentaje de regeneración del 5.3 %.

Tipo IV: una masa de células sueltas e hialinas. 0 % de regeneración.

3.2. Marco Referencial:

3.2.1. Estudios efectuados sobre cultivo de anteras en trigo en otros países.

Andersen, et al. (1987), trabajando con 215 cultivares de trigo de invierno y utilizando el medio de cultivo Papa II, para la inducción de callo en anteras, manteniéndolas a 33°C durante los primeros tres días y 26°C el resto del período con 15 W/m² de radiación, obtuvieron 1.3 plantas por cada 100 anteras cultivadas (2).

Ouyang y compañeros (1984), evaluaron la respuesta del cultivo de anteras de trigo, utilizando los medios Papa II y Papa IV, con cinco variedades, tres híbridos F₁ y dos líneas derivadas del cultivo de anteras y cuatro híbridos de trigo de invierno. Determinaron que el rango de temperatura para la inducción de callo varía según el genotipo entre 26 - 30 °C (21).

C.C. Chu y R.D. Hill (1988), evaluaron medios mejorados por métodos de esterilización, el medio evaluado fue el N₆ complementado con 2 mg/L de 2,4-D y 1 mg/L de ANA, mas 9 % de sucrosa. Se determinó que la respuesta de las anteras, en cuanto a formación de callo, es mejor cuando se usa medio esterilizado por filtración, seguido por el medio líquido esterilizado en autoclave y por último la respuesta más baja se obtuvo con medio de inducción sólido (5).

3.2.2. Estudios realizados en Guatemala con cultivo de anteras de trigo.

Alvarez Valenzuela (1992), evaluando la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas en cinco genotipos de trigo (Triticum aestivum L.) a través del cultivo de anteras y utilizando los medios de cultivo N₆ y Papa II, obtuvo los resultados que se muestran en el cuadro siguiente.

Cuadro 1. Efecto de dos medios basales y cinco combinaciones hormonales sobre la inducción de callo de la variedad ICTA Comalapa (Alvarez Valenzuela 1992).

Medio Basal	Combinación Hormonal 2,4-D (mg/L) ANA		Formación de callo (%) *
N ₆ - 1	0.0	0.0	0.00
N ₆ - 2	2.0	0.0	0.33
N ₆ - 3	0.0	2.0	1.00
N ₆ - 4	2.0	0.5	1.33
N ₆ - 5	0.0	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

$$\begin{aligned} * \% \text{ Formación de callo} &= \frac{\text{No. de anteras que formaron callo}}{\text{Total de anteras sembradas}} \times 100 \end{aligned}$$

Es importante señalar que de los cinco genotipos evaluados, únicamente la variedad ICTA Comalapa dió respuesta a la inducción de callo. Las otras variedades evaluadas y que no respondieron positivamente fueron: ICTA Sara, ICTA Zaragoza, Nariño 59 y la Línea Moris Imuri. (1)

Los resultados que se obtuvieron en este trabajo, en cuanto a regeneración de plántulas, fueron los siguientes:

Cuadro 2. Regeneración de plantas usando callos provenientes de anteras para la variedad ICTA Comalapa. (Alvarez Valenzuela 1992)

Medio de origen	Medio de regeneración	Plantas Totales regeneradas. (%)*	Plantas Regenerada verdes (%)	Plantas Regenerada albinas (%)
N ₆ - 5	MS basal	170	76.47	23.53
Papa II-3	MS+(1 mg/L BA+0.5 mg/L AIA)	60	66.66	33.33

*
 Plantas Tot. Reg. % = $\frac{\text{No. de plantas regeneradas}}{\text{No. total de callos sembrados}} \times 100$

Vale la pena indicar que en el cuadro anterior se obtuvieron % de de regeneración de plantas mayores del 100 %, debido a que algunos callos regeneraron más de una planta completa.

Por su parte Calderón Díaz (4), evaluando la respuesta de cinco variedades de trigo (*Triticum aestivum* L.) a la inducción de callo y regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo a partir del cultivo de anteras, obtuvo los resultados que se resumen en el cuadro 3 y que incluye únicamente aquellos tratamientos que presentaron respuesta.

Es importante indicar que los mejores resultados se obtuvieron con la variedad de trigo Chocoyo, cuando se usó medio basal Papa II suplementado con 0.5 mg/L de 2,4-D + 2.0 mg/L de ANA, se obtuvo 24.3 % de formación de callo y cuando se usó el medio basal N₆

suplementado con 2.0 mg/L de 2,4-D + 0.5 mg/L de ANA, el porcentaje de callo fué del 23.3 %.

Cuadro 3. Resumen de los resultados obtenidos en las variedades de trigo Patzún, Chocoyo y Xequijel en los medios de inducción de callo y de regeneración de plantas. (Calderón Díaz 1990)

Variedad	Medio de inducción de callo Medio basal	Reguladores del crecimiento		Producción de callo (%)	
		2,4-D (mg/L)	ANA (mg/L)		
Patzún	N6	0.0	2.0	3.0	
	N6	2.0	0.0	2.3	
	Papa II	0.5	2.0	1.0	
Chocoyo	Papa II	0.5	2.0	24.3	
	N6	2.0	0.5	23.3	
	Papa II	2.0	0.0	16.0	
	Papa II	2.0	0.5	16.0	
	Papa II	0.0	2.0	11.0	
	N6	0.0	2.0	8.3	
	N6	0.0	0.0	0.3	
Xequijel	N6	0.0	2.0	1.3	
	N6	2.0	0.0	1.0	
	Papa II	0.5	2.0	1.0	
	Papa II	2.0	0.0	0.3	
	N6	0.5	2.0	0.0	
Medio de regeneración					
Variedad	Medio Basal	Reguladores del crecimiento		Regeneración de plantas	
		AIA (mg/L)	BA (mg/L)	Verdes (%)	Albinas (%)
Patzún	MS	0.0	0.0	61.53	38.47
	MS	1.0	0.5	66.66	33.34

Franco Rivera, (1990), trabajando con cultivo de anteras de trigo con las variedades Patzún, Comalapa y Chocoyo, con la finalidad de evaluar los factores que afectan la inducción de callo y la regeneración de plantas, usó los medios basales N_6 y Papa IV, con diferentes combinaciones de los reguladores del crecimiento: 2,4-D, ANA y Kinetina; concentraciones de azúcar de 3, 6 y 9 %; pre-tratamiento de frío a las espigas de 0, 2, 4, 6, 8 y 10 días a 6°C; pH del medio de 5.7 y esterilizado a 121°C, a 15 libras por pulgada cuadrada por 15 minutos.

(9) Se determinó también el estado uninucleado de las microsporas.

Los mejores resultados de este trabajo, para cada variedad fueron los siguientes:

Variedad de trigo ICTA Patzún: 1.9 % de formación de callo, cuando se usó el medio basal N_6 , suplementado con 2.0 mg/L de ANA o 2 mg/L de 2,4-D. En otra prueba con esta misma variedad, se obtuvo hasta un 7.1 % de formación de callo con el medio basal Papa IV + 2.0 mg/L de ANA + 9 % de sucrosa y 7.6 % de formación de callo cuando se usó el mismo medio basal y la misma concentración de azúcar al medio, suplementado con 1.5 mg/L de ANA + 0.5 mg/L de Kinetina. Los resultados de regeneración de plantas en estas dos últimas pruebas fueron de 36.7 y 31.3 %, respectivamente (Franco Rivera 1,990).

Variedad de trigo ICTA Comalapa: para esta variedad se obtuvo un 4.5 % de formación de callo cuando se usó el medio basal Papa IV suplementado con 1.5 mg/L de ANA + 0.5 mg/L de Kinetina y 2.6 % de formación de callo cuando se usó el medio basal N_6 , suplementado con 2.0 mg/L de ANA (Franco Rivera 1,990).

Variedad de trigo ICTA Chocoyo: la mayor respuesta correspondió a 3.3 % de formación de callo con el medio basal N_6 , suplementado con 2.0 mg/L de 2,4-D y de 6.9 % de formación de callo, cuando se usó el medio basal N_6 , suplementado con 9 % de sucrosa + 1.5 de ANA + 0.5 de Kinetina (Franco Rivera 1,990).

4. OBJETIVOS

4.1. General

Evaluar la respuesta de siete genotipos de trigo (Triticum aestivum L.), a la formación de callo y a la regeneración de plantas, mediante la técnica de cultivo de anteras utilizando plantas provenientes de semillas irradiadas con rayos gamma.

4.2. Específicos

Evaluar el efecto de la irradiación con rayos gamma, aplicados a la semilla, sobre la formación de callo y regeneración de plantas.

5. HIPOTESIS

5.1. La respuesta a la formación de callo y regeneración de plantas de las variedades de trigo a evaluar se ven afectados por las dosis de irradiación con rayos gamma.

6. METODOLOGIA

6.1. Material Experimental

6.1.1. Variedades de trigo

En el cuadro siguiente se resumen las principales características de las variedades de trigo utilizadas en este trabajo de investigación.

Cuadro 4. Principales características de las variedades de trigo evaluadas.

Variedad	msnm recomendados para su cultivo	Rango de temperatura (°C)	Altura de planta (cm)	Días madures fisiológica.	Peso específico (Kg/Hectolitro.	Rendimiento. (Ton/Ha)	Tipo de grano	Color del grano
ICTA Balán	1,500 - 2,360		80	120	71.88	3.54	Suave	Rojo
ICTA Chocoyo	1,525 - 1,980	18 - 26	95-105	135-145	76.40	3.5-4.3		
ICTA Comalapa			75	125	73.00	2.75-3.25		
ICTA Patzún	1,525 - 1,980	18 - 24	85-95	120-125	74.00	3.5-4.5		
ICTA Santa Ana			100-106	122	76.00	3.5	Suave	Blanco
ICTA Xequijel	2,150	19 - 25	100-110	123-129	77.50	3.5-4.3		
ICTA Zaragoza			85	115		3.12	Suave	rojo

6.2. Area Experimental:

6.2.1. Localización

La investigación se desarrolló en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, invernadero y el Centro Experimental-Docente de la Facultad de Agronomía, Universidad de San Carlos de Guatemala.

Según De La Cruz S., J.R. (6), basado en el sistema de

clasificación de zonas de vida de Guatemala del Dr. L.R. Holdridge, el Centro Experimental-Decente de Agronomía se ubica dentro de la zona de vida Bosque Montano bajo Subtropical. Los suelos según Simmons (23), pertenecen a la serie Guatemala, caracterizados por ser de textura y consistencia franco arcillosa friable, formados de cenizas volcánicas. El Centro se localiza en la parte Sur de la Ciudad Universitaria, $14^{\circ}34'51''$ LN y $90^{\circ}33'16''$ LO y una elevación de 1,476 msnm (4). Cuenta con una precipitación media anual de 1,247 mm y una temperatura media anual de 18 grados centígrados (16).

El invernadero utilizado tiene techo de vidrio de dos aguas y armazón de aluminio. Cuenta con bancos de propagación fijos y un sistema de microaspersión, y ventiladores laterales mecánicos.

El Laboratorio de Cultivo de Tejidos cuenta con un área de uso común, un cuarto de transferencia o siembra equipado con una cámara doble de flujo laminar de aire, un cuarto de preparación de medios con equipo, cristalería y reactivos, un cuarto de crecimiento con estanterías metálicas y dos incubadoras con control de luz y temperatura. Además un sistema de aire acondicionado.

El trabajo incluyó las siguientes etapas:

6.3. Irradiación de la semilla

6.3.1. Dosis de irradiación

Se irradió semilla de las 7 variedades de trigo estudiadas, con dosis de 5, 10, 15, 20, y 25 Krads y un control (0 Krads), usando una fuente de rayos gamma (Cobalto 60). La irradiación se llevó a cabo en la Dirección General de Energía Nuclear del Ministerio de Energía y Minas.

6.3.2. Siembra de semillas irradiadas

Esta etapa se desarrolló en el área del Centro Experimental Docente de la Facultad de Agronomía. Se sembró una parcela por variedad, cada parcela consistió de 6 surcos y cada surco fué una dosis de irradiación. Se hicieron dos siembras, la segunda se sembró 8 días después de la primera para disponer de material vegetal (anteras) por lo menos durante 2 semanas.

6.4. Cultivo de anteras

6.4.1. Determinación del estado uninucleado en las microsporas de las anteras.

La metodología usada en este caso fué la empleada por Calderón Días, J.H. (4), y que se describe a continuación:

a) Fijación: Las espigas conteniendo anteras se fijaron en una solución compuesta por tres partes de etanol al 95 % (alcohol etílico), una parte de ácido acético glacial y 0.1 % de Cloruro férrico.

Luego se calentó la espiga en esta solución a 70 grados centígrados por 45 minutos, cuando el material se requirió de inmediato, o se dejaron en la solución fijadora durante 24 horas a temperatura ambiente con la finalidad de favorecer una mejor acción de la solución de tinción.

b) Tinción: las anteras fueron maceradas y teñidas con una solución al 0.5 % de Acetocarmin. Una vez teñidas las anteras, se procedió a observar los estados de desarrollo de las microsporas bajo el microscópio.

6.4.2. Preparación del medio de cultivo para inducción de callo.

Habiendo determinado el momento en que las microsporas estaban en estado uninucleado, se procedió a la preparación de los medios de cultivo, mismos que ya han sido establecidos para algunas variedades por Calderón Días (4), Alvarez Valenzuela (1) y Franco Rivera (9) en trabajos desarrollados en el Laboratorio de Cultivo de tejidos de la Facultad de Agronomía de la Universidad de San Carlos de Guatemala y que se detallan en el cuadro No.5

Cuadro No.5. Medio de cultivo y combinación hormonal usados en la etapa de inducción de callo para las 7 variedades estudiadas.

VARIEDAD	MEDIO BASAL	COMBINACION HORMONAL
Balán	N6	ANA* 2 mg/L
Chocoyo	N6	ANA 2 mg/L
Comalapa	N6	ANA 1.5 mg/L + Kinetina 0.5 mg/L
Patzún	N6	ANA 2 mg/L
Santa Ana	N6	ANA 2 mg/L
Xequijel	N6	ANA 2 mg/L
Zaragoza	N6	ANA 2 mg/L

Se usó 6 % de sucrosa y 0.6 % de agar.

6.4.3. Extracción y siembra de anteras

Las anteras con microsporas en estado uninucleado se recolectaron en las parcelas de campo durante las primeras horas de la mañana y se prepararon en el laboratorio para un tratamiento de frío durante 5 días a 6 grados centígrados. Luego del quinto día se sacaron del tratamiento

de frío y se desinfectaron con Hipoclorito de sodio al 0.5 % durante 15 minutos, para posteriormente darles tres lavados con agua destilada y estéril para eliminar el exceso de hipoclorito, dentro de la cámara de flujo laminar de aire. Una vez lavadas y desinfectadas las espigas, se procedió a extraer las anteras de cada espiga (un promedio de 50 anteras por espiga) mismas que se inocularon en frascos conteniendo 20 ml de medio nutritivo líquido y cuya composición se indica en el cuadro No.5. y apéndice 1.

Los frascos sellados e identificados se colocaron en una incubadora bajo oscuridad total a 27 grados centígrados mas menos 2 grados centígrados, durante 35 días, después de los cuales se hizo la primera lectura de % de formación de callo, el cual se obtuvo según la relación siguiente:

$$\% \text{ de formación de callo} = \frac{\text{No. de anteras que originaron callo}}{\text{No. total de anteras sembradas}} \times 100$$

6.4.4. Regeneración de plantas

6.4.4.A. Medio de cultivo para regeneración

Los tratamientos que después de 35 días de realizada la siembra in vitro dieron lugar a la inducción de callo, pasaron a la segunda etapa que consistió en la regeneración de plántulas haploides, por lo que se usó el medio de cultivo basal de Murashige y Skoog (MS) sin hormonas (apéndice 2), para todas las variedades de trigo.

6.4.4.B. Transferencia de los callos a medio de regeneración

Esta operación se realizó dentro de la cámara de flujo laminar de aire y los frascos conteniendo medio de regeneración y callos fueron

colocados en la cámara de crecimiento bajo las siguientes condiciones: 27 mas menos 2 grados centígrados y luz continua. Luego de 45 días se desarrolló la segunda lectura, considerando el número de plantas regeneradas.

6.5. Diseño Experimental

6.5.1. Inducción de callo

Para evaluar los tratamientos en la etapa de inducción de callo de las variedades de trigo ICTA Balán, ICTA Chocoyo, ICTA Patzún, ICTA Santa Ana, ICTA Xequijel e ICTA Zaragoza, se utilizó un diseño experimental completamente al azar con arreglo bifactorial y un diseño experimental completamente al azar simple para la variedad ICTA Comalapa, por usarse medio de cultivo diferente para ésta.

Se utilizaron diez repeticiones por tratamiento, la unidad experimental la constituyó un frasco de vidrio de 120 ml de capacidad, al cual se le agregó 20 ml del medio de cultivo líquido, cultivándose en él 50 anteras. El número de tratamientos para las 6 variedades de trigo fué de 36, mientras que para la variedad ICTA Comalapa fué de 6.

El siguiente cuadro resume los diferentes tratamientos evaluados.

Cuadro 6. Distribución de los tratamientos para las 7 variedades de trigo.

Modalidad Factores	1	2	3	4	5	6	7
Variedades de trigo	ICTA Balán	ICTA Chocoyo	ICTA Comalapa	ICTA Patzún	ICTA Sta. Ana	ICTA Xequijel	ICTA Zaragoza
'Dosis de irradiación.	0.0 Krads	5.0 Krads	10.0 Krads	15.0 Krads	20.0 Krads	25.0 Krads	

El modelo estadístico usado para el diseño experimental completamente al azar en la fase de inducción de callo para la variedad de trigo Comalapa fué:

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

Donde:

Y_{ij} = Variable respuesta
 M = Efecto de la media general
 T_i = Efecto del i -ésimo tratamiento
 E_{ij} = Efecto del error experimental.

El modelo estadístico usado para el diseño experimental completamente al azar bifactorial en la fase de inducción de callo para las variedades de trigo "ICTA Balán", "ICTA Chocoyo", "ICTA Patzún", "ICTA Santa Ana", "ICTA Xequijel" e "ICTA Zaragoza", fué:

$$Y_{ijk} = M + i + j + ij + E_{ijk}$$

Donde:

Y_{ijk} = Variable de respuesta
 M = Efecto de la media general
 α_i = Efecto de la i -ésima modalidad del factor Variedades de trigo.
 γ_j = Efecto de la j -ésima modalidad del factor dosis de irradiación.
 $\alpha\gamma_{ij}$ = Efecto de la interacción de los factores Variedades por dosis de irradiación.
 E_{ijk} = Efecto del error experimental.

6.5.2. Diseño Experimental para regeneración de plantas

Inicialmente se había planteado un diseño de bloques al completo

azar para la fase de regeneración de plantas, tanto para la variedad comalapa como para las otras seis variedades juntas; sin embargo no se obtuvo suficiente cantidad de callos para plantear el diseño experimental, por lo que se decidió trabajar con porcentajes únicamente.

6.6. Análisis de la información

Los valores obtenidos en la inducción de callo de las variedades en los dos ensayos, fueron sometidos a un análisis de Varianza (ANDEVA). Como se detectaron diferencias significativas entre los tratamientos, en ambos diseños experimentales, se practicó una prueba de medias Tukey para cada uno.

6.6.1. Variables evaluadas en formación de callos

En la fase de inducción de callo se determinó el número de anteras que formaron callo, 35 días después de la inoculación de las mismas, así:

$$\% \text{ de formación de callos} = \frac{\text{No. de anteras que formaron callo}}{\text{No. total de anteras sembradas}} \times 100$$

6.6.2. Variables evaluadas en Regeneración de plantas

Seis semanas después de transferidos los callos se determinó el número de plantas regeneradas, así:

$$\% \text{ de plantas regeneradas} = \frac{\text{No. de plantas regeneradas a partir de callos}}{\text{Total de callos inoculados}} \times 100$$

7. RESULTADOS Y DISCUSION

7.1. Inducción a la formación de callo

7.1.1. Variedades ICTA Balán, ICTA Chocoyo, ICTA Patzún, ICTA Santa Ana, ICTA Xequijel e ICTA Zaragoza.

Como se planteó en la metodología, el análisis estadístico se hizo por separado para la variedad ICTA Comalapa y para las 6 variedades restantes. Esto obedece a que para ICTA Comalapa se usó una combinación hormonal distinta a las demás variedades, debido a que es a esa combinación a la que mejor ha respondido en trabajos anteriores para inducción de callos (cuadro 5).

Todas las variedades de trigo respondieron a la inducción de callo, aunque en las variedades ICTA Balán e ICTA Zaragoza, los resultados fueron muy bajos. Alvarez Valenzuela (1), no obtuvo respuesta a la formación de callo, de estos materiales, en su trabajo de investigación.

Un detalle que vale la pena resaltar es la disminución del porcentaje de formación de callo a partir del tratamiento con 5 Kilorads en casi todas las variedades, en comparación con el tratamiento control (0 Krad); lo anteriormente expuesto nos puede indicar que el efecto de la radiación tiende a disminuir el % de formación de callos.

Cuadro 8. Resultados del ANDEVA practicado al % de formación de callos, para las variedades de trigo ICTA Balán, ICTA Chocoyo, ICTA Patzún, ICTA Santa Ana, ICTA Xequijel e ICTA Zaragoza, según dosis de irradiación.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	
Rep.	9	13.5747491	1.50830546	11.78	0.0001
Var.	5	5.9820606	1.19641214	9.35*	0.0001
Dosis.	5	7.2607257	1.45214515	11.34*	0.0001
Var*Dósi	25	6.9705857	0.27882343	2.18*	0.0012
Error	315	40.3257824	0.12801836		
Total	359	74.1139037			

C.V. = 31.51968

Aparentemente el Coeficiente de Variación (C.V.) es muy elevado, pero este fenómeno se justifica por el alto número de unidades experimentales con cero por ciento (0 %) de formación de callos, que normalmente se obtienen en este tipo de trabajos.

La prueba de medias Tukey practicado a la interacción de los factores Variedades de trigo X Dosis de irradiación (Cuadro 11), reafirma los resultados del cuadro 7, en el sentido de que fué el tratamiento ICTA Chocoyo sin irradiación el que permitió el mayor valor de % de formación de callos. Es importante indicar que fué esta variedad con la que mejor resultadose obtuvo en la investigación realizada en 1990 por Calderón Díaz (4), quien obtuvo hasta un 24.3 % de formación de callos cuando usó el medio basal "Papa II" complementado con 0.5 mg/L de 2,4-D + 2 mg/L de Acido Naftalenacético; sin ningún tipo de irradiación.

Los tratamientos "ICTA Xequijel - 0 Kilorads", "ICTA Chocoyo - 5 Kilorads", "ICTA Patzún - 5 Kilorads", "ICTA Patzún - 0 Kilorads" e "ICTA Xequijel - 5 Kilorads" con los porcentajes de formación de callo

de 2.4, 2.0, 1.2, 1.0 y 1.0, respectivamente, son estadísticamente iguales y los que mejor respondieron, después de "ICTA Chocoyo - 0 Kilorads". El resto de tratamiento tuvieron una respuesta muy pobre o no la tuvieron.

Tal y como se mencionó anteriormente, dosis mayores de 5 kilorads de irradiación a la semilla de trigo, afectó negativamente la formación de callos a partir de anteras, aunque existen algunas excepciones, puede verse que el tratamiento "ICTA Chocoyo - 20 Kilorads" en comparación a "ICTA Santa Ana - 0 Kilorads", dió un % de formación de callos mayor.

Variedad	5	10	15	20
Forma	112	40,337824	0,180136	
Total	124	24,113907		

Apresentando el Coeficiente de Variación (C.V.) es muy elevado, pero este fenómeno se justifica por el alto número de unidades experimentales con cero por ciento (0%) de formación de callos, que normalmente se obtienen en este tipo de trabajos.

La prueba de medias Tukey practicado a la interacción de los factores Variedades de trigo X Dosis de irradiación (Cuadro III), resultan los resultados del cuadro I, en el sentido de que fue el tratamiento ICTA Chocoyo sin irradiación el que permitió el mayor valor de % de formación de callos. Es importante indicar que los resultados con la que mejor resultados obtuvo en la investigación realizada en 1970 por Calderón Díaz (4), quien obtuvo hasta un 24.3% de formación de callos cuando usó el medio basal "Papa II" complementado con 0.2 mg/L de 2,4-D + 1 mg/L de ácido Nalantactico; sin ningún tipo de irradiación.

Los tratamientos "ICTA Xepujel - 0 Kilorads", "ICTA Chocoyo - 2 Kilorads", "ICTA Santa Ana - 2 Kilorads", "ICTA Santa Ana - 5 Kilorads" y "ICTA Xepujel - 5 Kilorads" con los porcentajes de formación de callos

Cuadro 9. Resultados de la Prueba de Medias Tukey practicado a la interacción Variedades * Dosis, la variable respuesta % de formación de callos se ha transformado por $(\sqrt{X+1})$. Alpha= 0.05

VARIEDAD	DOSIS	MEDIA	AGRUPAMIENTO
ICTA Chocoyo	0 Kilorads	2.18615740	A
ICTA Xequijel	0 Kilorads	1.65275690	B
ICTA Chocoyo	5 Kilorads	1.51984420	B C
ICTA Patzún	5 Kilorads	1.36138680	B C D
ICTA Patzún	0 Kilorads	1.34322170	B C D
ICTA Xequijel	5 Kilorads	1.28818180	B C D
ICTA Chocoyo	10 Kilorads	1.23778010	C D
ICTA Patzún	10 Kilorads	1.21961500	C D
ICTA Chocoyo	15 Kilorads	1.16457510	C D
ICTA Chocoyo	20 Kilorads	1.16457510	C D
ICTA Sta. Ana	5 Kilorads	1.16457510	C D
ICTA Zaragoza	0 Kilorads	1.14641000	C D
ICTA Patzún	15 Kilorads	1.12360670	D
ICTA Balán	0 Kilorads	1.07320500	D
ICTA Patzún	25 Kilorads	1.07320500	D
ICTA Sta. Ana	0 Kilorads	1.07320500	D
ICTA Xequijel	10 Kilorads	1.07320500	D
ICTA Balán	5 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Balán	10 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Balán	15 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Balán	20 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Balán	25 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Chocoyo	25 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Patzún	20 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Sta. Ana	10 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Sta. Ana	15 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Sta. Ana	20 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Sta. Ana	25 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Xequijel	15 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Xequijel	20 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Xequijel	25 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Zaragoza	5 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Zaragoza	10 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Zaragoza	15 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Zaragoza	20 Kilorads	1.00000000	D
ICTA Zaragoza	25 Kilorads	1.00000000	D

7.1.2. Variedad ICTA Comalapa

La respuesta de esta variedad es diferente a las anteriores, por cuanto en el cuadro 10 puede observarse que las dosis de 0 y 25 Kilorads, no formaron callo. En este caso fueron las dosis intermedias (5, 10, 15 y 20 Kilorads), las que permitieron la formación de callo.

Debe recordarse que cada genotipo responde de manera diferente a la radiación expresada en la formación de callo de los explantes provenientes de anteras de plantas irradiadas.

Del análisis de varianza (cuadro 11), se desprende que estadísticamente si hay diferencias significativas entre las dosis de irradiación aplicados a esta variedad.

Cuadro 10. Porcentaje de formación de callo para la variedad de trigo ICTA Comalapa, por dosis de irradiación.

DOSIS DE IRRADIACION	% DE FORMACION DE CALLO (Media de 10 repeticiones)	No. de callos obtenidos en las 10 repeticiones.
0 Kilorads	0.0	0.0
5 Kilorads	1.0	5.0
10 Kilorads	1.0	5.0
15 Kilorads	1.0	5.0
20 Kilorads	0.8	4.0
25 Kilorads	0.0	0.0

Cuadro 11. Resultados del análisis de Varianza, practicado a las modalidades del factor Dosis de irradiación para la variedad de trigo ICTA Comalapa, la variable respuesta % de formación de callo se ha transformado por $(\sqrt{X+1})$.

F.V.	G.L.	S.C.	C.M.	F.C.	
Repetic.	9	4.4041712	0.4893523	7.99*	0.0001
Dosis	5	1.4765248	0.2953047	4.82*	0.0013
Error	45	2.7546076	0.0612135		
Total	59	8.6353037			

C.V. = 20.27292

Estadísticamente no se encontró diferencia entre las dosis 5, 10, 15 y 20 Kilorads, que fueron los valores más altos en cuanto a la formación de callo.

Cuadro 12. Resultados de la Prueba de Medias Tukey practicado a las modalidades del factor dosis de irradiación para la variedad de trigo ICTA Comalapa, la variable respuesta % de formación de callo ha sido transformado por $(\sqrt{X+1})$. Alpha = 0.05.

TRATAMIENTOS (Dosis de irrad.)	MEDIA	AGRUPAMIENTO TUKEY
10 Kilorads	1.343	A
15 Kilorads	1.343	A
5 Kilorads	1.343	A
20 Kilorads	1.293	A B
0 Kilorads	1.000	B
25 Kilorads	1.000	B

Tratamientos con la misma letra no son significativamente diferentes.

7.2. Regeneración de plantas a partir de callo

Para la regeneración de plantas a partir de callos de anteras, no se estableció ningún diseño experimental porque no se contó con suficiente cantidad de callos, por lo tanto los resultados obtenidos se presentan únicamente como porcentajes.

De los 18 tratamientos estudiados, 2 de ellos experimentaron únicamente rizogénesis (apéndice 4), siendo éstos: "ICTA Balán" con 0 Krads, e "ICTA Patzún" con 20 Krads. Como se sabe el tipo de estructura que se desarrolle (brotes o raíces), va a depender de la proporción hormonal interna del explante y del medio de cultivo; además debe indicarse que cuando se dá el fenómeno de rizogénesis, previo a la formación de brotes, es muy difícil que se formen estructuras o brotes aéreos, por lo que en estos casos lo recomendable será determinar el medio de cultivo y la combinación hormonal que induzcan la regeneración de plantas verdes completas. (17)

Para la variedad ICTA Chocoyo, se obtuvo regeneración de plantas verdes completas para los tratamientos: 5 Kilorads: 40.00 % de regeneración y 20 Kilorads: 66.66 % de regeneración, estos resultados pueden indicar que para el proceso de regeneración de plantas, la dosis de irradiación no tiene una influencia tan definida, como para el proceso de formación de callo. (15)

La respuesta de la variedad de trigo ICTA Comalapa, de alguna manera sigue el patrón de la variedad ICTA Chocoyo, por cuanto que para dosis de 10 y 20 Kilorads, se obtuvo un 100 % de regeneración de plantas y 0 % para los tratamientos 5 y 15 Kilorads. Para esta variedad no se observó rizogénesis.

ICTA Patzún regeneró plantas verdes completas para los tratamientos 10, 15 y 25 Kilorads, en un 50.0 %; mientras que con la dosis de 20 Kilorads, sólo formó raíces en un 75 %.

La variedad ICTA Santa Ana, no regeneró plantas; mientras que ICTA Xequijel, si regeneró plantas para los tratamientos evaluados así: 5 Kilorads: 100 % y 20 Kilorads: 50.00 %.

Por último "ICTA Zaragoza", regeneró en un 50.0 % para el tratamiento sin irradiación.

En este trabajo no se consideraron las plantas albinas debido a que su número fué insignificante.

Como se observa en el cuadro 15, se identificaron 3 tratamientos que reportan resultados satisfactorios en las 2 variables de respuestas. Las variedades ICTA Comalapa con 10 e ICTA Xequijel con 5 Kilorads, reportaron 1 % de formación de callo mientras que ICTA Comalapa con 20 Kilorads, 0.8 %; estos e tratamientos regeneraron plantas verdes completas en un 100 %. Lo anterior evidencia dos aspectos; el primero, ningún tratamiento testigo (0 Krads) superó a los tratamientos irradiados con Cobalto 60 en cuanto a regenerar plantas verdes completas se refiere. El segundo aspecto es la interacción entre la variedad y la dosis, ya que la variedad Comalapa respondió bien con 10 y 20 Krads, pero Xequijel con una dosis menor.

Para obtener una buena respuesta en cultivo de anteras, debe existir un buen balance entre formación de callo y plantas verdes regeneradas completas; puede notarse en la variedad Chocoyo con 0 y 5 Krads que reportó alto % de formación de callo (5.4 y 2.0), pero ninguna respuesta en regeneración de plantas. Desde el punto de vista del Fitomejorador, lo más importante es el % de plantas regeneradas completas, porque serán las que proporcionarán material genético (germoplasma) para su programa de mejoramiento.

Para aquellos tratamientos con respuesta a la formación de callo será necesario encontrar el medio de cultivo adecuado para una buena regeneración de plantas verdes completas.

Cuadro 13. Resultados de regeneración de plantas de aquellos genotipos y dosis de Cobalto 60 que formaron callo a partir de anteras.

TRATAMIENTO	% DE FORMACION DE CALLO	No. DE CALLOS OBTENIDOS	% DE RIZOGENESIS	% DE PLANTAS VERDES REGENERADAS	No. DE PLANTAS VERDES REGENERADAS
BALAN - 0 KILORADS	0.2	01	100.00	0.00	00
CHOCOYO - 0 KILORADS	5.4	27	0.00	0.00	00
CHOCOYO - 5 KILORADS	2.0	10	-----	40.00	04
CHOCOYO - 15 KILORADS	0.6	03	0.00	0.00	00
CHOCOYO - 20 KILORADS	0.6	03	-----	66.66	02
COMALAPA- 5 KILORADS	1.0	05	0.00	0.00	00
COMALAPA- 10 KILORADS	1.0	05	-----	100.00	05
COMALAPA- 15 KILORADS	1.0	05	0.00	0.00	00
COMALAPA- 20 KILORADS	0.8	04	-----	100.00	04
PATZUN - 10 KILORADS	0.6	03	-----	50.00	02
PATZUN - 15 KILORADS	0.4	02	-----	50.00	01
PATZUN - 20 KILORADS	0.2	01	75.00	0.00	00
PATZUN - 25 KILORADS	0.2	01	-----	50.00	01
STA. ANA- 15 KILORADS	0.2	01	0.00	0.00	00
STA. ANA- 25 KILORADS	0.2	01	0.00	0.00	00
XEQUIJEL- 5 KILORADS	1.0	05	-----	100.00	05
XEQUIJEL- 20 KILORADS	0.2	01	-----	50.00	01
ZARAGOSA- 0 KILORADS	0.4	02	-----	50.00	01

8. CONCLUSIONES

1. La mayor respuesta a la formación de callo la presentó la variedad de trigo ICTA Chocoyo sin irradiación (5.4 %), seguida de los tratamientos ICTA Xequijel sin irradiación (2.4 %), ICTA Chocoyo con 5 Kilorads (2.0 %), ICTA Patzún con 5 Kilorads (1.2 %), ICTA Patzún sin irradiación (1.0 %) e ICTA Xequijel con 5 Kilorads (1.0 %). Los resultados anteriores demuestran que los tratamientos donde se usaron dosis de irradiación con rayos gamma mayores de 5 kilorads afectaron negativamente la respuesta de las variedades. Se exceptúa la variedad ICTA Comalapa que con 10 y 15 Kilorads formó callo en 1 %, pero estos resultados no aseguran que se llegará a obtener plantas verdes regeneradas.
Lo anterior confirma que la respuesta a la formación de callo de plantas irradiadas depende del genotipo a que aquellas pertenecen.
2. La respuesta a la regeneración de plantas, de las variedades estudiadas, no clarifica un patrón de respuesta en cuanto a la radiación con Cobalto 60.
3. Algunas dosis de irradiación con rayos gamma (5, 10 y 20 Krads) y en algunos genotipos de trigo (Comalapa y Xequijel), mejoró la respuesta a la regeneración de plantas, lo que implica que estos tratamientos aseguran la obtención de plantas regeneradas que son las que al final son utilizadas por los mejoradores en los programas de mejoramiento genético.

9. RECOMENDACIONES

1. Para programas de mejoramiento genético utilizando cultivo de anteras, se recomienda usar las variedades "ICTA Comalapa" e "ICTA Xequijel", pues respondieron mejor a las irradiaciones con rayos gamma.
2. En futuras investigaciones de este tipo no usar dosis de irradiación con rayos gamma mayores de 20 Kilorads en las variedades de trigo antes estudiadas, pues la formación de callo a partir de anteras se ve afectada negativamente.
3. Considerar este trabajo como base en la elaboración del protocolo necesario para la generación y evaluación de variedades de trigo por medio del cultivo de anteras.

10. BIBLIOGRAFIA

1. ALVAREZ VALENZUELA, G.A. 1992. Evaluación de la respuesta a la inducción de callo y regeneración de plantas de cinco genotipos de trigo (Triticum aestivum L.) a través del cultivo de anteras en diferentes medios de cultivo. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. p 36-39
2. 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 (Alemania) 99:181-186.
3. BARCHOWSKY, S.L.; ZEMETRA, R.S. 1988. Screening for embryonic haploid callus based on callus type in wheat (Triticum aestivum L.). Estados Unidos, University of Idaho, Department of Plant, Soil and Entomological Sciences. 5 p.
4. CALDERON DIAZ, J.H. 1990. Evaluación de la respuesta de cinco variedades de trigo (Triticum aestivum L.) a la inducción de callo regeneración de plantas en diferentes medios de cultivo a partir del cultivo de anteras. Tesis Ing. Agr. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía. 54 p.
5. CHU, C.C.; HILL, R.D. 1988. An improved anther culture method for obtaining higher frequency of pollen embryods in Triticum aestivum L. Plant Science (Irlanda) 55:75-81.
6. CRUZ S., J.R. DE LA. 1982. Clasificación de zonas de vida de Guatemala, a nivel de reconocimiento. Guatemala, Instituto Nacional Forestal. 42 p.

7. DODDS, J.H. 1982. Experiments in plant tissue culture. Estadis Unidos, Cambrich Univ. Press. s.p.
8. ESTADOS UNIDOS. DEPARTAMENT OF DEFENSE. s.f. Guatemala city maps. Washington U.S. Army Topographic Comander. Esc. 1:12,500,000. Color.
9. FRANCO RIVERA, E.O. 1,990. Anther culture and mutation inducción for improving yield and inducing resistance to disease in rice and wheat. Guatemala, Universidad de San Carlos de Guatemala, Facultad de Agronomía, Laboratorio de Cultivo de tejidos. 13 p.
Sin publicar.
10. GUATEMALA. INSTITUTO DE CIENCIA Y TECNOLOGIA AGRICOLAS. 1979. El cultivo del trigo en la región I. Guatemala. ICTA. Folleto Técnico No. 8. 16 p.
11. _____. 1984. Nuevas variedades de trigo para el altiplano central. Guatemala. s.p.
12. _____. 1986. Programa nacional de trigo. Guatemala. 62 p.
13. _____. 1987. Informe técnico, programa nacional de trigo región I. Guatemala. 55 p.
14. _____. 1988. Programa de trigo; Informe técnico, Chimaltenango, Guatemala. p 51-54
15. _____. 1991. Nuevas variedades de trigo para el altiplano central de Guatemala. Guatemala. s.p.

16. INSTITUTO NACIONAL DE SISMOLOGIA, VULCANOLOGIA, METEOROLOGIA e HIDROLOGIA. 1988. Atlas climatológico de la República de Guatemala. Guatemala. 21 p.
17. HURTADO M., D.V.; MERINO M., M.E. 1987. Cultivo de tejidos vegetales. México. Trillas. 233 p.
18. KELLER, W.A. 1978. Production and utilization of microspore derived haploid plants, in frontiers of plant tissue culture. Estados Unidos, Asocc. plant Tissue Culture. p. 113-122
19. NAVARRO ALVAREZ, W. 1988. Mutagénesis mediante técnicas *in vitro*. México, CONICIT. p. 54-105
20. NITSCH, C.; NORREEL, B. 1972. Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture, in genes, enzymes and populations. Plenum Press. p. 128-144
21. OUYANG, J.W.; ZHOOU, S.M.; JIA, S.E. 1983. The response of anther culture to culture temperature in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor-Appl. Genet. (E.E.U.U.) 66:439-442.
22. PEREA CALLOS, M. 1988. Cultivo de células, tejidos, órganos y plantas *in vitro*; técnicas *in vitro* para la producción y mejoramiento de plantas. México, CONICIT. 105 p.
23. SIMMONS, C.S.; TARANO, J.M.; PINTO, J.H. 1959. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la república de Guatemala. Trad. por Pedro Tirado Sulzona. Guatemala, Ed. José de Pineda Ibarra. 1000 p.

- 24. VASQUEZ, F.J. et al. 1991. La biotecnología y su aplicación en agricultura en Guatemala; un ensayo crítico. Guatemala, Instituto de Ciencia y Tecnología Agrícolas. 27 p.
- 25. VIENA. ORGANISMO INTERNACIONAL DE ENERGIA ATOMICA. 1990. Mejoramiento genético de los cereales utilizando técnicas nucleares. Viena, ARCAL. p. 26-30
- 26. ZEMETRA, R.S. 1990. Doubled haploid techniques in mutation breeding; Advanced training course. Guatemala, FAO. 17 p.

Patronelle



21. GUYARD, J.W.; ZHOU, S.M.; JIA, S.F. 1983. The response of wheat culture to culture temperature in wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor. Appl. Genet. 18:5-11. 55-432-441.

22. PEREA CALLES, M. 1988. Cultivo de células, tejidos, órganos y plantas in vitro: técnicas in vitro para la producción y mejoramiento de plantas. México. COMCIT. 103 p.

23. SIMMONS, G.S.; SARANO, J.M.; PINO, J.B. 1979. Clasificación de reconocimiento de los suelos de la República de Guatemala. Trab. por Pedro Tinoco Salazar. Guatemala. Ed. José de Pineta Ibarra. 1980 p.

11. APENDICE

Apéndice No. 1. Composición del medio de cultivo basal N6
usado en la inducción de callo.

COMPONENTES	mg/L
(NH ₄) SO ₄	463.00
KNO ₃	2830.00
KH ₂ PO ₄	400.00
MgSO ₄ . 7H ₂ O	185.00
CaCl ₂ . 2H ₂ O	186.00
FeSO ₄ . 7H ₂ O	27.80
Na ₂ EDTA	37.20
H ₃ BO ₃	1.60
MnSO ₄ . 4H ₂ O	4.40
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	1.50
KI	0.80
THIAMINA-HCl	1.00
PIRIDOXINA	0.50
ACIDO NICOTINICO	0.50
GLICINA	2.00
SUCROSA	6.00 %
AGAR	0.60 %

Callo: tejido obtenido por medio del aislamiento de órganos o tejidos diferenciados, los cuales posteriormente son llevados a una desdiferenciación celular, presentando estas células una proliferación continua, acelerada y de apariencia desorganizada, que da lugar a una masa amorfa de tejido.

Diploide: Se refiere a cualquier núcleo, célula u organismo que posee el doble del número haploide de cromosomas. El tejido somático normalmente es diploide, en contraste con las células gaméticas, que son haploides.

Embriogénesis: capacidad de las plantas con flores para producir embriones. No se reduce al desarrollo del huevo fertilizado, sino que también puede ser inducido en cultivo de tejidos vegetales (embriogénesis somática).

Explante: toda aquella porción de la planta madre que se utiliza para el cultivo *in vitro* (antera, microspora, óvulo, fracción de hoja, raíz, tallo, pétalo, etc., meristemo, etc.; también puede ser un embrión o una semilla).

Euploidía: calificativo que se aplica a todos los organismos que poseen un juego completo de cromosomas o un múltiplo de este número. Los términos que se emplean para las series euploides son: diploide, triploide, tetraploide, etc. Se contraponen a aneuploide.

Haploide: Designa a cualquier núcleo, célula u organismo que posee un juego simple de cromosomas impares. Número n o número reducido de cromosomas, típico de la mayoría de los gametofitos.

Homocigótico: que tiene genes iguales de, al menos, un par de factores mendelianos alelomorfos; se dice que un organismo es homocigótico para un carácter dado cuando todas las células germinales transmiten genes idénticos para este carácter.

In vitro: Designa a los procesos biológicos o a las investigaciones que se realizan fuera de los organismos vivos, tradicionalmente en tubos de ensayo.

Medio Basal: medio de cultivo formulado con macro y micronutrientes (sin reguladores del crecimiento).

Medio Nutritivo: Medio de cultivo empleado para iniciar, desarrollar o enraizar diferentes inóculos; está formulado con macro y micro nutrientes, azúcar y reguladores del crecimiento.

Microspora: una de las cuatro células producidas por las divisiones meióticas de la célula madre del microsporocito; espora que tiene la propiedad de dar origen al gametofito que sólo lleva gametos masculinos, como son los granos de polen.

Monosómico: los organismos diploides que pierden un cromosoma de un par único.

Mutación: cambio en la cantidad o estructura del ADN en los cromosomas, pudiendo ser génica o cromosómica. Una mutación génica consiste en el cambio de un gene de una forma alélica a otra; los cambios cromosómicos consisten en duplicaciones, inversiones, intercambios, etc.

Mutagénesis: capacidad para la inducción de mutaciones por parte de distintos agentes físicos y químicos, como las radiaciones ultravioleta, los rayos X, las mostazas nitrogenadas, las acridinas, los peróxidos, los agentes quelantes y otros.

Mutágeno: agente físico o químico capaz de inducir a mutación a los distintos materiales biológicos que constituyen la dotación génica de los seres vivos.

Organogénesis: formación de órganos (la caulogénesis es la iniciación de brotes y la rizogénesis es la iniciación de raíces).

Ploidía: número de dotaciones cromosómicas de una célula.

Proliferación: crecimiento por multiplicación rápida de nuevas células.

Primordio: grupo de células destinado a transformarse en una estructura particular, como lo es el primordio foliar, que va a dar origen a las hojas.

Rizogénesis: respuesta del explante al cultivo in vitro, en la cual sólo se obtiene desarrollo de raíces.

Subcultivo: transferencia del explante a medio fresco.

Totipotencialidad: es el fenómeno por el cual las células somáticas provenientes de diferentes partes de la planta, dadas las condiciones apropiadas, pueden desarrollarse en una planta completa.

Trisómico: los diploides que tienen un cromosoma extra ($2n+1$)



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

Ref. Sem. 044-93

LA TESIS TITULADA: "IRRADIACION DE SEMILLAS CON RAYOS GAMMA DE 7 GENOTIPOS DE TRIGO (Triticum aestivum L.) PARA EVALUAR SU RESPUESTA A LA FORMACION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS A TRAVES DEL CULTIVO DE ANTERAS".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: HERNAN PERLA GONZALEZ

CARNET No: 85-10175

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES: Ing. Agr. Fernando Rodríguez
 Ing. Agr. Marino Barrientos
 Ing. Agr. Héctor Ramazzini

Los Asesores 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. Francisco Vásquez
 ASESOR



Ing. Rolando Lara Alecio
 DIRECTOR DEL IIA.

I M P R I M A S E

Ing. Agr. Hfraín Medina Guerra
 DECANO



c.c. Control Académico
 Archivo
 /prr.

APARTADO POSTAL 1545 - 01901 GUATEMALA, C. A.
 TELEFONO 769794 - FAX (5022) 769770



LA TESIS TITULADA: "IRRADIACION DE SEMILLAS CON RAYOS GAMMA DE 7 GEOMETRIAS DE FRIO (Técnicas pasivas L.) PARA EVALUAR SU RESPUESTA A LA FORMACION DE CALLO Y REGENERACION DE PLANTAS A TRAVES DEL CULTIVO DE ANTIERS".

DESARROLLADA POR EL ESTUDIANTE: HERRERA PERLA GONZALEZ

CARRER No: 85-10175

HA SIDO EVALUADA POR LOS PROFESIONALES:
Ing. Agr. Fernando Rodriguez
Ing. Agr. Marino Barrios
Ing. Agr. Hector Romarini

Los Asesores y las autoridades de la Facultad de Agronomía, hacen constar que ha con-
plido con las normas universitarias y reglamentos de la Facultad de Agronomía de la
Universidad de San Carlos de Guatemala.

[Signature]
Ing. Agr. Francisco Viquez
ASESOR

[Signature]

Ing. Agr. Rolando Lara Alarín
DIRECTOR DEG. IIA.



IMPRIMASE



[Signature]
Ing. Agr. Martín Medina
DECANO