

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO
FACULTAD DE CIENCIAS



**PLANTAS HAPLOIDES DE TABACO Y TRIGO POR
CULTIVO DE ANTERAS:**

La Sobrevivencia del Polen y la Andiógénesis in Vitro

↓
R

TESIS PROFESIONAL

Que para obtener el título de:

B I O L O G O

P r e s e n t a :

CARLOS ACOSTA ZAMUDIO

México, D. F.

1981



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

INDICE

	PAG.
I. INTRODUCCION	1
II. REVISION DE LITERATURA	8
1. Definición y utilidad de los haploides.	8
2. Métodos para la obtención de haploides.	11
3. Factores que inducen la androgénesis <u>in vitro</u>	17
3.1. Medios de cultivo.	18
3.2. Reguladores del crecimiento.	20
3.3. Estado de desarrollo del polen	23
3.4. Estrategia de cultivo.	24
3.5. Pretratamiento	26
3.6. Condiciones de desarrollo de la planta do- nadora de las anteras y edad de la misma..	31
3.7. Genotipo	33
3.8. Influencia de la pared de la antera.	36
4. Mecanismo de acción	41
4.1. Cambios citoplásmicos en el polen durante la embriogénesis	41
4.2. Dimorfismo del polen	45
III. MATERIALES Y METODOS	49
1. Material vegetal.	49
2. Determinación de la viabilidad del polen.	50
3. Curvas de coeficiente de variación.	51
4. Siembra de las anteras.	54
5. Medios de cultivo	56
IV. RESULTADOS	58
1. Determinación de la viabilidad del polen.	58
2. Curvas de coeficiente de variación y tamaño de la muestra.	59
3. Viabilidad del polen durante la siembra	61
4. Factores que controlan la viabilidad del polen.	64
V. DISCUSION.	68
VI. BIBLIOGRAFIA	79

I. INTRODUCCION

Se dice que una planta es haploide cuando ésta tiene el número gametofítico de cromosomas (Reinert y Bajaj, 1977).

Las ventajas inmediatas de experimentar con los organismos haploides son al menos dos: a) Las mutaciones inducidas en ellos son fácilmente detectables (Carlson, 1973) y b) Mediante la duplicación de sus cromosomas se pueden obtener líneas homocigas para los programas de formación de híbridos (Kasha y Kao, 1970).

En la actualidad son dos los métodos que permiten una frecuencia relativamente alta de obtención de haploides. Estos métodos son: a) Eliminación de cromosomas por cruas interespecíficas y b) Cultivo de anteras.

En la técnica de cultivo de anteras la intención es ajustar el medio y las condiciones de cultivo de tal manera que el polen sea inducido a dividirse (Sunderland, 1974). Dada la simplicidad de la técnica y las altas frecuencias de inducción en algunas plantas, se ha presentado gran interés en los haploides obtenidos con este método.

Sin embargo, cuando se ha aplicado esta técnica de cultivo de anteras a diferentes especies y se han obtenido las plántulas correspondientes han surgido problemas como: - a) Variaciones en la ploidia de las plantas resultantes; -

b) Esterilidad de las plantas haploides; c) Altas frecuencias de plantas albinas y d) Los bajos o nulos porcentajes de respuesta de inducción en las anteras de algunos géneros en contraposición con los altos rendimientos de inducción en otros.

Respecto a este último problema la diferencia resulta aún más notable si se comprueba que se han utilizado los mismos medios y las mismas condiciones de cultivo y sin embargo, las respuestas son diferentes.

Dentro de las plantas que presentan alta frecuencia de respuesta androgénica durante el cultivo pueden mencionarse:

Nicotiana tabacum, en donde 75 % de las anteras respondieron en cultivo (Madrigal, 1978); 82 % según Weatherhead et al (1979) y 50 % según Sharp et al (1971).

Lycopersicon esculentum con un 50 a 70 % según Gresshoff y Doy (1972a).

Brassica oleracea con un 70 a 80 % según Quazi (1978).

Datura innoxia con 41 - 81 % según Sangwan - Norrael (1977) o con 45 % según Sopory y Maheshwari (1976a).

Dentro de las plantas con bajas frecuencias de respuesta se pueden mencionar:

Capsicum annum con 1 % según George y Narayanaswamy (1973).

Triticum aestivum con 2.18 - 3.1 % según Ouyang et al (1973), 1 % según Wang et al (1973) y 0.6 - 1.7 % según Bajaj (1977).

Hordeum vulgare con 1.1 % según González-Medina y Bouharmont (1978).

Debe hacerse notar que González-Medina y Bouharmont (1978) mencionan que 36 - 73 % de las anteras de *H. vulgare* presentaban microsporas en división y sin embargo, el desarrollo de estas se detenía y solo se recuperaban de 0.44 a 2.6 % de anteras con callos. En el mismo sentido, Wang et al (1973) observaron que durante el cultivo de anteras de *T. aestivum* 40 % de ellas presentaban polen multinucleado y solo 1 % de ellas producía callosidades. Parecería pues que aun el polen de las especies con bajas frecuencias de androgénesis presenta la capacidad de llevar a cabo esta.

Existe una creciente evidencia de que la pared de las anteras juega un papel importante durante la embriogénesis a través del aporte de sustancias nutritivas a los granos de polen. Esto se ha comprobado básicamente por los experimentos llevados a cabo con extractos de anteras (Sunderland, 1978 y Nitsch, 1974).

El papel de la antera durante la embriogénesis llevó a Sunderland (1974) a proponer un modelo que explicase las diferencias de frecuencias de androgénesis en plantas

como *Datura innoxia* y *Nicotiana tabacum* de alta frecuencia de respuesta y en cereales, de respuesta más baja como sería el caso de *T. aestivum*.

El modelo supone (Figura 1) la presencia de dos elementos. Uno sería la receptibilidad del polen (denominada P) que se presenta durante el desarrollo y otro sería un factor de la antera (α) que al interactuar con el polen lleva o no a este a la androgénesis.

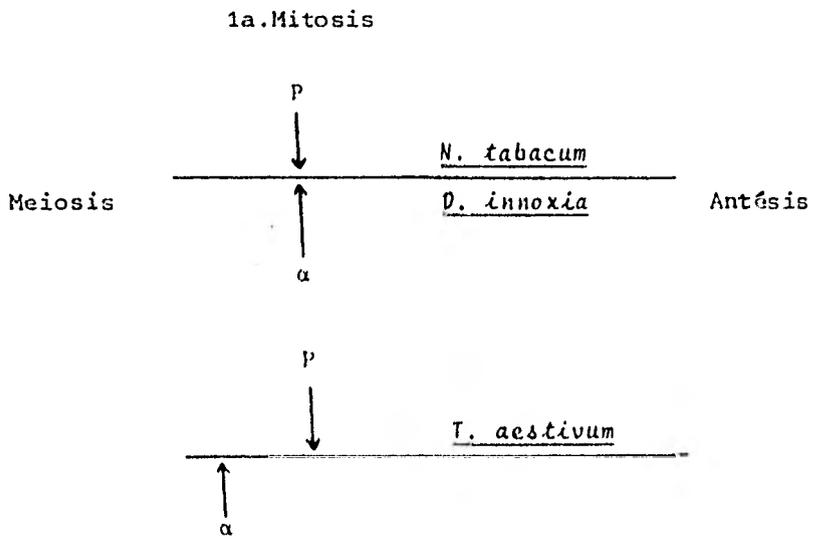


Figura 1. Modelo de Sunderland para explicar las diferencias de respuesta de androgénesis en diferentes tipos de plantas de acuerdo a la coincidencia o no de la receptividad del polen (P) y a los factores de la antera (α). Modificado de Sunderland (1974).

Así, Sunderland explica que los bajos rendimientos - de algunas plantas como *T. aestivum* se deben básicamente a que no coinciden P y α durante la siembra de las anteras y en el caso de los altos rendimientos de *N. tabacum* y *D. innoxia* se deben simplemente a una coincidencia de estos - factores.

Se ha llegado además a la conclusión de que los pretratamientos dados a las anteras influyen probablemente sobre las frecuencias de respuesta androgénica aumentando los factores favorables en la pared de las anteras. Más específicamente, Duncan y Heberle (1976) sugieren que el papel - del frío en el incremento de la respuesta se debe a la disminución de la mortalidad de los granos de polen.

La viabilidad del polen en el cultivo es un aspecto relativamente descuidado en los estudios de los factores - que controlan la androgénesis no obstante existir evidencias que sugieren que cuando se mejora la primera se presentan incrementos en la segunda. Así Nitsch y Norreel - (1972) encuentran menor mortalidad del polen en las anteras de *D. innoxia* asociado a un mayor inicio de embriogénesis (siguiendo el criterio de embriogénesis empleado por ellos).

Sangwan-Norreel (1977) observa que los pretratamientos incrementan la respuesta androgénica en *D. innoxia*, - yendo esta respuesta desde 0.71 % en el testigo hasta - 8.61 % en el mejor tratamiento. Paralelamente observó - disminuciones en la mortalidad del polen que iban de 99.2 % en el testigo hasta 91.3 % en el tratamiento.

Sunderland (1978) en *N. tabacum* observó que las anteras sometidas a períodos de frío por 12 días a 7 u 8°C presentaban, al cabo de 9 días de cultivo, 26.2 % de polen viable contra solamente 2.6 % en el testigo. Cuando se contaron el número de embriones se observó que las anteras sometidas a frío presentaban mayor número de éstos.

Replanteando el modelo de Sunderland (1974) y de lo dicho anteriormente puede llegarse a lo siguiente:

De las observaciones hechas por González-Medina y Bouharmont (1978) y por Wang et al (1973) con *H. vulgare* y *T. aestivum* respectivamente podría suponerse que si existe una receptividad del polen en las anteras de estas especies y que los bajos rendimientos en las mismas no podrían deberse a la ausencia de ésta.

De los experimentos sobre la viabilidad del polen durante el cultivo y como el mejoramiento de ésta incrementa la respuesta androgénica de las anteras podría suponerse que la diferencia entre las plantas que presentan altas frecuencias de androgénesis (*N. tabacum*) y las que producen bajas frecuencias (*T. aestivum*) se deberían a que el polen en las primeras sobrevive más tiempo y en las segundas sobrevive poco.

En el caso de que esta última relación fuese verdadera, sería importante conocer los elementos que participan en el control de la viabilidad del polen, pues a través de su manejo existiría la posibilidad de aumentar la producción de plantas haploides.

De acuerdo a lo anterior los objetivos del presente trabajo son:

1. Establecer la relación entre la sobrevivencia - del polen y la respuesta androgénica en dos tipos de plantas: *N. tabacum*, la cual ha sido considerada como de alta - frecuencia de respuesta y *T.aestivum*, que ha mostrado una - respuesta pobre.
2. Establecer los elementos que controlan la sobrevivencia del polen.
3. Desarrollar una metodología que permitiese obtener una respuesta a las interrogantes que se plantean.

II. REVISION DE LITERATURA.

1. Definición y Utilidad de los haploides.

Se dice que una planta es haploide cuando ésta tiene el número gametofítico de cromosomas (Reinert y Bajaj, 1977) sin considerar el nivel de ploidía de la planta, es decir, poseen solamente la mitad del número normal de cromosomas - (Sunderland, 1971).

Los organismos haploides son deseables al menos por dos razones: a) Las mutaciones inducidas en ellas son fácilmente visibles y b) mediante la duplicación de sus cromosomas se pueden obtener individuos homocigos (Nitsch y Nitsch, 1969).

Dado el hecho de que la mayoría de las mutaciones son recesivas y se enmascaran en los individuos diploides (Durr y Fleck, 1980), los haploides, dada su condición homociga simplifican la selección de los caracteres controlados por estos genes (Collins, 1977).

Gresshoff y Doy (1972b) mencionan que en la biología molecular y la genética se han logrado avances espectaculares en el conocimiento de rutas metabólicas y el control de la expresión de los genes gracias a las técnicas de análisis aplicadas a mutante de microorganismos haploides, técnicas que no se han podido aplicar a células vegetales porque la fase haploide es corta y no se utiliza fácilmente por lo que la prolongación de esta fase podría permitir es-

tos estudios. Un intento en tal sentido fue llevado a cabo por Carlson (1970) quién, utilizando como agente mutagénico etil-metano sulfonato, pudo aislar seis callos haploides - auxótrofos y regenerar cuatro plantas de ellos. Sin embargo, estos callos no eran auxótrofos verdaderos pues crecían lentamente en medios carentes de una sustancia. Gresshoff y Doy (1972b) comentan que probablemente esto se debió a que Carlson partió de una especie poliploide.

El cultivo de células haploides permitirá además seleccionar mutantes con: sobreproducción de metabolitos, genotipos resistentes a herbicidas específicos, resistencia a stress del medio ambiente o resistencia a antibióticos (Collins, 1977) y -ya que es posible obtener una planta completa a partir de un grupo de células- producir posteriormente individuos completos con tales características (Durr y Fleck, 1980). Una de estas posibilidades fue llevada a cabo por Carlson (1973), quien partiendo de plantas de *N. tabacum* sensibles a la toxina de *Pseudomonas tabaci* pudo obtener, induciendo mutaciones, callos haploides resistentes a una sustancia análoga a la toxina producida por la bacteria. Cuando obtuvo plantas completas éstas fueron resistentes a la toxina liberada por *P. tabaci*, aunque no presentaban la capacidad para evitar la reproducción de la bacteria ni para impedir la síntesis de la toxina.

Los beneficios de la disponibilidad de plantas haploides se extenderían, a través de líneas homocigas, a plantas que se autofecundan plantas de polinización cruzada y plantas de propagación vegetativa.

En plantas que se autofecundan es importante la selección, por cruza, de líneas puras de alta calidad. Después de una hibridación la restauración de la homocigosis requiere de muchas generaciones (González-Medina y Bouharmont, 1978 y Barclay, 1975). Clapham (1977) comenta que se requieren de 5 a 7 generaciones de autofecundación o tres años para obtener el individuo homocigo, tiempo que se reduciría a un año mediante la duplicación de los cromosomas de un haploide.

En el caso de especies de polinización cruzada, como el centeno, la disponibilidad de líneas homocigas permitiría también manifestar el vigor híbrido (Keller y Stringam, 1978). Un caso semejante sería la autoincompatibilidad en los frutales (Rajasekavan y Mullins, 1979).

Hablando de especies propagadas vegetativamente como la papa (tetraploide, $2n = 4x = 48$) la disponibilidad de individuos diaploides ($2n = 2x = 24$) permitiría que las cruza fueren más fáciles, lo que llevaría a propagar este cultivo por semilla para así evitar la transmisión de enfermedades virales y manifestar además, el vigor híbrido (Keller y Stringam, 1978).

En el caso de mejoramiento de frutales los haploides serían útiles ya que en estas plantas las cruza son difíciles de llevar a cabo por los ciclos largos, por la naturaleza altamente heterociga de la mayoría de los frutales y por factores como la partenocarpia (Rajasekavan y Mullins, 1979).

Sin embargo, ninguna de estas técnicas tendrá amplia

aplicación hasta que los métodos para inducir gran cantidad de haploides en muchas especies no estén disponibles (González-Medina y Bouharmont, 1978).

2. Métodos para la obtención de haploides.

El principal problema de los diferentes métodos de obtención de haploides -aparte la laboriosidad que cada uno de ellos tenga- es la frecuencia de haploides obtenidos. Dentro de estos métodos pueden mencionarse: a) aparición espontánea, b) inducción por tratamientos químicos o físicos, c) polinización retardada y otros. Estos métodos se utilizan poco por las frecuencias bajas de aparición y las dificultades para detectar los individuos haploides (Sink y Padmanabhan, 1977). De esta manera, Aalders (1958) intentó aislar haploides espontáneos de calabaza. Se esperaba que las plántulas haploides de calabaza tuviesen un crecimiento lento, cotiledones pequeños y delgados y una apariencia débil. Así, de 34,746 plántulas se seleccionaron 374 por este criterio y ninguna fue haploide. Cuando se varió el criterio de selección y se supuso que los embriones haploides debían ser pequeños y se extrajeron éstos y se sembraron, se consiguieron solamente de 0.35 a 1.2 % de monoploides. Contra lo esperado, los haploides obtenidos crecían normalmente y tenían apariencia de planta diploide, por lo que sólo se les pudo distinguir por conteos cromosómicos. Se han reportado haploides espontáneos de *Brassica campestris* y *B. napus* (Keller y Armstrong, 1979).

Existen, sin embargo, dos métodos que producen mayor frecuencia de haploides y que tienden a ser utilizados

con preferencia. Estos métodos son: a) eliminación de los cromosomas por hibridación interespecífica y b) cultivo de anteras *in vitro*.

En el primer método Kasha y Kao (1970) obtuvieron plantas haploides de *Hordeum vulgare* (autotetraploide) por medio de cruza interespecíficas con *H. bulbosum* (tetraploide). En la primera cruza se obtuvieron plantas diploides semejantes a *H. vulgare* que produjeron semillas. Estas plantas diploides se cruzaron de nuevo con plantas diploides de *H. bulbosum* de aparición espontánea. Los embriones de estas cruza eran abortivos, por lo que se les colocó en medio de cultivo. De esta manera se obtuvieron 23 plantas haploides semejantes a *H. vulgare*. Kasha y Kao determinaron que no ocurriría partenogénesis, sino que si había fecundación y que los cromosomas de *H. bulbosum* se eliminaban durante las divisiones del embrión. Utilizando el mismo método Barclay (1975) pudo obtener haploides de *Triticum aestivum* (hexaploide, $2n = 6x = 42$) mediante cruza con *H. bulbosum* tetraploide ($2n = 48$) y diploide ($2n = 24$) y mediante el cultivo de embriones. Se obtuvieron 57 plantas haploides ($n = 21$) de un total de 70. Las plantas no tenían ninguna característica de *H. bulbosum* por lo que se supone que hubo eliminación de los cromosomas.

En la técnica de cultivo de anteras *in vitro* la intención es ajustar el medio y las condiciones de cultivo de tal manera que el polen sea inducido a dividirse. Los granos de polen multicelulares pueden seguir dos caminos: a) desarrollarse de un modo organizado y producir embriones con raíz y yemas o b) desarrollarse de una manera desorganizada y formar un callo (Sunderland, 1974). Independiente-

mente de la ruta de desarrollo que siga el polen se dice - que ocurre la androgénesis. Aplicando esta técnica es posi - ble obtener altas frecuencias de formación de plántulas ha - ploides. Por ejemplo, Collins y Sunderland (1974), traba - jando con *Nicotiana glauca* y *N. glauca* (diploides - ambas, $2n = 24$) obtuvieron un promedio de 10 plántulas por antera sembrada, aunque algunas produjeron hasta 400 plántu - las en *N. glauca* y casi 200 en *N. glauca*. Cuando se observaron 300 metafases para contar el número de cromo - somas todos los casos mostraron el número haploide ($2n = - 12$).

Se comprende así -dada la simplicidad y facilidad - de las operaciones y la posibilidad de altas frecuencias de obtención- que a partir del trabajo de Guha y Maheshwari - (1964) con *D. innoxia* se haya presentado un renovado inte - rés por los haploides obtenidos por esta técnica.

Sin embargo, al aplicar la técnica de cultivo de an - teras *in vitro* y obtener las plántulas correspondientes han surgido problemas como: a) variaciones en la ploidía de las plantas resultantes; b) esterilidad de las plantas haploi - des; c) altas frecuencias de plantas albinas y d) bajos o - nullos porcentajes de respuesta de inducción en las anteras de algunos en contraposición con los altos rendimientos de inducción en otros.

a) Variaciones en la ploidía de las plantas resultan - tes.

En este caso se pueden mencionar los trabajos de Nishi y Mitsuoka (1969) quienes al regenerar plántulas de - arroz a partir de callos encontraron que éstas presentaban variaciones de ploidía con números X, 2X, 3X y 5X y cada - una de ellas con diferente viabilidad del polen.

Rajasekavan y Mullins (1979) obtuvieron solamente plantas diploides mediante el cultivo de anteras del híbrido *Vitis vinifera* x *V. rupestris*. El único modo de saber si estas plantas eran homocigas y provenían por lo tanto de la duplicación de los cromosomas del polen era observar si ocurría segregación en la descendencia.

Bouharmont (1977) trabajó con anteras de *Hordeum vulgare* y observó que los callos obtenidos de la siembra presentaban divisiones de núcleos haploides, diploides, triploides y aún poliploides. Los núcleos no haploides en las microsporas se podía explicar por endomitosis o por fusión de los núcleos. En el caso de la cebada probablemente la mayor causa de poliploidía es la endoreduplicación, esto es, una endomitosis.

En *Datura metel* se obtienen de las anteras en cultivo 70 % de callos diploides, 23 % de triploides y 7 % de haploides, a diferencia de *Arabidopsis thaliana* donde solamente 2.7 % de los callos son diploides (Amos y Scholl, 1978).

El género *Nicotiana* spp es uno de los pocos donde se obtienen casi exclusivamente haploides.

b) Esterilidad de las plantas haploides.

En la mayoría de los casos las plantas haploides son estériles, por lo que es necesario restaurar la condición $2n$ a través de la duplicación de los cromosomas. Muchas veces en el caso de especies poliploides no es necesario esto (Collins, 1977).

Se han utilizado varios métodos para duplicar los

cromosomas, algunos de estos son: Aplicación de colchicina a las anteras antes de llevar a cabo la siembra de estas - (Sunderland, 1970) y duplicación espontánea durante el cultivo de callosidades (Kockhar et al 1971). Este último método se basa en la baja estabilidad cromosómica de los - callos, lo que ocasiona la duplicación, aún hasta la poli - ploidía.

c) Alta frecuencia de plantas albinas.

Muchas de las plantas obtenidas durante el cultivo son albinas, caso muy frecuente en el cultivo de cerea - les (Dunwell, 1978). Así Scowcraft (1979) encontró que - las plántulas obtenidas de anteras de arroz eran en su mayo - ría albinas (75%).

Chen (1978) menciona que las concentraciones de sa - carosa en el medio de cultivo puede influir en la propor - ción de albinos que se presentan, pues observó que las al - tas concentraciones de sacarosa en el medio aumentan el nú - mero de plantas haploides albinas en anteras de arroz.

No se conoce la causa del albinismo, aunque se cree - que no es debida a la ausencia de proplastidios, sino más - bien a la carencia de desarrollo de éstos (Scowcraft, 1979) Dunwell (1978) menciona que los proplastidios carecen de - ARN ribosomal y que hay ausencia de proteínas codificadas - por el genoma del cloroplasto, no conociéndose si éste care - ce del ADN adecuado o si éste está reprimido.

d) Variaciones en las frecuencias de inducción.

A medida que se han sembrado anteras de diferen - tes especies se ha observado que existen algunas cuya res - puesta al cultivo se manifiesta en altas frecuencias de an - drogénesis. Tal es el caso de *Nicotiana tabacum* y *Datura*

metel donde se han observado 45 - 80 % de anteras que producen embriones y plántulas en el primer caso (Weatherhead et al 1979, Sharp et al 1971 y Nitsch y Nitsch, 1969) y - 41.1 - 81 % de anteras con embrión en el segundo caso - (Sangwan-Norreel, 1977 y Sopory y Maheshwari, 1976a). - Extrañamente, en estas especies se han reportado haploides naturales (Sunderland, 1971).

En el caso opuesto tenemos anteras de algunas especies cuya respuesta androgénica es muy baja como es el caso de *Zea mays*, donde 0.17 - 1 % de las anteras producen callosidades (Brettell, 1980 y Sheridan et al 1980) y el de *Triticum aestivum*, donde 1 - 3 % de las anteras producen callos (Wang et al 1973 y Ouyang et al 1973). Más datos de respuesta de androgénesis en otras especies se resumen en el Cuadro 1.

Es interesante recalcar con respecto a este problema las observaciones que llevaron a cabo Wang et al (1973) quienes encontraron que si bien solamente 1 % de las anteras producían callos, el 40 % de ellas producían polen multinucleado en los primeros días de cultivo. De esto se concluye que el desarrollo de la mayoría de estos granos multinucleados se inhibe después de varias semanas. En forma similar González-Medina y Bouharmont (1978) encontraron en *Hordeum vulgare* que 36 - 70 % de las anteras tenían polen en división. A los 30 días estas anteras morían; cosa que no sucedía si eran transplantadas oportunamente a un medio fresco en donde recuperaban 0.44 - 2.66 % de anteras con callos. Finalmente, Bouharmont (1977), también en *H. vulgare*, observó que al menos 50 % de las anteras mostraban hasta 30 % de microsporas con tres núcleos y que el número

ESPECIE

% DE ANTÉRAS QUE PRODUCEN...

REFERENCIA

<i>Nicotiana tabacum</i> cv. W38	75%, embriones y plántulas	Madrigal, 1978
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	75%, plántulas.	Nitsch y Nitsch, 1969
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. White Burley	82%, embriones	Weatherhead et al, 1979
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Ky	50%, embriogénesis	Sharp et al, 1971
<i>Brassica oleracea</i>	70-80% embriones	Quazi, 1978
<i>Datura innoxia</i>	41.1-81%, embriones	Sangwan-Norruel, 1977
<i>Datura innoxia</i>	45%, embriones	Sopory y Mahankwari, 1976a
<i>Lycopersicon esculentum</i>	50-70%, callos	Gresshoff y Doy, 1972a
<i>Vitis vinifera</i> x <i>V. rupestris</i>	44%, callos.	Rajasekaran y Mullins, 1979
<i>Oryza sativa</i>	54%, callos.	Institute of Genetics, 1974
<i>Oryza sativa</i>	40%, callos.	Chen, 1978
<i>Fragaria glandiflora</i> cv. Hokowane	46.4%, callos.	Mwadi et al, 1978
<i>Arabidopsis thaliana</i>	43.3-86.7, callos	Amos y Scholl, 1978.
<i>Arabidopsis thaliana</i>	40-80% callos	Gresshoff y Doy, 1972b
<i>Nicotiana knightiana</i>	38%, plántulas	Collins y Sunderland, 1974
<i>Nicotiana raimondii</i>	30%, plántulas	Collins y Sunderland, 1974
<i>Hordeum vulgare</i> *	30%, callos	Wilson, 1977
<i>Secale cereale</i> (tetraploide)	21.1%, polen multinucleado	Orlikowska, 1977
<i>Secale cereale</i> (diploide)	7.5 %, polen multinucleado	Orlikowska, 1977
<i>Nicotiana sylvestris</i>	15%, embriones	Rashid y Street, 1974
<i>Nicotiana attenuata</i>	10%, plántulas	Collins y Sunderland, 1974
<i>Hyoscyamus niger</i>	10-21%, plántulas	Corduan, 1975
<i>Brassica campestris</i>	7.2-8.7%, plántulas	Keller y Armstrong, 1979
<i>Triticale</i>	5.3-4.4/, callos	Ono y Larter, 1976
<i>Hordeum vulgare</i> *	1.1%, callos	González-Medina y Bouharmont, 1978.
<i>Capsicum annuum</i>	1%, plántulas	George y Narayanaswamy, 1973.
<i>Triticum aestivum</i>	2.18-2.1%, callos	Ouyang, et al. 1973
<i>Triticum aestivum</i>	1 %, callos	Wang et al, 1973
<i>Triticum aestivum</i>	0.6-1.7%, callos	Bajaj, 1977.
<i>Triticum vulgare</i>	0.48 %, callos	Chu, et al, 1973
<i>Zea mays</i>	0.17-0.62%, embriones	Brettell, 1980
<i>Zea mays</i>	1 %, callos	Sheridan, et al, 1980

CUADRO 1. Respuesta androgénica medida como porcentaje de anteras que presentan - embriones, callos, etc. para diferentes especies. Nótese como a pesar del uso de medios de cultivo semejantes, existen especies con altas frecuencias de respuesta y especies con bajas frecuencias. Los experimentos con *Hordeum vulgare** podrían dar la clave de estas diferencias, ya que González-Medina y Bouharmont (1978) sembraron anteras aisladas y Wilson (1977) utilizó espigas completas en medio líquido.

de éstos aumentaba a los 4 o 6 días de cultivo. Sin embargo, este desarrollo se detenía y sólo unas pocas anteras producían divisiones suficientes para formar un callo. Bouharmont concluye que no es difícil inducir la división en las microsporas y lo que ocurre es que éstas cesan y el callo pequeño degenera.

Podría pues considerarse que aún en estas plantas re-nuentes a la androgénesis existe la posibilidad de incrementar estos rendimientos, por lo que el estudio de los factores que controlan la androgénesis *in vitro* y los mecanismos de acción de estos ofrecerían la posibilidad de resolver este y otros problemas.

3. Factores que inducen la androgénesis in Vitro.

Dentro de los factores que se han manejado para la inducción de la androgénesis mencionaremos:

- 3.1 Medios de cultivo.
- 3.2 Reguladores del crecimiento.
- 3.3 Estado de desarrollo del polen.
- 3.4 Estrategias de cultivo.
- 3.5 Pretratamientos.
- 3.6 Condiciones de desarrollo de la planta donadora de las anteras y edad de la misma.
- 3.7 Genotipo.
- 3.8 Influencia de la pared de la antera.

Una esquematización de la interrelación de estos factores durante el proceso de androgénesis se puede observar en la figura 2.

3.1 Medios de cultivo.

Puesto que la observación original de Guha y Maheshwari (1964) se llevó a cabo utilizando un medio de cultivo definido, es natural que los esfuerzos posteriores a este tendiesen a mejorar este y otros medios hasta optimizarlos.

La importancia del medio puede recalcarse si se hace notar que si las anteras de *Datura innoxia* se siembran en un medio más rico que el empleado originalmente por Guha y Waheshwari se observa mayor porcentaje de respuesta (Sunderland, 1971).

Sin embargo, cada investigador utiliza una combinación diferente de sales minerales y vitaminas. No hay bases racionales para esas diferencias, muchas de las cuales son triviales (Sunderland, 1974). En general en la actualidad son preferidos los medios de composición más rica a aquellos -por comparación- más simples, como serían los medios de White (1934, citado en Bouharmont, 1977) o el empleado por Guha y Maheshwari (1964). Dentro de los primeros están los diseñados por: Murashige y Skoog (1962) y las diversas variantes de este (Linsmaier y Skoog, 1965; Blaydes, 1966 y Bourgin y Nitsch, 1969; citados en Sunderland, 1974); el medio utilizado por medio por Nitsch y Nitsch (1969) y recientemente, el medio N-6 para anteras

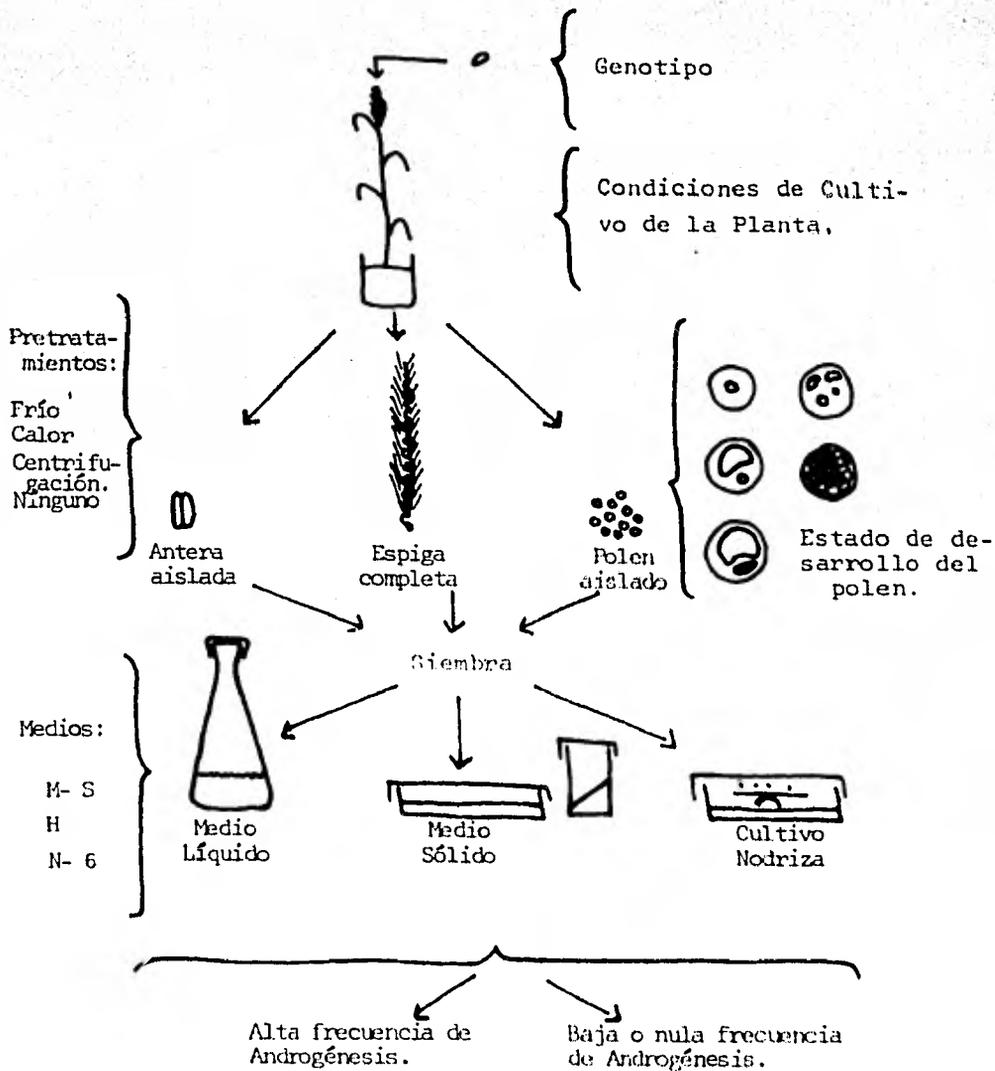


FIGURA 2. Interrelaciones posibles entre los factores que inducen la androgénesis *in vitro*. En general, en las plantas con baja o nula frecuencia de androgénesis el cultivo de la espiga completa (Wilson, 1977) podría aportar una explicación de estas respuestas y mejorarlas.

de trigo (Hu et al, 1978).

De todos los componentes que intervienen en los medios de cultivo resulta difícil establecer el papel de cada uno de ellos.

Sharp et al (1971) encuentra que hay una relación entre la concentración de sacarosa y la morfogénesis en *Nicotiana tabacum*. En *Hordeum vulgare* se encontró que los mejores resultados se obtenían con 3 % de sacarosa (Bouharmont, 1977) y en *Triticum vulgare* la concentración óptima fue 10 % (Pan et al, 1975). Poco se conoce acerca de esta influencia fuera de que probablemente no solo inter venga como factor nutricional, sino también a través de la regulación de la presión osmótica (Pan et al, 1975).

El fierro parece ser de alta importancia, pues al disminuir su concentración en el medio disminuye el porcentaje de anteras que produce plántulas. Si al medio original de Guha y Maheshwari se le adicionan mayores niveles de fierro, los resultados de androgénesis son mejores (Sunderland, 1971).

El esquema se complica aún más cuando se agregan otras sustancias de composición desconocida como extracto de levadura, caseína hidrolizada, agua de coco (Sharp et al 1971) o extractos de papa, tomate, rizoma de loto y endospermo lechoso de arroz y maíz (Hu et al, 1978).

Se han manejado también reguladores del crecimiento pero estos se tocarán en la siguiente sección.

En determinado momento se aceptó que el medio de cultivo debía cumplir una función doble. Debía llevar a cabo la inducción de la androgénesis y además debía de sostener el crecimiento del polen después de esta. (Sunderland, 1971). Sin embargo, la efectividad del medio como factor inductor se pone en duda cuando se menciona que Nitsch (1970, citado en Nitsch, 1974 y en Sink y Padmanabhan, 1977) mostró que el agua destilada con sacarosa y Fe en forma quelada eran suficientes para desarrollar embriones a partir de las microsporas de las anteras de tabaco. Esta evidencia y otras más (tratadas posteriormente) han llevado a Dunwell (1978) a sugerir que cualquiera que sea la naturaleza del estímulo de inducción, éste no es dependiente, al menos en tabaco, de ninguna substancia suministrada al medio de cultivo. Este es necesario solamente para el crecimiento posterior del embrión.

3.2 Reguladores del crecimiento.

Para la mayoría de las especies se incluyen una auxina y una citocinina en ciertas concentraciones (Sunderland, 1973).

Chu et al (1973) encuentra que las anteras de *Triticum vulgare* producían callos en presencia de 2,4-D y plántulas si se utilizaba AIA y cinetina. En *Lycopersicum esculentum* Sharp et al (1971) encuentran que los resultados óptimos se obtienen utilizando 2,4-D y cinetina o ANA y cinetina.

En *Datura innoxia* la cinetina induce la división

del polen y la cinetina y ácido indol acético inducen la división de las paredes de la antera (Sunderland, 1971).

Raghavan (1978) menciona que las anteras *Hyoscyamus niger* en un medio con 2,4-D conduce a la formación de callos. Si el medio carece de auxinas se forman plántulas.

El caso más homogéneo de respuesta a las hormonas vegetales lo presentan las gramíneas, donde se ha sugerido que es necesario agregar auxinas al medio. Tal es el caso de la dependencia de 2,4D para las anteras de *Triticale* (Ono y Larter, 1976); *Secale cereale* y *Triticale* (Orlikowska, 1977); *Triticum aegilopoides* y *T. dicoccoides* (Fujii, 1970) y *T. aestivum* (Wang et al, 1973 y Bajaj, 1977) En general se requiere un alto nivel de auxinas en plantas que producen callos durante la androgénesis (Vasil y Nitsch, 1975 citado en Orlikowska, 1977).

Por otra parte, en plantas como *Datura innoxia*, Sopory y Maheshwari (1976b) encontraron que ocurría androgénesis en presencia de auxina como ANA, donde 20.5 % de las anteras presentaban embriogénesis; 32 % con AIA y 42 % con AIB. El 2,4-D no produjo respuesta. Con giberelinas hubo 38 - 55 % de respuesta. Con citocininas hubo 48.7 % cuando se utilizó cinetina; 52 % con BA y 56 % con Zeatina. En el medio basal sin hormonas hubo de 0 a 20 % de anteras con embriones. Sheridan et al (1980) encuentran que había resultados en anteras de *Zea mays* en medios que tenían TIBA; 2,4-D y TIBA; 2,4-D, TIBA y 6BAP y cinetina. Lo único en común en estos medios era la concentración de sacarosa. En *Nicotiana glauca* Durr y Fleck (1980) han obtenido ha

ploides en medios con y sin cinetina.

Resultados semejantes a los anteriores han llevado a la conclusión de que algunas plantas no presentan un re - querimiento hormonal específico y que aún otras más no re - quieren de ninguna (Sunderland, 1971).

No se conoce la contribución que hacen las hormonas a los procesos de inducción (Sunderland, 1974) y es oportuno preguntar si pueden ser consideradas esenciales para el desarrollo de los embriones.

Si se considera a las hormonas esenciales para la embriogénesis los resultados obtenidos en anteras de espe - cies cuyos medios de cultivo no requieren hormonas solo pueden explicarse por la existencia de niveles internos de hormonas en las anteras (Sopory y Maheshwari, 1976b), conclusión que apoya Sunderland (1974) argumentando que los te - ñidos en senectud liberan hormonas y que las paredes de las anteras envejecen rápidamente en cultivo.

En caso de no considerar a las hormonas como esencia les entonces éstas serían importantes solamente en la fase de postinducción (Sunderland, 1974). Esta última posibilidad resulta apoyada por el experimento con *Hyo* - *scyamus niger* de Raghavan (1978). Como se mencionó, en *H. niger* la pre - sencia de auxinas conduce a la formación de callosidades y cuando se omitían aquellas se formaban plántulas. Raghavan observó que las microsporas que daban origen a los embrio - nes se caracterizaban por carecer de vacuola y no tener depó - sito de almidón. Estos granos de polen se encontraban -

siempre en la periferia de la cavidad de la antera, cerca del tapetum. Cuando se agregaba 2,4-D al medio de cultivo se formaban callosidades a partir de microsporas que carecían de vacuola y no tenían almidón, situándose en la misma posición que las que daban origen a embriones. Esto es, en los primeros estados de desarrollo de los callos las células que les daban origen y las que originaban a los embriones eran las mismas. La influencia del 2,4-D solo se observó hasta después de las primeras divisiones en que éstas eran desordenadas y no producían el arreglo polarizado del embrión. Raghavan concluyó que la auxina afectaba la formación de las nuevas células en granos de polen embriogenéticamente determinados de tal manera que hay error en la formación de los embriones y ocurre la formación de callos.

3.3 Estado de desarrollo del polen.

Durante un trabajo con 27 especies de *Nicotiana* en el que se evaluaron varios factores como : Medios de cultivo, pretratamientos, época de floración y estado de desarrollo, Tomes y Collins (1976) concluyeron que éste último fue el más importante para determinar el éxito de la inducción.

De manera aproximada el estado óptimo para la inducción del polen en las anteras puede dividirse en tres grupos: Clase I (premitótica) donde el estado óptimo se encuentra después de la meiosis y antes de la primera mitosis; Clase II (mitótica) que responde justamente antes, durante o justamente después de la mitosis y Clase III (postmitótica) en donde el estado bicelular es el mejor (Sunderland, 1979). Desafortunadamente es difícil adscri-

bir las respuestas de las anteras de los diferentes géneros exactamente en alguna de estas divisiones, aunque si puede mencionarse un estado óptimo de respuesta. Así, Horner y Street (1978a) encuentran que en *Nicotiana tabacum* cv. Barley las anteras de casi todos los estados de desarrollo del polen podían producir plántulas con un máximo en el estado bicelular temprano. Sangwan-Norreel (1977) observó en *Datura innoxia* que las anteras con polen antes de la mitosis y después de ésta respondían durante el cultivo. Cuando estas mismas anteras se sometieron a un pretratamiento se encontró la respuesta óptima después de la mitosis, Chen (1978) encontró que el estado óptimo de las anteras de *Oryza sativa* dependía de la concentración de sacarosa en el medio de cultivo. Cuando éste contenía 9 % de sacarosa el estado de desarrollo que produjo los mejores resultados fue el uninucleado temprano y cuando contenía 6 % el que mejor respuesta dió fue el uninucleado medio. En ambas concentraciones de sacarosa el estado tardío dio respuesta, aunque muy baja (menos del 13%). Las respuestas obtenidas en anteras más viejas se pueden deber a que el polen se retrasa en su desarrollo y que parte de éste aún no alcanza el estado crítico al momento de la siembra (Sunderland, 1973). En el Cuadro 2 se presentan los estados de desarrollo que producen los mejores resultados en varias especies.

3.4 Estrategias de cultivo.

El método de siembra más comúnmente utilizado consiste en depositar las anteras extraídas de los botones florales previamente esterilizados en el medio de cultivo sólido. Sin embargo, se ha sugerido que las anteras pueden te-

ESPECIE	ESTADO DE DESARROLLO OPTIMO		REFERENCIA
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Meiosis temprana (Tétrada)		Gresshoff y Doy, 1972a
<i>Triticum aestivum</i>	Tétrada		Fujii, 1970
<i>Triticum dicoccoides</i>	Tétrada		Fujii, 1970
<i>Capsicum annuum</i>	Uninucleado temprano, poco después de la liberación de la tétrada.	↓	George y Narayanaswamy, 1973.
<i>Hyoscyamus niger</i>	Tétrada o uninucleado temprano.		Corduan, 1975
<i>Hyoscyamus niger</i>	Uninucleado medio.		Raghavan, 1978
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Tétrada y Uninucleado		Gresshoff y Doy, 1972b
<i>Hordeum vulgare</i>	Uninucleado	↓	Bouharmont, 1977 y Wilson, 1977.
<i>Solanum tuberosum</i>	Uninucleado		Sopory et al 1978
<i>Datura innoxia</i>	Uninucleado		Sopory y Maheshwari, 1976a
<i>Triticale</i>	Uninucleado		Sun et al 1973
<i>Oryza sativa</i>	Uninucleado y Uninucleado tardío.		Guha-Mukherjee, 1973 e Institute of Genetics, 1974
<i>Nicotiana tabacum</i>	Poco antes, durante y poco después de la primera mitosis.	↓	Sunderland, 1973.
<i>Nicotiana tabacum</i> v <i>Barley</i>	Binucleado temprano		Horner y Street, 1978a
<i>Nicotiana paniculata</i>	Binucleado		Tomes y Collins, 1976
<i>Nicotiana glauca</i>	Binucleado		Tomes y Collins, 1976
<i>Nicotiana glauca</i>	Binucleado		Tomes y Collins, 1976

CUADRO 2. Estados de desarrollo del polen de varias especies en el cual la siembra de las anteras produce una óptima respuesta androgénica.

ner una influencia inhibitoria sobre el desarrollo del -
embrión por lo que es conveniente sembrar el polen aislado
(Nitsch, 1977). Para llevar a cabo esto se desgarran las -
anteras y se filtran en un cedazo para retirar los restos -
de estas; se deposita el polen por centrifugación y se re-
suspende para posteriormente sembrarlo en medio líquido. -
Técnicas como esta evitan la competencia del polen con los
tejidos diploides de las anteras, permiten una fácil manipu-
lación del material para estudios bioquímicos y morfológi-
cos (Nitsch, 1977) y permiten controlar y regular los fac-
tores que producen la androgénesis al eliminar la acción de
los tejidos de la antera (Reinert et al, 1975). Una variante
de esta técnica es la propuesta por Sunderland y Roberts. -
(1977), quienes aíslan el polen aprovechando que algunas an-
teras presentan dehiscencia cuando se hacen flotar en un me-
dio líquido. De esta manera se evita la ruptura de las an-
teras y el posterior aislamiento.

Sharp y Raskin (1972) propusieron la llamada técnica
nodriza con *Lycopersicum esculentum*. En esta técnica se de-
positó polen aislado sobre papel filtro que a su vez se co-
locó sobre anteras completas cultivadas en un medio sólido.
Se supuso en este caso que las anteras donaban sustancias -
para el desarrollo del polen.

Finalmente se puede mencionar una técnica que proba-
blemente dé la pauta de investigación en la formación de -
haploides de las especies de bajo porcentaje de respuesta.

Se ha recurrido a la siembra de espigas completas de
Hordeum vulgare en medio líquido (Wilson, 1977 y Wilson et
al 1978) y a siembra de espiguillas unidas a una porción de

tallo de *Festuca arundinacea* en medio sólido (Kasperbauer, et al, 1980).

Kasperbauer et al argumentan que los medios de cultivo de tejidos somáticos de gramíneas han probado ser sufi-cientes para el crecimiento de éstos. Sin embargo, el cultivo de anteras de gramíneas ha fracasado en los mismos medios. Es probable -continúan- que estos medios sean defi-cientes en algún factor que esté en el tejido somático, por lo que el cultivo nodriza podría mejorar la respuesta.

Wilson (1977) confirma en cierto modo esta afirma-ción cuando observa que, en el cultivo de espigas completas de cebada, aquellas anteras que se desprendían de ésta a - nivel del filamento y en los primeros estados de desarrollo cesaban su crecimiento. Wilson, (1977) concluye que el - efecto de este tipo de cultivo parece depender, al menos - parcialmente, de sustancias internas de la espiga.

3.5 Pretratamientos.

La idea general bajo la cual pueden aglutinarse los pretratamientos dados al material antes o durante la siem-bra se debe a Nitsch (1974 y 1977). Las observaciones he-chas por Nitsch durante el desarrollo embriogénico hicieron que propusiese que había dos pasos durante la inducción de éste. El primero era modificar el desarrollo normal - del polen, esperando con esto lograr que se comporte como - una célula somática que de origen a plántulas y el segundo era que el medio de cultivo debía suministrar los nutrien-tes adecuados para el crecimiento del embrión. El evento -

que utilizó Nitsch para provocar esta desviación del desarrollo del polen fue el sometimiento a bajas temperaturas (de 3 a 5°C por varios días). Sin embargo, existen otros pretratamientos que se mencionarán primero.

González-Medina y Bouharmon (1978) sumergieron antenas de cebada en una solución de 2,4-D por cinco horas antes de sembrarlas. Hubo 1.1 % de anteras que formaron callos y 0 % en el control.

Jensen (1974b, citado por Nitsch, 1977) señala que el efecto del frío puede ser sustituido por un incremento en la gravedad. Esto se comprueba cuando se observa que el polen de *N.sylvestris* es difícil inducir la división del polen en el cultivo. Si se aumenta la gravedad por centrifugación se incrementa el número de plantas productivas en el cultivo.

Sangwan-Norreel (1977) considera que el corte de las anteras de la flor es ya un pretratamiento puesto que se suprimen las relaciones fisiológicas de ésta con la planta. Además Sangwan-Norreel sometió las anteras de *D.innoxia* a períodos de frío o a centrifugación (5 minutos a 150°) o a ambas cosas a la vez y encontró siempre aumento de respuesta con respecto al testigo.

Wilson et al(1978) cortaron plantas de *Hordeum vulgare* al nivel del suelo y colocaron éstas en agua a temperatura ambiente por 48 hrs. Observaron que las espigas sometidas a pretratamiento presentaban con mayor frecuencia alteraciones de la primera división mitótica consistentes en

la formación de núcleos iguales o en cambios en los planos de división. Cuando se llevó a cabo la siembra el medio de cultivo las anteras pretratadas produjeron de 5 a 10 veces mayor respuesta que las anteras no pretratadas. Wilson et al (1978) concluye que, probablemente, al momento del corte hubo cambios en los niveles de hormonas como ABA, etileno y giberelinas; lo que alteró el patrón normal de desarrollo.

Wang et al (1974, citado en Collins, 1977) reportaron un aumento en la embriogénesis en arroz cuando las anteras se tomaron de inflorescencias tratadas con ácido 2-cloroetilfosfónico.

Keller y Armstrong (1979) trabajando con *Brassica campestris* encuentran que si las anteras se someten de 1 a 3 días a 35° C y luego en la siembra se colocan a 25° C se presenta un aumento significativo en el porcentaje de anteras que producen plantas (8.7 %) con respecto al testigo (0.5 %).

Los pretratamientos con bajas temperaturas sugeridos por Nitsch y Norreel (1972) se basan en trabajos como los de La Cour (1949) quién observó en *Tradescantia bracteata* que las bajas temperaturas evitaban la polarización de citoplasma por gradientes de concentración de proteínas y RNA; lo que llevaba a modificaciones en la ruta normal de desarrollo formándose dos núcleos iguales. En algunas ocasiones La Cour observó que algunos granos de polen se habían dividido varias veces.

Auf, Nitsch y Norreel (1972) encontraron que las an-

teras de *Datura innoxia* en estado de mitosis producían -
 21 % de anteras con embriones cuando se sometían a un pre -
 tratamiento por 38 horas a 3° C. El testigo (48 hrs. a -
 24°C) sólo produjo 3.2 % de respuesta. Cuando Nitsch -
 (1974) observó las anteras de *D.innoxia* con y sin pretrata -
 miento al cabo de cinco días de cultivo encontró que -
 aquellas sometidas a frío presentaban 32 % de granos de pol -
 len con núcleos iguales y el testigo solamente 3 %. Cuando -
 permitió que estas anteras siguiesen su desarrollo en el -
 medio de cultivo encontró de nuevo mayor número de embrio -
 nes por antera y mayor número de anteras con embrión en las -
 anteras sometidas a frío. Nitsch argumenta que estas obser -
 vaciones apoyan la afirmación de que el primer paso en la -
 embriogénesis es la alteración de la división asimétrica -
 del núcleo y que el frío provoca esta alteración.

Se ha mostrado que en el momento de la mitosis el -
 frío impide la migración del núcleo. Como resultado de es -
 to, el núcleo se ubica en un lugar diferente y con los ejes -
 del huso cambiados, dando origen a dos núcleos iguales, en -
 vez de dos diferentes (Sangwan-Norreel, 1977). Se sabe -
 además que el frío inhibe la acción de los microtúbulos -
 (Nitsch, 1977).

Sin embargo, Tomes y Collins (1976) con *Nicotiana* -
paniculata y *N.rústica*; Sunderland y Roberts (1978, cita -
 do en Sunderland, 1978) con *N.tabacum* y Sangwan-Norreel -
 (1977) con *Datura innoxia* encuentran que los pretratamien -
 tos de frío eran más efectivos en la inducción cuando se -
 aplicaban a anteras que, o ya habían sufrido la división o -
 se encontraban en ella. Sunderland y Roberts (1978; citado -
 en Sunderland, 1978) encuentran además que los pretratamien

tos a 7 - 9° C producían mayor número de embriones por antera que los pretratamientos a 5° C.

Ante esto Sunderland (1978) piensa que el hecho de que una temperatura alta (7 - 9° C) sea más efectiva que una temperatura baja, quiere decir que no es el frío en sí el que aumenta la producción y del hecho de que este pretratamiento sea efectivo después de la división asimétrica se sigue que el papel del frío no es producir una modificación de la primera división.

¿Cuál es entonces el papel de las bajas temperaturas? La posible respuesta probablemente se había dado ya al mismo tiempo que los experimentos de inducción anteriores.

Así, Duncan y Heberle (1978) mencionan que el polen de las anteras de *N. tabacum* sometidas a frío presentaban - después de 7 días de cultivo, 4- 40 % de polen muerto, en cambio el testigo presentaba 62 - 75 % de mortalidad. Como criterio de mortalidad se utilizó la apariencia vacía y arrugada del polen.

En *Nicotiana tabacum*, Sunderland (1978) por medio de conteos de viabilidad del polen con diacetato de fluoresceína reportó que a los nueve días de cultivo el polen de anteras sometidas a pretratamiento presentaba 26.2 % de polen viable y sólo 2.5 % en el testigo. Cuando se cuantificó el número de embriones a los 35 días se encontró que había 465 embriones en el lote sometido a frío y 29 en el control.

Tomes y Collins (1976) recalzan que cuando sometie - ron a pretratamientos las anteras de *Nicotiana paniculata* y *N. glauca* no ocurría un incremento notable en el número de anteras que producían embrión, pero que sí lo había en el número de plantas por antera. Tomes y Collins concluyen - que en este caso el pretratamiento (4° C durante 48 horas) no indujo la división del polen sino que simplemente mejoró las condiciones de la antera para la producción de los - embriones.

Duncan y Heberle (1976) sugieren que el papel del - frío en el incremento de la respuesta se debe a la disminu - ción de la mortalidad de los granos de polen.

3.6 Condiciones de desarrollo de la planta donadora de las anteras y edad de la misma.

Probablemente los resultados obtenidos en la produc - ción de haploides considerando las condiciones de desarro - llo de la planta donadora (luz, temperatura, sales minera - les, etc) y la edad de la misma sean los más conflictivos y en ocasiones francamente contradictorios, lo que hace difícil elaborar un esquema coherente que los explique.

Dunwell y Perry (1973, citado en Sunderland, 1974) - someten a plantas de tabaco durante su crecimiento a dos fo - toperíodos; uno de 8 horas y otro de 16 horas de luz. Cuan - do siembran las anteras de estas plantas encuentran que las que crecieron en períodos de ocho horas de luz muestran la mejor respuesta de las anteras y las que crecieron en perío - dos de 16 horas muestran la mayor frecuencia de inducción.-

Sin embargo, Kasperbauer y Collins (1974) concluyen que - aún cuando las plantas de *Nicotina tabacum* se cultivaron en diferentes fotoperíodos y diferentes temperaturas no hubo - diferencias drásticas en la producción de haploides.

Nitsch y Norreel (1972) mencionan que las anteras - de *D. innoxia* crecidas a su temperatura óptima producían - el mayor porcentaje de anteras con embriones, Keller y - Stringam (1978) en *Brassica napus* encuentran que había ma - yor producción de embriones en plantas que se crecieron de - 10 a 15° C que cuando se crecen de 20 a 25° C.

Sunderland (1978) sometió a plantas de *Nicotiana* - *tabacum* a un déficit de nitrógeno desde el estado de pláñ - tula. Cuando se sembraron las anteras se observó que las - que provenían de plantas sometidas al déficit producían ma - yor número de embriones por antera y mayor número de culti - vos con embrión que la planta control. En forma opuesta, - Madrigal (1978) concluye, en *Nicotiana tabacum* también, - que las anteras de las plantas fertilizadas producen más - plántulas que las plantas sin fertilizar y que el número de anteras que producen embriones fue el mismo en ambas.

La inflorescencia de tabaco en una panícula en raci - mo. Las flores maduran desde la base hacia el ápices (Ma - drigal, 1978) por lo que es posible tomar yemas florales a diferentes edades de maduración de la inflorescencia.

Sunderland (1971) concluye que las anteras tomadas en los primeros días de floración fueron mejores en porcen - taje de anteras con embriones (50 - 51.8 %) que las toma -

das a mayor edad de la misma (4.9 %) Kasperbauer y Wilson (1979) mencionan que se obtiene mayor éxito si se utilizan las primeras yemas florales que si se usan las yemas de plantas que han estado floreciendo durante algún tiempo. Contrariamente, Madrigal (1978) concluye que las yemas tomadas a diferentes tiempos de maduración de la inflorescencia no mostraron diferencias en la productividad en sus anteras atribuibles a la secuencia de la inflorescencia o la edad de la planta. Sunderland (1974) menciona que la manipulación del medio ambiente en el cual la planta donadora crece modifique probablemente los niveles internos de hormonas en las anteras.

3.7 Genotipo.

Aún cuando se utilizan los mismos medios y las mismas condiciones de cultivo se observan variaciones en la frecuencia de respuestas androgénica cuando se utilizan diferentes especies de un género o aún cuando se utilizan diferentes variedades de una misma especie.

Dentro del primer caso tenemos los experimentos de Fujii (1970) quien trabajó con *Triticum aegilopoides* y *T. monococcus* (diploides), *T. dicoccoides* y *T. durum* (tetraploides) y *T. spelta* y *T. aestivum* (hexaploides). Solamente *T. aegilopoides* y *T. dicoccoides* produjeron respuesta.

Amos y School (1978) trabajaron con *Arabidopsis* spp. De cuatro especies utilizadas *A. thaliana* produjo 1633 a 86.7 % de anteras con callos y las otras tres solamente -

de 0.04 a 0.1 %

En el segundo caso tenemos trabajos como el de Maeda et al (1978) en *Fragaria grandiflora* quienes observaron - que las anteras de la variedad Hoko-Wane producían 46.7 % - de anteras con callos y la variedad Donner solo 5.9 %.

Guha-Mukherjee (1973) en *Oryza sativa* observó que de 20 variedades sembradas solamente 9 de ellas presentaron androgénesis en un porcentaje que va de 0.3 a 26 %.

Sheridan et al (1980) sembraron las anteras de 14 - genotipos de *Zea mays* en medio N-6 y solamente 7 de ellos - produjeron callos.

Gresshoff y Doy (1972a) con anteras de *Lycopersicum esculentum* obtuvieron callosidades de solamente tres razas de un total de 43.

Bajaj (1977) obtuvo respuesta en las anteras de 10 - cultivares de *T.aestivum* de un total de 21.

Gresshoff y Doy (1972b) en *Arabidopsis thaliana* - encontraron que de 17 razas en cultivo solamente tres res - pondieron.

Sopory (1977) con clones dihaploides de *Solanum tu - berosum* dividió el polen de éstos en tres grupos de acuerdo a su respuesta androgénica. En el primer grupo no hubo res - puesta y degeneraba, en el segundo grupo hubo divisiones en

el mismo, formándose 8 - 16 células y el tercer grupo que formaba embriones globulares.

Estos problemas se presentan aún dentro de plantas con la que se han obtenido altas frecuencias de respuesta, como es el caso de *Nicotiana tabacum*. Estos medios en otras especies no resultan adecuados.

Así, Tomes y Collins (1976) encuentran que en *N. tabacum* hay 69.5 % de botones que produjeron callo o plántulas contra 50.7 % en *N. sylvestris*, 17.4 % en *N. rústica* y 29.8 % en *N. paniculata*. Otras especies no produjeron ninguna respuesta, como en el caso de *N. otophora*, *N. miersii* y *N. forgetiana*. Tomes y Collins recalcan que las plantas que respondieron lo hicieron a diferentes tiempos, en diferentes medios y en diferentes estados de desarrollo del polen, además de que algunos produjeron callos y otros plántulas que a veces eran diploides y a veces haploides.

El extremo de la influencia del genotipo se observa cuando se trabaja con diferentes variedades de *N. tabacum*.

Collins (1977) hace notar que *N. tabacum* "Burley" produce 50 - 90 % de anteras con plántulas. Cuando se utiliza la variedad Red Russian se obtiene solamente 2.6 % de respuesta.

Aún cuando no se conoce cual sería la influencia del genotipo podría utilizarse como base de investigaciones futuras las observaciones de Orlikowska (1977) y Rajasekavan

y Mullins (1979) quienes al trabajar con *Triticale* y centeno (*Secale cereale*) y *Vitis* spp respectivamente, concluyen que los híbridos eran más productivos en la respuesta androgénica.

3.8 Influencia de la pared de la antera.

Las principales evidencias de la presencia de una influencia de la pared de las anteras en la androgénesis se han obtenido de tres grupos de experimentos que son: Uso de extractos de anteras; experimentos con tejidos nodriza y experimentos que incluyen alteraciones a la pared de la antera.

Dentro de las evidencias con el uso de extractos se pueden mencionar trabajos como el de Nitsch (1974) quien obtuvo extractos de anteras de *Datura innoxia* cultivadas por una semana para mejorar la respuesta en cultivo de granos de polen aislados. Cuando Nitsch hizo un análisis de los extractos encontró que aquéllos que presentaban alta actividad inductora tenían altas concentraciones de serina. Cuando agregó este compuesto junto con glutamina e inositol recuperó los altos rendimientos en cultivos con polen aislado, aún sin los extractos. Sin embargo, Wernicke y Kohlenbach (1977, citados por Kasperbauer y Wilson, 1979) no pudieron detectar serina en extractos similares. En cambio, registraron altas concentraciones de asparagina, glutamina y prolina que, al ser adicionados al medio de cultivo fueron incapaces de ayudar al crecimiento de polen aislado.

Sunderland (1978) observó que los extractos de anteras en embriogénesis estimulaban el desarrollo del polen - previamente liberado por antesis; de tal manera que ocurría un aumento del número de embriones producidos. Cuando este extracto se hervía perdía sus cualidades y no se obtenía - respuesta alguna de embriogénesis. Cuando Sunderland agregó serina, glutamina e inositol, de acuerdo a la recomenda - ción de Nitsch, obtuvo de nuevo incrementos en la respuesta androgénica.

Sunderland y Roberts (1977) trabajando con *Nicotiana tabacum* descubrieron que el polen aislado podía crecer en medios con glutamina, serina e inositol (Medio AGSI) y no - lo hacía en el medio solo (Medio A). Cuando colocaron en el medio A anteras de tabaco éstas presentaron poco después - antesis y el polen liberado sí creció en este medio aún - cuando se habían retirado las anteras. Sunderland y - Roberts concluyeron que las anteras que se habían estableci - do previamente secretaban sustancias hacia el medio que per - mitieron el desarrollo del polen liberado. Sugirieron ade - más que el tapetum puede ser el causante de esta influen - cia ya que se cree que tiene un papel nutritiva y - que libera sustancias al degenerar.

Weatherhead y Henshaw (1979) analizaron los niveles de aminoácidos en anteras de *Solanum spp* y encontraron al - tas concentraciones de asparagina, glutamina y ácido amino - adípico. Cuando se agregó glutamina y asparagina en el me - dio de cultivo; las anteras de *S. tarijense* mostraron forma - ción de granos multicelulares y embiones. En cambio, cuan - do se agregó al medio de cultivo glutamina y ácido amino - adípico las anteras de *S. stoloniferum* mostraron degenera -

ción del polen.

Los experimentos con cultivos nodriza fueron hechos por Sharp y Raskin (1972) quienes sembraron anteras de *Lyco persicum esculentum* en un medio de cultivo sólido, encima de anteras se colocó un papel filtro esterilizado y luego sobre éste una suspensión de polen aislado. Obtuvieron de esta manera la formación de clones. Se supuso que las anteras juegan un papel nutritivo para el polen.

Pelletier e Ilami (1972, citados en Sunderland, 1974) llevaron a cabo experimentos con la transferencia de polen en estado de mitosis desde las anteras de un cultivo de tabaco a las anteras de otros cultivos. En muchos casos el polen extraño daba origen a plántulas. La antera nodriza podía ser sustituida por anteras de otras especies, tales como *N. glutinosa* y *Petunia hybrida* o aún por callos de pétalos de petunia.

Kasperbauer et al (1980) utilizaron anteras de *Festuca arundinacea* unidas a una porción de panícula bajo la suposición de que el tejido nodriza contenía algún factor necesario para el desarrollo del polen durante la androgénesis *in vitro*. Cuando utilizaron anteras solas no hubo división del polen. Las anteras con una porción de panícula presentaron formación de plántulas.

Los experimentos donde se muestra que una alteración de la pared de la antera modifican la respuesta androgénica se pueden ejemplificar con los trabajos de Pelletier e Ilami (1972, citado en Sunderland, 1974) quienes en N . -

tabacum hallaron una correlación entre la respuesta de la antera y la velocidad de senectud de la pared de *cuta*. Cuando se retardaba la senectud de la pared la respuesta androgénica se incrementaba. La respuesta más alta se obtuvo en anteras que permanecieron verdes la mayor parte del tiempo.

Sopory y Maheshwari (1976a) en *Datura innoxia* observaron que aquellas anteras que tenían mayor superficie de contacto con el medio y que no estaban incluidas en este presentaban el mayor porcentaje de embriogénesis. Cuando las anteras se hundían en el agar no había respuesta.

Horner y Street (1978a) en *N. tabacum* llevaron a cabo cortes en las anteras que dañaban a la pared de estas. Encontraron que entre más daño se producía a la pared de la antera menor era el porcentaje de respuesta androgénica que presentaba ésta y menor era la viabilidad del polen en el cultivo. Si el daño extremo-corte transversal a la pared de la antera se posponía durante el cultivo por 6, 10 o 17 días se encontraban con un aumento progresivo en la respuesta androgénica (12, 24 y 16% de las anteras presentaban, respectivamente, androgénesis). Horner y Street encontraron además que el polen aislado de la antera podía sufrir embriogénesis si se extraía de las anteras después de un precultivo de 14 días. Si llevaban solamente cuatro días de precultivo no se producían plántulas.

En contradicción -tal vez solo en apariencia- con el trabajo anterior, Raghavan (1978) encontró que las anteras de *Hyoscyamus niger* seguían produciendo embriones aún cuando las anteras se seccionaban en cuatro partes y se

sembraban aparte. Sin embargo, Raghavan observó que los granos de polen que daban origen a los embriones estaban confinados a la periferia del lóculo, cerca del tapetum. Raghavan recuerda de nuevo que se ha postulado al tapetum como una fuente de sustancias nutritivas para el desarrollo del polen.

La aceptación de la pared de la antera como un tejido nodriza que nutre a través de la pared a las microsporas nos ayudaría a entender porqué las anteras de algunas especies como *Nicotiana* y *Datura* presentan androgénesis en medio tan simples como agua, sacarosa y agar (Nitsch, 1977) porque en el cultivo de polen aislado hay mayor éxito si éste se extrae de anteras pretratadas (Keller y Stringam, 1978), porque algunas especies no requieren reguladores del crecimiento en el medio (Sunderland y Dunweell, 1974) y finalmente porque es necesario inducir una división excesiva de la pared de las anteras de plantas de hule antes de que se inicie la división del polen (Hu et al, 1978).

Sunderland (1974) reunió las características de la influencia de la pared de la antera sobre la androgénesis en un modelo que se reproduce en la Figura 3. En este modelo Sunderland propone que existe una receptividad del polen (P) que interactúa con un factor de la antera que, de acuerdo al modelo, podría dividirse en dos componentes, uno α , que influye directamente sobre el polen y otro, β que se relaciona con el desarrollo de la antera. Con estos elementos Sunderland propone una explicación a los diferentes comportamientos de frecuencias de inducción en varias especies. Así, cuando coinciden todos los elementos (Caso

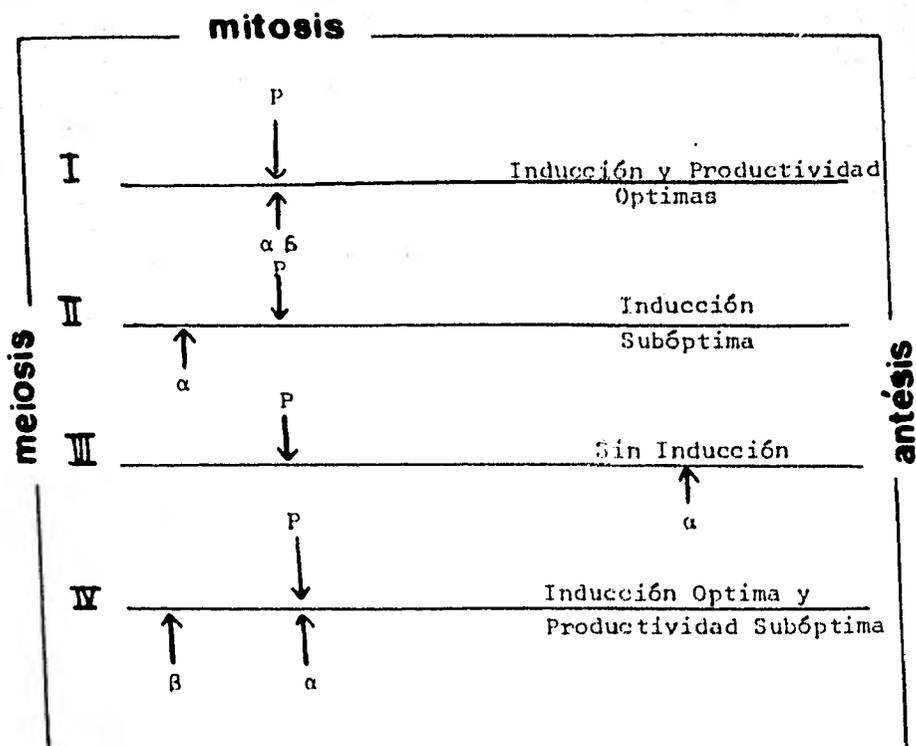


Figura 3. Esquema hipotético que explicaría las respuestas de las anteras en el estado de mitosis. La receptividad del polen (P) y los factores de la antera α y β son máximos en I (*O. innoxia*). El caso II corresponde a cereales, el III a especies no inducibles y el caso IV se aplicaría a anteras de tabaco. Sunderland, (1974).

I) se produciría una inducción y productividad óptimos. Este sería el caso de *Datura innoxia*. Cuando los factores - están ligeramente desfasados (Caso II) se produciría una - inducción baja, como en los cereales y si lo están totalmen - te no habrá inducción (Caso III). El caso de *N. tabacum* se explicaría por la coincidencia de dos factores y el desfasa - miento ligero de otro de ellos (Caso IV).

4. Mecanismos de acción.

Implicaremos dentro de los mecanismos de acción a - aquellos hechos que nos ayudan a comprender que le ocurre - al polen en el momento de la siembra; que posteriormente - lo llevan a dividirse y presentar androgénesis. Estos he - chos se han dividido en dos grupos:

4.1 Cambios citoplásmicos en el polen durante la androgénesis.

4.2 Dimorfismo del polen.

4.1 Cambios citoplásmicos en el polen durante la androgé - nesís.

Cuando el polen se diferencia normalmente durante - la primera mitosis mediante una división asimétrica se forma una célula grande; con citoplasma denso y un núcleo prominente; llamado célula vegetativa y otra célula más pequeña, con un núcleo pequeño que se tiñe intensamente y con un citoplasma transparente, esta es la célula generativa.

La célula vegetativa que dará origen al tubo polínico, llega a ser muy activa metabólicamente. Su núcleo es grande, contiene un nucleolo bien definido y su nivel de ADN no cambia (Nivel 1C); presenta un citoplasma muy denso debido a una síntesis activa de proteínas y a la presencia de ARN y organelos. Esta característica del citoplasma provoca que éste se tiña intensamente.

La célula generativa, después de la primera mitosis, entra en profase por lo que su ADN se duplica (Nivel 2C) y en el caso de *N. tabacum* permanece en este estado hasta la fecundación. No hay síntesis de proteínas ni presencia de RNA en el citoplasma de la célula generativa (Sunderland, 1971 y 1973). La diferenciación lleva entonces a una interrupción de la síntesis del ADN y a una continuación de ésta en el caso de proteínas y ARN en la células vegetativa y a la inversa en la célula generativa (Sunderland, 1971).

De acuerdo a Dunwell y Sunderland (1974a) cuando se siembran anteras de *N. tabacum* y se observan éstas dos o cinco días después de la siembra se encuentra que aparecen tres tipos de granos de polen. Dos de ellos parecen haber seguido un desarrollo normal de maduración gametofítica y presentan inicios de germinación o depósito de almidón. El otro tipo de granos de polen presenta una célula vegetativa típica con un citoplasma densamente poblado de ribosomas, mitocondrias, plastidios y retículo endoplásmico careciendo de almidón. Algunos de estos granos de polen presentan pequeñas vacuolas. Dunwell y Sunderland supusieron que estos granos de polen habían detenido su desarrollo. Sin embargo, cuando muestrearon a los siete y ocho días de siembra

(Dunwell y Sunderland, 1974 b) observaron que estos granos retardarios sufrían un cambio profundo en su citoplasma. Había reducción en el número de organelos y en ocasiones - éstos se agrupaban alrededor del núcleo vegetativo, haciendo que el citoplasma permaneciese claro y no se tiñiese con acetocarmín. A los doce días estos granos de polen mog traban este proceso degradativo más claramente, notándose - que ya pocos organelos y ribosomas permanecían.

Bhojwani et al (1973) detectaron este cambio en la afinidad del citoplasma de la célula vegetativa para los colorantes y notaron que esta característica precede a la división del núcleo vegetativo durante la embriogénesis. Bhojwani y - sus colaboradores encontraron que en estos granos había - una disminución de ARN y no ocurría síntesis de proteínas. Llamaron a estos granos embriogénéticos. En cambio, en los granos de polen no embriogénéticos los niveles de ARN y proteínas fueron los mismos que los correspondientes niveles - granos de polen tomados *in vivo* durante la antesis.

Poco después de la primera división del núcleo vegetativo Dunwell y Sunderland (1975) encontraron restauración de la densidad del citoplasma de las células hijas, - y un incremento en el número de organelos, es decir, la - primera división estaba acompañada de una síntesis citoplásmica muy intensa pues había de nuevo mitocondrias, dictiosomas y retículo endoplásmico. Así, la posibilidad - de que el mecanismo de acción para la androgénesis inclu- ya una desdiferenciación (Sunderland y Wicks, 1971) se refuerza. Se sugiere que durante la inducción ocurre un - reemplazo de un programa de desarrollo por otro, por lo - que hay una degradación de los componentes del citoplasma y que esto ocurre junto a una reorganización de las células vege

tativas cuando retornan éstas al estado mitótico. No es irrazonable suponer que los componentes degradados son aquellos que producen el desarrollo normal de polen (Sunderland y Wicks, 1971 y Sunderland, 1973).

Dunwell (1978), en la misma línea, confirma que la exposición de las anteras por 24 horas en inhibidores de síntesis de proteínas producían un decaimiento en la producción de plántulas.

En el caso de que la primera división mitótica no ocurra en forma asimétrica y se produzcan dos núcleos iguales que den origen a embriones, Rashid y Street (1974) sugirieron que en este caso el proceso degradativo de desdiferenciación puede llevarse a cabo más fácilmente ya que en el primer caso el citoplasma debe cambiar o desdiferenciarse.

Los trabajos anteriores, por ser muy consistentes, deben considerar hechos como la observación de Raghavan (1976) quien encontró que en las anteras de *Hyoscyamus niger* era el núcleo generativo el que se dividía para dar origen a la androgénesis.

Una aportación en tal sentido fue llevada a cabo por Raghavan (1979) quien expuso anteras de *Hyoscyamus niger* a $5\text{-}^3\text{H}$ Uridina en un medio líquido durante una o dos horas. Después se extrajeron las anteras y se cortaron en cuatro. Una porción se fijó y otra se sembró en medio sólido. En el polen fijado en $5\text{-}^3\text{H}$ Uridina se presentaba en el núcleo. Cuando se observó el polen después de 5 días

de cultivo la 5-³H Uridina se encontraba en el citoplasma y en núcleo. Cuando se aplicó actinomicina-D al medio se observó que entre más se retardaba el momento de su aplicación mayor era el número de embriones producidos. Se concluyó que probablemente la síntesis de RNAm o ARNt era necesario para la embriogénesis.

4.2 Dimorfismo del polen.

Durante el desarrollo normal *in vivo* del polen pueden presentar ocasiones anormalidades. Hay dos anormalidades que son comunes en el proceso: a) división simétrica que produce núcleos semejantes y b) que en ocasiones pueden ocurrir divisiones suplementarias del núcleo vegetativo. Estos granos de polen atípicos presentan, además, un bajo contenido de ARN y proteína, por lo que los colorantes citoplásmicos no los tiñen. Se ha encontrado que estas divisiones atípicas ocurren en frecuencias bajas y sin embargo, hay agentes que pueden aumentar estas anormalidades como serían cambios de temperatura o el simple corte de las anteras (Dunwell, 1978).

Como ya se dijo anteriormente, en *Nicotiana tabacum*, los granos de polen que se van a dividir durante la androgénesis presentan un citoplasma claro, con poca afinidad por los colorantes como acetocarmín y con bajos niveles de RNA y proteínas (Bhojwani et al, 1973).

Se ha concluido entonces que la desdiferenciación estructural observada en *N. tabacum* no es probablemente el

resultado del cultivo, sino que en las anteras hay granos - que prosiguen este camino aún *in vivo* y que estos comprenden la población embriogénica (Dunwell, 1978). Lo anterior sugiere la existencia de una predeterminación. Las evidencias en este sentido son varias, por ejemplo:

Dale (1975), trabajando en *Hordeum vulgare* observó - que el polen binucleado presentaba un dimorfismo consistente en que algunos granos de polen se teñían con acetocarmin y otros no lo hacían. Los llamó granos T y granos NT respectivamente. Este dimorfismo en el polen no se observa en anteras en estado uninucleado. Dale observó que en 275 anteras no sembradas se producían aproximadamente cinco granos de NT por antera y que en 249 anteras sembradas se producían 2.6 callos por antera. Dale observó además que los granos NT se ubicaban con preferencia en el punto apical de la antera. Cuando obtuvo la proporción de embriones que se producían en la parte apical de la antera encontró que la mayoría de éstos estaban en esta posición. Se propuso entonces que los granos NT y los embriones se derivaban del mismo tipo de células.

Horner y Street (1978b) trabajando con anteras maduras de *N. tabacum* observan un dimorfismo de los granos de polen caracterizado por el tamaño de éstos. Se les denominó granos P (pequeños) y N (normales). Encontraron que la distribución de los granos P entre las anteras era muy variable. Los granos P tenían un diámetro de $24.4 \pm 0.17 \mu\text{m}$. Los embriones obtenidos mediante la siembra de anteras más jóvenes presentaban un tamaño de $24.3 \pm 0.39 \mu\text{m}$ a diferencia de los granos normales que median 35 - 40 μm . Se con-

cluyó que los granos P dan origen a los embriones, lo que implica que la androgénesis está potencialmente predeterminada en la ontogenia del polen. Horner y Mott (1979) añaden además que los granos N de *N. tabacum* presentan almidón y se tiñen intensamente con acetocarmín y los granos P carecen de almidón y el citoplasma se tiñe débilmente. Horner y Mott encuentran que en ningún caso hubo un número de embriones que excediera la media o el máximo de granos P, por lo que concluyen que el número de granos susceptibles de llegar a ser embriogénicos se determina antes del corte de la antera y antes del cultivo *in vitro*. El hecho de que la frecuencia de los granos P varíe de uno a treinta por ciento implica la posibilidad de la influencia del medio ambiente.

Sunderland (1974) y Sunderland y Dunwell (1974) mencionan la existencia de un dimorfismo del polen en anteras maduras de *Paeonia hybrida* que afecta a 15 - 20 % de la población de granos de polen y Sunderland (1978) menciona que se ha demostrado que este polen anómalo es la fuente de unidades embriogénicas producidas en cultivo.

Contraria a esta posición están las observaciones de Bouharmont (1977) quien encuentra frecuencias muy altas de granos de polen en embriogénesis que no correlacionan con las frecuencias de granos de polen irregulares y Dunwell (1978) quien señala que sometiendo a las espigas a pretratamientos es posible incrementar el número de granos embriogénicos por encima del número de granos dimórficos evidentes en la antera madura.

A pesar de esto, Sunderland (1978) concluye que se ha alcanzado una situación en el cultivo de anteras que sugiere que el polen en embriogénesis está predeterminado y que el número de granos de polen competentes para la morfogénesis puede ser aumentada más efectivamente por la manipulación de las plantas donadoras. El papel del cultivo -continúa- es visto ahora no como un vehículo de inducción sino como un medio de disparar el crecimiento. Tanto el medio como la antera contribuyen a este mantenimiento.

En el caso de *N. tabacum* en donde todas las anteras presentan granos P embriogénicos y sin embargo no se obtienen 100 % de anteras con embriogénesis se explicaría esto por la influencia de la pared de la antera (Horner y Mott, 1979).

III. MATERIALES Y METODOS.

1. Material vegetal.

Se utilizaron plantas de tabaco (*Nicotiana tabacum* - L. Wisconsin 38) y de trigo (*Triticum aestivum* L. var. - Era y Lerma Rojo). Las semillas fueron proporcionadas por: Dr. Remigio Madrigal, Depto. de Fitotecnia, UACH y por los Drs. Héctor González Rosas y Alfonso Larquó del Centro de Genética y el Centro de Botánica del C.P., respectivamente. Las semillas de tabaco se sembraron en almácigos de plástico de 36.5 x 25.0 x 8.2 cm y las semillas de trigo en recipientes de plástico de 30 x 40 cm. Se utilizó suelo preparado con dos partes de tierra de monte y una parte de arena de río. Cuando las plántulas de tabaco alcanzaron un tamaño aproximado de 4 a 5 cm. se transplantaron a recipientes de 30 x 40 cm en número de dos por recipiente. En el caso del trigo se sembraron 10 semillas por recipiente.

En el caso de tabaco se sembró un lote de 20 recipientes y en el caso de trigo se hicieron siembras escalonadas de 6 a 10 recipientes cada una.

Se utilizó fertilizante Verdor (15.3 - 19.6 - 15.3) el cual se agregó periódicamente.

La siembra y crecimiento de las plantas se llevó a cabo en invernadero.

2. Colecta del material.

Durante la selección del material del cual se extraerían las anteras para la siembra se recurrió solamente a un criterio visual.

Las anteras de tabaco utilizadas provenían de botones florales cuyos pétalos eran aproximadamente del mismo tamaño que los sépalos. La mayoría de las anteras tomadas de yemas en estas condiciones mostraron tener polen uninucleado.

Las espigas de trigo de las cuales se tomaron las anteras para la siembra presentaban la hoja bandera cubriendo a la espiga y con las aristas sobresaliendo 1 - 2 cm en la lígula. La mayoría de las anteras tomadas de espigas en estas condiciones presentaban polen en estado uninucleado temprano, tardío y en mitosis y binucleado.

3. Determinación de la viabilidad del polen.

Se hicieron pruebas previas para determinar el colorante que se usaría en los conteos de viabilidad del polen. Se consideraron tres colorantes posibles: El azul de Evans (Gaff y Okong'o-Ogola, 1971); el colorante propuesto por Alexander (1969) y el cloruro 2,3,5-Trifeniltetrazolio en la forma recomendada por Vicitez (1952).

Después de las pruebas necesarias (ver resultados) se escogió para medir la viabilidad del polen el colorante Azul de Evans en la concentración de 0.25 % recomendada por Gaff y Okong'o-Ogola (1971) en sacarosa 0.2 M. Este colorante indica la viabilidad de las cé-

lulas a través de que éstas cuando están intactas, son impermeables al colorante y permanecen de color claro sobre un fondo azul intenso, lo que permite distinguirlas fácilmente. Cuando se dañan las células penetra el colorante y éstas toman un color azul.

Para llevar a cabo los conteos se colocó una gota de Azul de Evans en el portaobjetos y sobre ésta las anteras. Con una aguja de disección de punta delgada se seccionaban varias veces las anteras procurando expulsar las microesporas.

En el caso del trigo no era necesario retirar los restos de las anteras y se colocaba inmediatamente un cubreobjetos. En el caso de las anteras de tabaco se retiraban los restos de éstas con unas pinzas de relojero y se colocaba entonces el cubreobjetos. Se hizo el conteo del número de granos de polen vivos y muertos en el microscopio óptico a un aumento de 100 x. Para los conteos se utilizó un contador manual de dos teclas, una de ellas se asignó al conteo de granos vivos y la otra al de granos muertos. De cada antera de trigo se contaron como mínimo 250 granos de polen y para las anteras de tabaco un mínimo de 1000 granos.

4. Curvas de coeficiente de variación.

Puesto que se quería saber la respuesta de viabilidad de las anteras durante el cultivo se hacía necesario partir de la viabilidad conocida de un grupo de ellas.

Se decidió que el grupo de anteras del que se partiría sería aquél que se extrajese de una espiga en el caso del trigo y de una yema floral en el caso del tabaco. Fue necesario entonces conocer el tamaño de la muestra para una espiga y para una yema floral, es decir, cuantas anteras de una espiga y de una yema floral es necesario contar para conocer la viabilidad del polen.

Para determinar el tamaño de la muestra se utilizó el método de reducción del coeficiente de variación al aumentar el tamaño de la muestra (Muñoz, 1980).

En el caso de la determinación del tamaño de muestra para las espigas de trigo se procedió de la siguiente manera: Debido a la diferencia de tamaños de las espiguillas basales y superiores se desechaban de 3 a 5 de ellas de cada extremo y se dejaban las centrales. Estas se numeraban progresivamente desde la base hasta el ápice. Posteriormente se contaba la viabilidad del polen de dos anteras de cada espiguilla. Las dos anteras que se contaban correspondían una a cada una de las dos florecillas más externas de las espiguillas, desechándose el resto. En este estado de desarrollo las espiguillas constaban por lo regular de tres florecillas grandes por lo que se desechaba la intermedia.

Los datos de número de granos de polen vivos y muertos para cada antera se iban anotando en tablas como la que se muestra en la Figura 4.

Una vez obtenidas las cantidades de granos de polen vivos y muertos para todas las florecillas consideradas se

ESPIGA 1

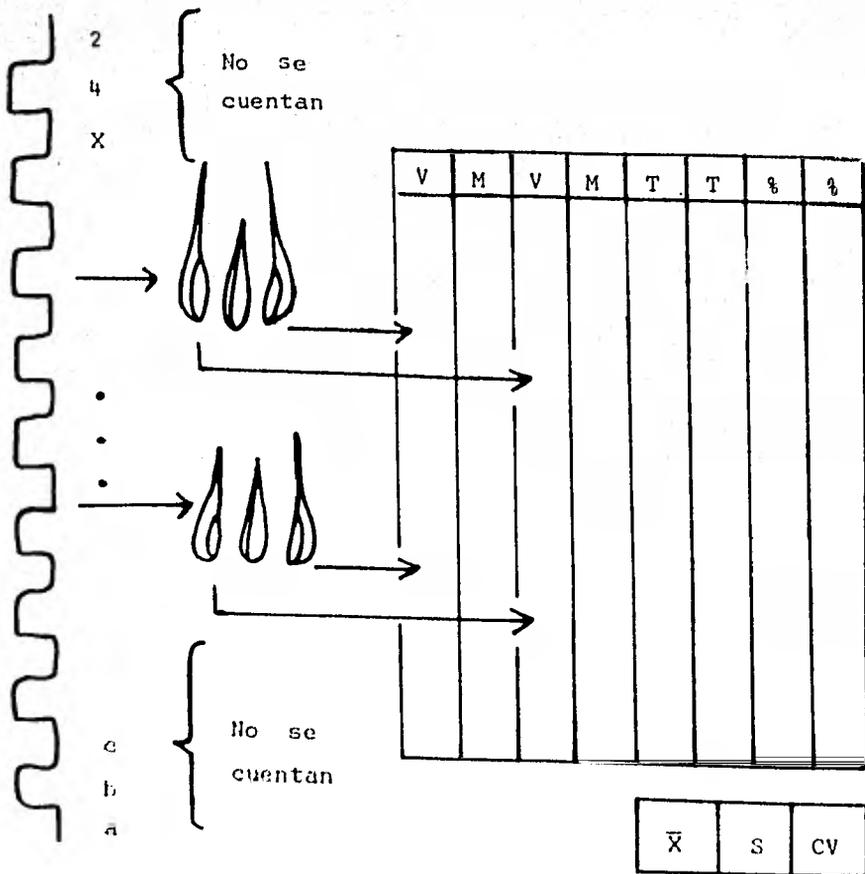


FIGURA 4. Conteo de la viabilidad del polen en las espiguillas centrales de una espiga de trigo. Se obtienen con estos valores una \bar{X} y un C.V. para la espiga en conjunto. Posteriormente se determinó el tamaño de la muestra.

obtenía la media de viabilidad de la espiga y su coeficiente de variación (C.V.). Las mediciones anteriores se hicieron para 10 espigas de la variedad Lerma Rojo y 9 de la variedad Era. Una vez obtenidos los datos anteriores se procedió a determinar cual era el número mínimo de espiguillas que debían contarse para obtener un C.V. semejante al que se obtenía cuando se contaban todas las espiguillas. Puesto que se habían numerado las espiguillas; mediante una tabla de números al azar se hicieron grupos de 2, 3, 5 y 7 espiguillas que representaban 4, 6, 10 y 14 anteras respectivamente. De cada grupo de espiguillas se obtuvo una media de sobrevivencia y un C.V. Este procedimiento se llevó a cabo para las 10 espigas de trigo Lerma Rojo y las 10 de Era y los resultados se anotaban en tablas como la que se presenta en el Cuadro 3. Finalmente, se procedió a trazar gráficas en las que se señalaron el número de espiguillas contadas y su respectivo C.V. obtenido. El tamaño de la muestra óptima estaría representado por el punto de inflexión de la curva (Muñoz, 1980).

Para la determinación del tamaño de la muestra de las anteras de tabaco se siguió un procedimiento semejante al que se llevó a cabo para el trigo. En este caso no se eliminaron anteras de las yemas florales. Se contaron los granos de polen vivos y muertos de todas las anteras (5) de varias yemas florales y se obtuvo una media y un coeficiente de variación para cada una. Los resultados obtenidos en estos conteos hicieron innecesario obtener gráficas de número de anteras utilizadas vs. C.V. como se señala posteriormente en los resultados.

ESPIGA Número

NUMERO DE ESPIGUILLAS UTILIZADAS PARA OBTENER \bar{X} , S y C.V.							C.V.
2 (4 anteras)	3 (6 anteras)	4 (8 anteras)	5 (10 anteras)	7 (14 anteras)	Todas		
4,7 % % % % \bar{X} C.V.	6,1,8 % % % % % % \bar{X} C.V.	5,1,4,3 . \bar{X} C.V.	1,8,9,12,4 . \bar{X} C.V.			
7,1 % % % % \bar{X} C.V.							
.
10							

CUADRO 3. Cálculo del coeficiente de variabilidad para un número creciente de espiguillas. Las espiguillas utilizadas se escogen por tablas de números al azar.

5. Siembra de las anteras.

Para la siembra de las anteras de trigo se procedió de la siguiente manera: Tres días antes de la siembra se cortaban las espigas por debajo de la hoja bandera y se colocaban en un matraz con agua. Una vez en el laboratorio, se les despojaba de la hoja bandera y se envolvían en papel aluminio y se colocaban de nuevo en agua. El matraz con las espigas se metía al refrigerador durante los tres días siguientes a una temperatura de 3 a 5° C, para someterlas a pretratamiento. Al cabo de los tres días se sacaban las espigas y se desinfectaban con hipoclorito de sodio al 2 ó 4% durante 15 minutos. Posteriormente, en una cámara de flujo laminar Veeco se enjuagaban tres veces con agua destilada esterilizada y se pasaban a una caja de Petri también esterilizada. Después con unas pinzas de relojero se retiraban, por lo dicho anteriormente, las espiguillas basales y superiores y se desechaban; luego se procedía a extraer las anteras y a sembrarlas en el medio de cultivo contenido en cajas de Petri de 9 cm. de diámetro. Las anteras se inocularon en el medio de cultivo en el mismo orden en el que se extraían de la espiga, por lo que se siguió el sentido de las manecillas del reloj en el medio de cultivo, con el fin de indicar las anteras basales y superiores. Las anteras se sembraron en parejas de tres para indicar las correspondientes a cada espiguilla. Una esquematización de tal procedimiento se observa en la Figura 5. Una vez llevada a cabo la siembra; se tomaban al azar dos anteras de cada espiguilla hasta completar el número de anteras necesario para conocer el porcentaje de viabilidad del polen al inicio de la siembra. Estas anteras se colocaban en otra caja de Petri con un papel filtro húmedo y se procedía a contar. La

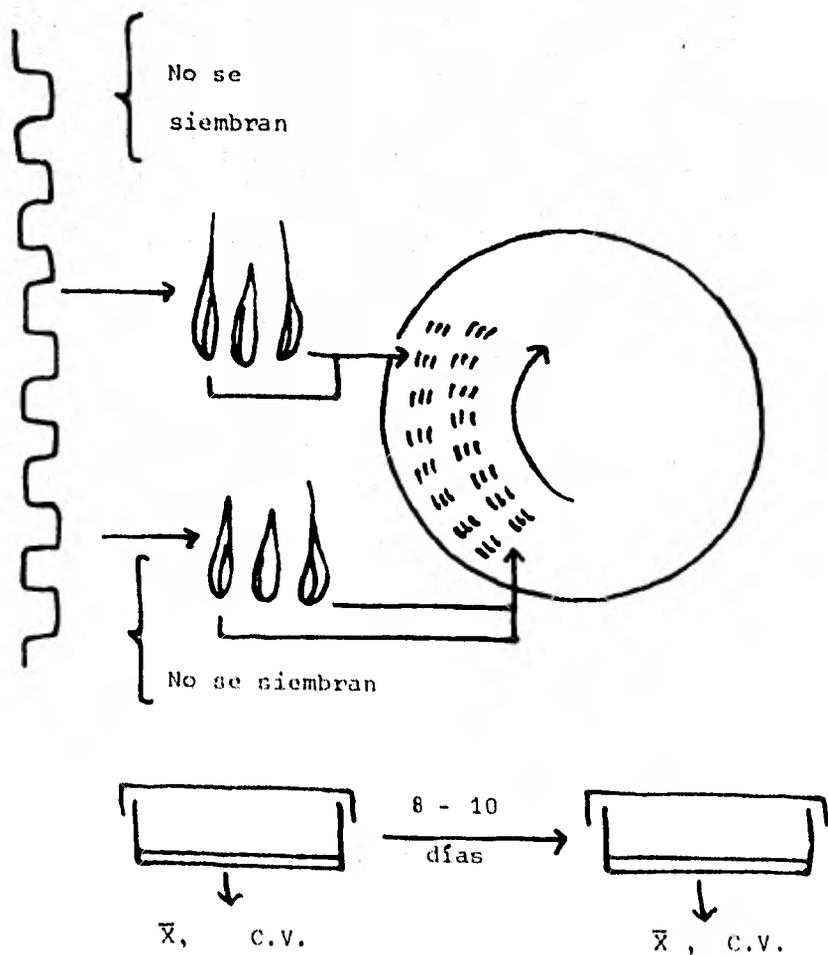


FIGURA 5. Siembra de las anteras de trigo. Sólo se utilizaron las anteras de las florecillas externas. Durante el muestreo se tomó al azar una antera de cada florecilla hasta completar el tamaño de la muestra adecuada.

caja de Petri con el medio de cultivo y con las anteras restantes se selló con parafilm para evitar la desecación y se incubaban en cámaras de crecimiento Warren Sherer-Kysor a una temperatura de 28°C, intensidad luminosa de 3000 lux y con un fotoperíodo de 16 horas de luz. Al cabo de cierto tiempo en cultivo se extrajo de nuevo, en la cámara de flujo laminar, otro grupo de anteras y se llevó a cabo un segundo conteo de viabilidad del polen. Con los datos recogidos se obtuvo una media de viabilidad inicial y final para cada espiga.

Se sembraron 10 espigas de cada variedad de trigo (Era y Lerma Rojo) para tres medios de cultivo diferentes (factorial de 2×3). Los resultados se indicaron para cada medio como la media inicial y final de 10 espigas y con su desviación (desviación de las medias).

Para la siembra de las anteras de tabaco se siguió el siguiente procedimiento: Las yemas florales de tabaco no se sometieron a un pretratamiento de frío una vez colectadas y previa desinfección se sembraban directamente en el medio de cultivo. El medio de cultivo estaba servido también en cajas de Petri. Para la desinfección de las yemas florales se siguió el mismo procedimiento que en las espigas de trigo. Para la siembra se extrajeron las anteras de las yemas florales con unas pinzas de relojero bajo la corriente de aire estéril de la cámara de flujo laminar. Las anteras se colocaban en el medio de cultivo en filas de 5 para identificar las anteras de cada yema floral. En ca-

da caja de Petri se sembraban de 6 a 7 yemas florales, una esquematización de este procedimiento se observa en la figura 6. En el caso del tabaco no se contó, la viabilidad inicial del polen por motivos que se justifican más adelante - (Ver resultados). Una vez sembradas varias cajas de Petri se procedió a sellarlas con parafilm y a colocarlas en las cámaras de cultivo, en las mismas condiciones que las siembras de trigo. Al cabo de cierto número de días se extrajo en la cámara de flujo laminar cierto número de anteras de cada yema y se contaba la viabilidad del polen.

Para el tabaco sólo se probó una variedad de éste - (W38) y sólo un medio de cultivo.

Los resultados se reportaron como la media, desviación y C.V. de un grupo de yemas florales.

6. Medios de cultivo.

Para la siembra de las anteras de trigo se prepararon los medios N-6 (Hu Hanet al 1978); Murashige y Skoog (1962) con las concentraciones hormonales y de sacarosa sugeridas por Wang et al (1973) y que fueron: 2 mg/lt 2,4-D y 3 mg/lt de cinetina y 6 % de sacarosa y finalmente, el medio de Murashige y Skoog (1962) con los aditamentos y concentraciones hormonales sugeridas por Ouyang et al (1973) y que consisten en lo siguiente: ADN hidrolizado (60 mg/lt), lactoalbúmina (300 mg/lt), 0.7 mg/lt de 2,4-D y 10 % de sacarosa. No se aumentó la concentración de Tiamina-HCl (0.4 mg/lt) sugerido también por Ouyang et al (1973)

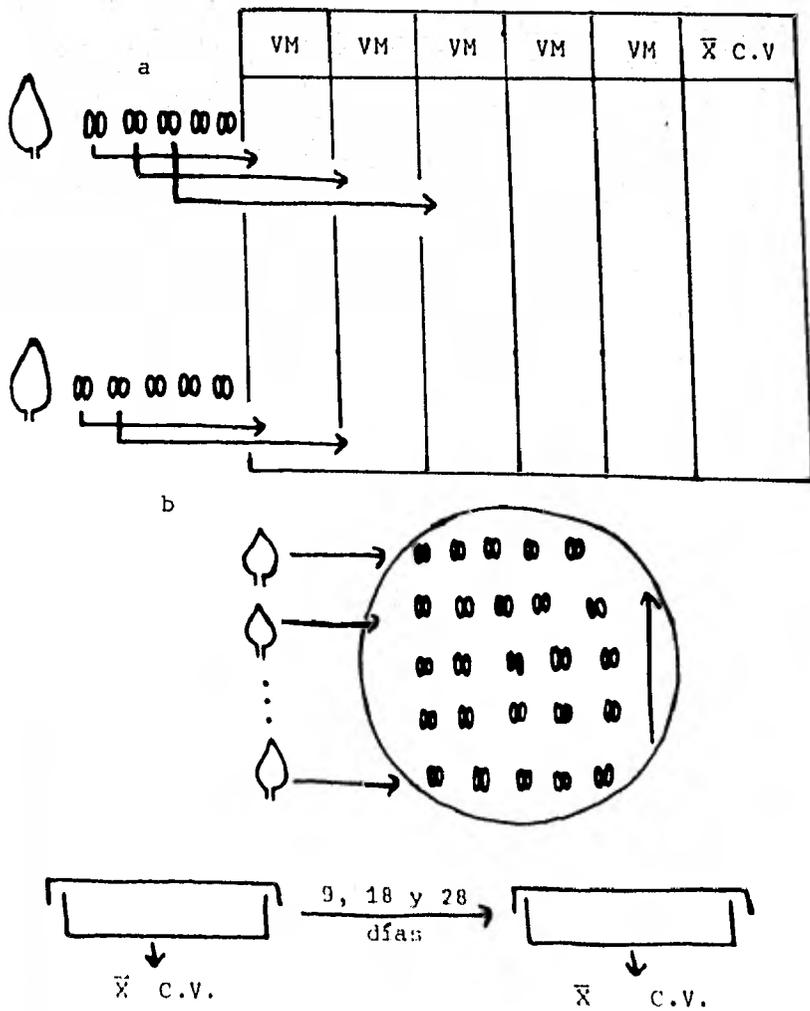


FIGURA 6. a) Conteo de la viabilidad del polen para determinar el tamaño de la muestra. b) Siembra de las anteras. Se muestreó una antera por cada botón floral a los 9, 18 y 28 días de la siembra.

Para la siembra de las anteras de tabaco se utilizó el medio de Murashige y Skoog (1962) con las modificaciones señaladas por Madrigal (1978) y que consisten en lo siguiente: En mg/lt, sacarosa, 30,000; ácido bórico, 3; benciladenina, 0.03; tiamina HCl, 1000; *D*-inositol, 15,000; PVP - 10 (Polivinil Pirrolidona, P.M. 10), 1,000; PVP - 44, 30,000; pirogalol, 100; urea, 30; y ácido nordihidroquaiarético (Nordihydroquaiaretic acid).

En todos los casos el pH del medio fue llevado a 5.8 con NaOH y HCl 1N. Se sirvieron 16 ml del medio en cajas de Petri de 9 cm. de diámetro y se esterilizó en autoclave a 1 kg/cm² durante 15 minutos.

IV. RESULTADOS

1. Determinación de la viabilidad del polen.

El Azul de Evans recomendado por Gaff y Okong'o- - ogola (1971) basa su discriminación entre las células vivas y las muertas en la permeabilidad de la membrana a éste. Cuando el polen muere el colorante penetra y adquiere una coloración azul intensa. Si los granos de polen están vivos el colorante no penetra y -si la preparación no tiene una cantidad excesiva de colorante- se ven transparentes y brillantes.

El Cloruro de 2,3,5-Trifeniltetrazolium en la forma recomendada por Vieitez (1952) producía una coloración rojo claro debido a la precipitación de Trifenil formazan (Machlis y Torrey, 1956) en los granos de polen viables. Sin embargo, en el microscopio es difícil distinguir esta coloración con claridad y en consecuencia el contraste entre las células vivas y las muertas no era marcado.

El colorante propuesto por Alexander (1969) es en realidad una mezcla que tiñe simultáneamente el citoplasma con Fucsina ácida y Naranja G y la pared celular con Verde de malaquita. Cuando el polen aborta pierde su citoplasma y sólo permanece la pared celular que se tiñe de verde con el colorante de Alexander. Si el grano de polen sobrevive predomina entonces la coloración roja de la tinción del citoplasma. Esto hace adecuado a este colorante para el po-

len maduro, con alto contenido de almidón. Sin embargo, - en polen joven el citoplasma es casi transparente y cuando se hicieron las tinciones predominó muchas veces el color verde, surgiendo la duda de que si el polen estaba realmente muerto o si solo era que la tinción roja era muy débil.

El diacetato de fluoresceína propuesto por Heslop-Harrison y Heslop-Harrison (1970) requiere de un microscopio de fluorescencia o de filtros adecuados para una iluminación normal (filamento de tungsteno).

Dado que el Azul de Evans produce un marcado contraste entre las células vivas y las muertas, que se podía utilizar en células jóvenes y que no se requerían aparatos especiales, se decidió utilizar este colorante para determinar la viabilidad del polen.

2. Curvas de coeficiente de variación y tamaño de la muestra.

Trigo. Se llevaron a cabo las mediciones de viabilidad del polen en las dos anteras más externas de las espiguillas centrales para cada espiga. Un ejemplo de éstos resultados se observa en el Cuadro 4 que corresponde a la espiga número 8 de la variedad Lerma Rojo. Se observa la media y coeficiente de variación de esta espiga, así como el número de anteras que se utilizaron. Estos datos se obtuvieron también para 10 espigas de la variedad Lerma Rojo y 9 de la variedad Era. Los valores de \bar{X} , S y C.V. pa-

ESPIGA No. 8

Trigo Lerma Rojo.

13	12	A		B		A	B	A	B	
		V	M	V	M					Total
11	} Se eliminaron	9	142	156	54	202	298	256	47.6	21.0
10		8	50	232	109	164	282	273	17.7	39.9
9		7	160	100	154	148	260	302	61.5	50.9
8		6	361	141	215	122	502	337	71.9	63.7
7		5	205	142	95	321	347	416	59.0	22.8
6		4	246	139	72	267	385	339	63.8	21.2
5		3	131	160	89	211	291	300	45.0	29.6
4		2	203	222	108	212	425	380	47.7	44.2
3		1	264	96	111	193	360	204	73.7	54.4
2		} Se eliminaron								
1										
c										

$\bar{X} = 46.4$ $S = 17.8$
 C.V. = 38.5
 18 anteras

CUADRO 4. Resultados de los conteos de viabilidad del polen para una espiga de trigo variedad Lerma Rojo. Estos cuadros se obtuvieron para 10 espigas de la variedad Lerma Rojo y 9 de la Era. Para cada una se obtuvo \bar{X} , S y C.V. Posteriormente con estos datos se construyeron las gráficas de C.V. para el tamaño de la muestra. A y B señalan cada una de las florecillas externas de las espiguillas.

ra cada espiga de ambas variedades se muestran en el Cuadro 5. En el caso de las espigas 2, 3 y 4 de la variedad Era se decidió no utilizar los datos de éstas para el cálculo del tamaño de la muestra por los promedios bajos de viabilidad que presentaban. Así mismo, se decidió eliminar aquellas espigas que presentasen promedios bajos de viabilidad durante la siembra de las anteras.

Una vez obtenidos los datos para cada espiga se procedió a obtener la media y un coeficiente de variación para cada espiga utilizando solamente 4, 6 10 y 14 anteras. Los resultados obtenidos se observan en el Cuadro 6 para la variedad Lerma Rojo y en el Cuadro 7 para la variedad Era.

Las gráficas de número de espiguillas (tamaño de la muestra) vs. coeficiente de variación se observan en la figura 7 para las espigas número 1, y 8 de la variedad Era y 3 y 5 de la variedad Lerma Rojo. Obsérvese que muchas veces la dispersión de los puntos en la gráfica dificulta el trazo de la curva esperada. Tal es el caso, por ejemplo, de la gráfica de las espigas 8 de la variedad Era y 3 de la variedad Lerma Rojo. Además, con este sistema tendría que trabajarse con 19 gráficas, que por su dispersión y número elevado dificultaría encontrar el tamaño de la muestra óptima. Para evitar esto se decidió construir solamente dos gráficas de la siguiente manera. En los Cuadros 6 y 7 se tomaron los valores de coeficiente de variación obtenidos con diferente número de anteras y se dividieron sucesivamente con el coeficiente de variación obtenido contando todas las anteras, pero siempre di-

TRIGO ERA

Viabilidad

Espiga No.	\bar{X}	S	C.V.	No. total de anteras usadas
1	41.1	33.1	80.5	26
2*	26.3	25.1	95.5	19
3*	13.2	14.6	110.0	18
4*	26.8	24.6	99.1	30
5	38.0	20.0	53.6	20
6	31.6	22.6	71.5	30
7	44.8	28.1	62.7	26
8	45.9	22.1	48.2	18
9	<u>58.8</u>	<u>16.9</u>	<u>27.7</u>	18
	36.2	23.0	63.6	

TRIGO LERMA ROJO

Espiga No.	Viabilidad			No. total de anteras usadas
	\bar{X}	S	C.V.	
1	59.9	26.2	47.8	22
2	59.5	27.3	45.8	22
3	60.1	18.2	30.3	20
4	59.0	20.1	34.0	22
5	63.0	21.6	34.3	19
6	64.2	19.2	30.0	17
7	35.8	24.3	68.0	16
8	46.4	17.8	38.5	18
9	52.1	24.5	47.0	20
10	<u>56.0</u>	<u>20.1</u>	<u>36.0</u>	20
	55.6	21.9	39.3	

CUADRO 5. Promedios de viabilidad (\bar{X}) de las espigas de trigo de dos variedades utilizando todas las anteras de las espiguillas centrales. Para el cálculo del tamaño de la muestra se decidió no utilizar espigas con porcentajes de viabilidad bajo (*).

No. DE ESPIGUILLAS UTILIZADAS PARA DETERMINAR \bar{X} y C.V. DE UNA ESPIGA

Espiga No.	2		2		3		5		7		Todas	
	(3 anteras) \bar{X}	C.V.	(4 anteras) \bar{X}	C.V.	(6 anteras) \bar{X}	C.V.	(10 anteras) \bar{X}	C.V.	(14 anteras) \bar{X}	C.V.	\bar{X}	C.V.
1	50.8	80.6	59.0	50.7	31.1	82.0	99.2	62.1	61.8	41.8	59.9	47.8
2	66.6	39.0	58.1	51.3	52.4	64.1	69.7	36.7	70.6	30.6	39.5	45.8
3	62.4*	40.4	70.4*	28.5	49.0	25.6	58.5	27.1	57.2	32.6	60.1	30.3
	51.7	32.7	68.6	17.0								
	58.7	5.1	53.2	20.8								
4	57.7	27.8	57.8	41.8	65.5	25.3	60.8	15.7	57.4	37.4	59.0	34.0
5	42.6*	43.7	60.1*	38.6	62.3	31.7	64.7	29.1	69.2	29.3	63.0	34.3
	79.0	27.0	53.1	31.1								
	52.8	52.4	60.0	27.0								
6	52.4	79.7	60.0	52.8	61.4	36.8	66.8	31.3	67.7	30.9	64.2	30.0
7	96.8	90.3	26.3	76.3	50.4	60.9	38.8	68.0	32.2	68.8	35.8	68.0
8	30.7	44.5	51.0	43.9	34.6	48.4	46.2	39.9	44.4	37.8	46.4	38.5
9	57.8	29.0	63.3	24.0	52.0	62.0	48.0	51.1	58.7	36.3	52.1	47.0
10	70.3	25.1	64.7	16.1	49.4	50.8	58.7	27.3	50.7	41.0	56.0	36.0

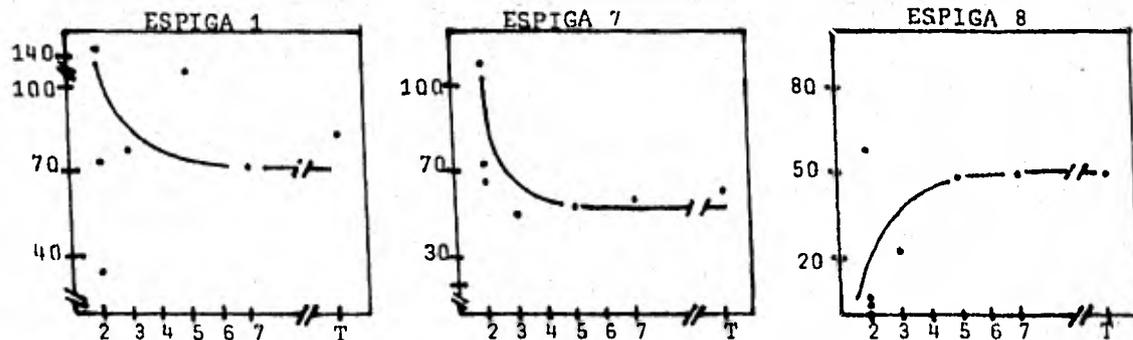
CUADRO 6. Cálculo de \bar{X} y C.V. para cada espiga (variedad Lerma Rojo) mediante el uso de grupos pequeños de espiguillas escogidas por tablas de números al azar. Para simplificar el cuadro no se presentan valores de S ni cuales fueron las espiguillas utilizadas en cada caso. Con estos datos se trazaron las curvas de C.V. En algunos casos (*) se repitieron los cálculos varias veces para disponer de más puntos para las gráficas.

No. DE ESPIGUILLAS UTILIZADAS PARA DETERMINAR \bar{X} y C.V. DE UNA ESPIGA

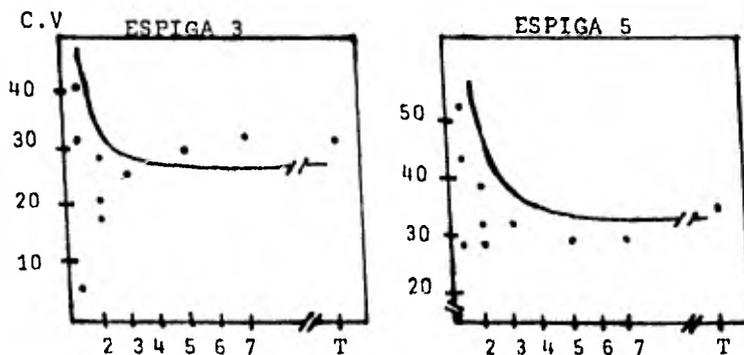
Espiga No.	2 (4 anteras)		3 (6 anteras)		5 (10 anteras)		7 (14 anteras)		Todas	
	\bar{X}	C.V.	\bar{X}	C.V.	\bar{X}	C.V.	\bar{X}	C.V.	\bar{X}	C.V.
1	34.4*	34.4	46.9	77.7	27.4	109.1	48.3	69.4	41.1	80.5
	18.3	141.4								
	51.4	72.7								
5	29.6	71.9	26.9	62.8	34.5	61.0	40.6	47.1	38.0	53.5
6	26.0	100.0	39.5	85.0	38.4	71.7	26.9	68.2	31.6	71.5
7	47.3*	71.4	65.4	53.4	48.8	53.9	50.7	57.2	44.8	62.7
	19.5	65.9								
	50.1	107.6								
8	37.9*	4.2	34.5	21.7	49.8	48.3	45.7	48.8	45.9	48.2
	34.1	56.8								
	77.0	2.8								
9	51.2	8.4	59.1	20.7	56.2	34.1	60.6	25.1	58.8	27.7
	38.3	33.2								
	81.0	13.0								

CUADRO 7. Cálculo de \bar{X} y C.V. para cada espiga (variedad Era) mediante el uso de grupos pequeños de espiguillas escogidas por tablas de números al azar. Para simplificar el cuadro no se presentan valores de Σ ni cuales fueron las espiguillas utilizadas en cada caso. No se utilizaron los valores de las espigas 2, 3 y 9 por presentar muy baja viabilidad. Con estos datos se trazaron las curvas de C.V. En algunos casos (*) se repitieron los cálculos varias veces para disponer de más puntos para las gráficas.

T. aestivum var. Era



T. aestivum var. Lerma Rojo



No. de espiguillas utilizadas

No. de espiguillas utilizadas.

FIGURA 7. Curvas de C.V. para varios tamaños de la muestra. Sólo se presentan las gráficas de algunas espigas. T = Todas las espiguillas.

vidiendo el coeficiente de variación mayor sobre el coeficiente de variación menor para obtener así números mayores o iguales a 1. De esta manera se obtuvieron los datos de los Cuadros 8 y 9 para las variedades Lerma Rojo y Era respectivamente y las gráficas correspondientes se observan en la Figura 8. El punto de inflexión se puede señalar aproximadamente entre 3 y 4 espiguillas que representan así un número confiable de anteras cuya viabilidad nos acerca al valor mostrado por la espiga en conjunto. Para dar un margen de seguridad se contaron 10 anteras por espiga.

Tabaco. Cuando se muestreó la viabilidad del polen en 45 anteras de tabaco provenientes de 9 yemas florales, se observó que siempre había 100 % de polen vivo, por lo que automáticamente se tomó una antera de cada yema floral como el tamaño de muestra. Esto hizo innecesario trazar las curvas de coeficiente de variación.

3. Viabilidad del polen durante la siembra.

Trigo. Del factorial propuesto (2 variedades de trigo x 3 medios de cultivo) se sembró solamente lo correspondiente a la variedad Era. Los resultados de estas siembras se observan en el Cuadro 10 y en la Figura 9. Como se notará, los resultados para cada medio se expresan como un promedio de sobrevivencia inicial y final para cada espiga y para cada grupo de espigas de un medio. Debe notarse también que los datos de sobrevivencia del polen después del cultivo se tomaron en diferentes días para cada -

No. DE ESPIGUILLAS UTILIZADAS PARA DETERMINAR \bar{X} y C.V. DE UNA ESPIGA

Espiga No.	2	2	3	5	7	Todas
	(3 anteras)	(4 anteras)	(6 anteras)	(10 anteras)	(14 anteras)	
C.V. mayor / C.V. menor						
1	1.68	1.06	1.71	1.29	1.14	1
2	1.34	1.12	1.39	1.24	1.49	1
3	1.33	1.06	1.18	1.11	1.07	1
4	1.22	1.22	1.34	2.16	1.1	1
5	1.27	1.12	1.08	1.17	1.17	1
6	2.49	1.76	1.22	1.04	1.03	1
7	1.32	1.12	1.11	1.00	1.01	1
8	1.15	1.14	1.25	1.03	1.01	1
9	1.62	1.95	1.31	1.08	1.29	1
10	1.43	2.23	1.41	1.31	1.13	1

CUADRO 8. Obtención de valores C.V. mayor/C.V. menor para las espigas de trigo de la variedad Lerma Rojo.

No. DE ESPIGUILLAS UTILIZADAS PARA DETERMINAR \bar{X} y C.V. DE UNA ESPIGA

2 3 5 7 Todas
 (4 anteras) (6 anteras) (10 anteras) (14 anteras)

C.V. mayor / C.V. menor

Espiga No.	2 (4 anteras)	3 (6 anteras)	5 (10 anteras)	7 (14 anteras)	Todas
1	2.34	1.03	1.29	1.15	1
5	1.34	1.17	1.14	1.13	1
6	1.39	1.18	1.00	1.04	1
7	1.13	1.17	1.16	1.09	1
8	11.4	2.22	1.00	1.01	1
9	3.29	1.33	1.23	1.10	1

CUADRO 9. Obtención de valores C.V. mayor /C.V. menor para las espigas de trigo de la variedad Era. No se utilizaron las espigas 2, 3 y 4.

C.V. mayor/C.V. menor

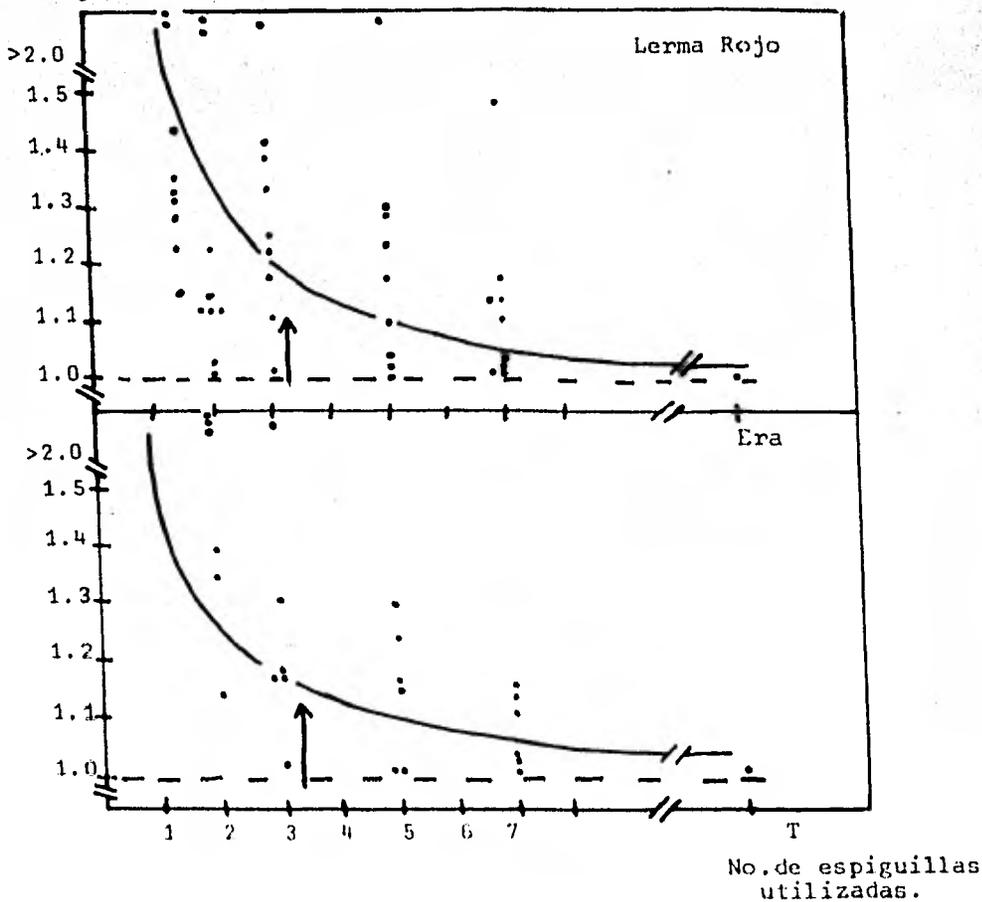


FIGURA 8. Determinación del tamaño de la muestra para las espigas de trigo variedades Lerma Rojo y Era.
T = Todas las espiguillas.

Cultivo No.	N - 6						M-S + recomendaciones de Ouyang et al						M-S + recomendaciones de Wang et al					
	Sobrevivencia(%) Inicial			Sobrevivencia(%) Final(9días)			Sobrevivencia(%) Inicial			Sobrevivencia(%) Final(10días)			Sobrevivencia(%) Inicial			Sobrevivencia(%) Final(8días)		
	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV
1	43.2	29.1		15.7	21.0		43	25.3		22.2	27.7		39.8	12.8		8.7	17.4	
2	51.7	29.8		12.1	16.5		33.3	21.4		25.4	24.7		18.9	30.7		9.0	20.9	
3	56.0	16.8		1.1	3.7		45.8	26.0		15.4	17.6		29.0	28.5		19.7	24.0	
4	63.7	10.9		12.2	27.1		32.7	23.3		29.8	27.6		27.3	29.2		13.2	21.5	
5	50.3	29.9		2.9	9.4		31.6	19.3		20.1	20.9		34.3	23.1		25.0	24.0	
6	50.4	24.6		5.5	11.9		32.3	21.6		24.7	24.0		31.8	32.2		17.6	23.6	
7	43.8	23.8		0.6	2.0					13.4	18.7		32.3	21.6		32.4	35.4	
8	51.2	33.7		3.4	10.7					1.1	3.3					27.0	36.3	
9	33.6	21.3		5.8	12.3					32.2	26.5					32.6	35.0	
10	31.9	29.1		19.8	23					13.8	19					37.2	39.0	
11	41.2	20.1		6.9	11.8											0.0	0.0	
12	41.2	18.5		6.9	15.1											0.0	0.0	
<hr/>																		
	46.7	23.9	51.1	8.1	13.7	169.1	36.4	22.8	62.6	19.8	21.0	106.0	39.7	21.5	61.9	17.9	22.3	124.
		7.5			4.3			7.2			6.6			6.8			7	
				17.3%					54.3%						51.5%			

Sobrevivencia considerando
el valor inicial como 100%

CUADRO 10. Sobrevivencia del polen de las anteras de trigo, variedad Era, durante el cultivo de éste en diferentes medios. Obsérvese la disminución en la viabilidad del polen y el aumento en el C.V., después de varios días en cultivo.

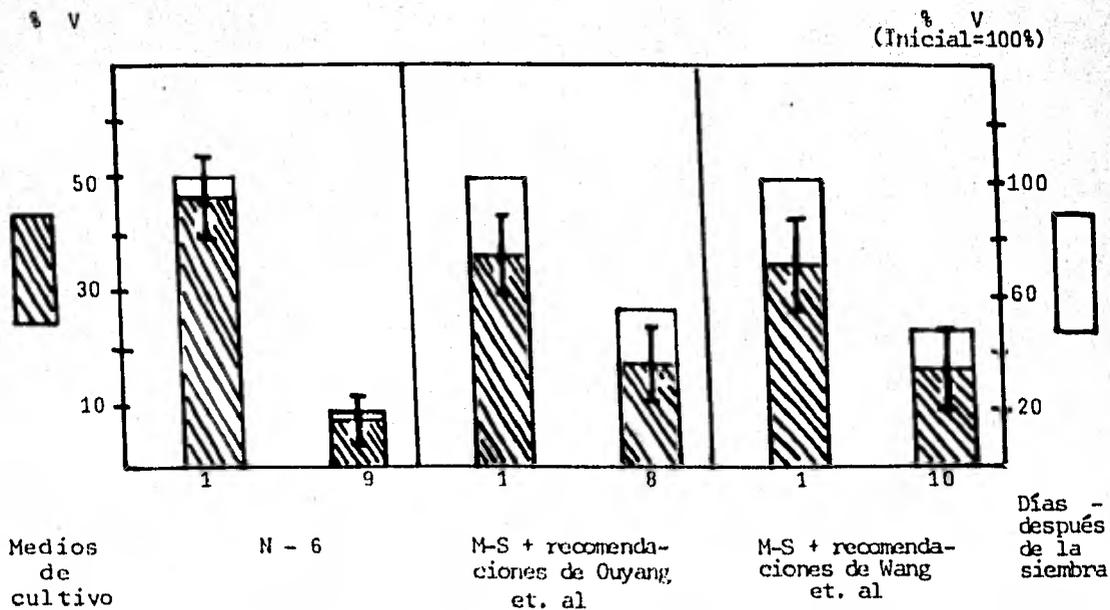


FIGURA 9. Respuesta de la sobrevivencia del polen de anteras de trigo variedad Era en tres medios de cultivo. El día 1 se sembró.

medio (8, 9 y 10 días) y que, si se considera como 100 % de sobrevivencia el valor inicial, al cabo de estos períodos los porcentajes de granos de polen vivos iban de 17.3 a 51.5 %. Nótese también el aumento, después de la siembra del coeficiente de variación, lo que indica una distribución desigual de la mortalidad del polen.

Larqué-Saavedra (comunicación ~~personal~~) en experimentos preliminares encontró que el ácido Acetil salicílico - asperjado sobre las espigas de trigo durante la floración aumentaba la producción de grano hasta un 31 %. Aun cuando no se determinó si ocurría un aumento del peso o del número de granos se sugiere -dado el trabajo de Basu (1969) en el que se encontró un efecto sinérgico de AS con la auxinas- que ocurre una alteración en la fuerza de la demanda. En el caso de las anteras de trigo probablemente - éstas no absorben eficientemente sustancias del medio de cultivo y por eso mueren durante éste. Conocido lo anterior, se decidió utilizar ácido acetil salicílico en uno de los medios de cultivo y verificar la sobrevivencia del polen. Se empleó el medio M-S en la forma indicada por Ouyang et al (1973) con y sin ASA en una concentración de 1 mg/ml. Los resultados de este tratamiento se muestran en el Cuadro 11 y la Figura 10. Cuatro espigas de la variedad Era se colocaron en medio con ASA y 8 de la variedad Lerma Rojo en medio con y sin ASA. Aún cuando al cabo de 10 días de siembra no se observó aumento en la viabilidad del polen, sí se registró a los 7 días en las anteras de la variedad Era que una de ellas presentaba dehiscencia y otra más granos de polen multinucleados (Figura 11 A, B y C). Cuando a los 17 días de la siem-

Medio de cultivo	VARIEDAD ERA						VARIEDAD LERMA ROJO												
	M - S + recomendaciones de Ouyang et al + 1 mg/l ASA Sobrevivencia (%)						M - S + recomendaciones Ouyang et al Sobrevivencia (%)						M - S + recomendaciones de Ouyang et al + 1 mg/l ASA Sobrevivencia (%)						
	Inicial			Final			Inicial			Final			Inicial			Final			
Espiga No.	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	
1	42.9	17.1		24.3	26.5					15.9	12.6					6	5.4		
2	45.5	23.4		13.0	19.4					9.2	16.2					15.5	20.0		
3	72.7	17.7		23.4	26.2					16.7	17.1					13.9	29.2		
4	71.9	11.2		19.5	24.8					10.3	15.8					4.7	5.2		
	58.2	17.3	29.7	20.0	24.2	121.0				13.0	15.4	118.4				10.0	14.9	149.0	
	5.4			7.6						4.8						4.7			

34.3

Sobrevivencia considerando como 100 % el valor inicial

CUADRO 11. Sobrevivencia del polen de las anteras de trigo durante el cultivo en medio con y sin Acido acetil salicílico (ASA). A los 7 días de cultivo se detectó en la variedad Era una antera con dehiscencia y otra con granos de polen multinucleados. Durante los conteos con Azul de Evans se encontró una antera de la variedad Lerma Rojo con polen multinucleado. Los valores finales se obtuvieron en todos los casos a los 10 días.

% V

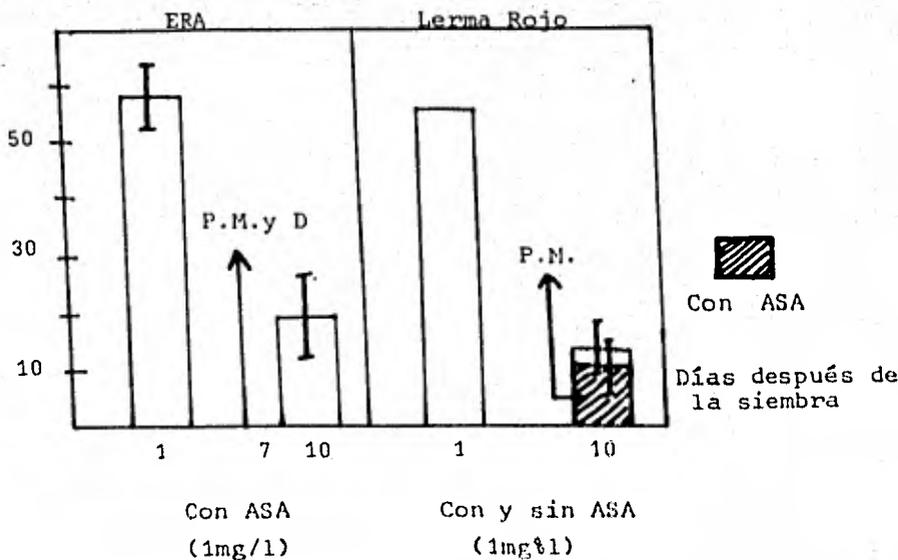


FIGURA 10. Sobrevivencia del polen de las anteras de trigo en medio M-S + recomendaciones de Ouyang et.al con y sin ASA (1mg/l). P.M. = Polen multinucleado D = Dehiscencia. El valor inicial de las espigas de la variedad Lerma Rojo se obtuvo del promedio para esta variedad en el Cuadro 5.

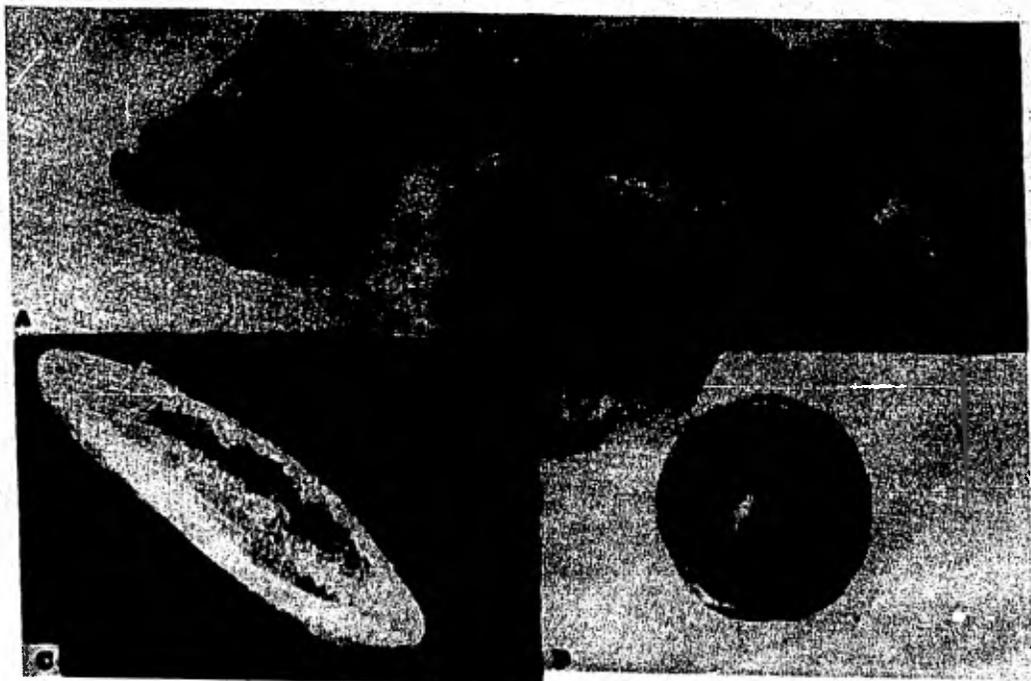


FIGURA 11. Polen multinucleado y dehiscencia de una antera
A. Grano de polen con 6 núcleos. B. Grano de polen con
4 (a) y 3 (b) núcleos. Ambas preparaciones teñidas con
acetocarmin. C. Antera con dehiscencia. Esta presentó
54.5 % de polen viable a los 10 días de cultivo y no te-
nía polen en división. D. Grano de polen con 4 núcleos
teñidos accidentalmente con Azul de Evans. La antera
que contenía este polen presentó solo 4.3 % de polen -
viable. A, B y C, anteras de trigo de la variedad Era;
D, anteras de la variedad Lerma Rojo.

bra se extrajo la antera que presentaba dehiscencia se observó que no contenía granos de polen multinucleados y presentaba 54.5 % de polen vivo. Del mismo modo, cuando se contó la viabilidad del polen de las anteras Lerma Rojo sembradas en el medio con ASA, se observó en una de ellas un grano con 4 núcleos iguales teñidos por el Azul de Evans (Figura 11D). Esta antera presentaba solo 4.3 % de polen vivo. Los resultados anteriores corresponden a 2 anteras con respuesta androgénica de un total aproximado de 450 anteras, es decir, 0.44 %.

Dado los resultados anteriores se pensó montar otro nuevo ensayo con el medio de cultivo con y sin ASA pero que incluyese mayor número de muestreos de viabilidad del polen para así obtener una idea de la cinética de ésta. Se utilizó de nuevo el medio anterior con y sin ASA en la misma concentración. Se sembraron 10 espigas de la variedad Era, 5 en el medio con ASA y 5 en el medio sin ella. Se muestreo la viabilidad del polen a los 3, 5 y 7 días de la siembra.

Los resultados del cultivo se muestran en el Cuadro 12 y la Figura 12. Como se ve, pareciese que durante cierto tiempo la viabilidad del polen se mantuviese y poco después empieza a declinar bruscamente. Este efecto podría explicarse suponiendo una acumulación de sustancias tóxicas o que se acaba una cantidad determinada de nutrientes.

Tabaco. Los resultados de la viabilidad del polen se muestran en el Cuadro 13 y la Figura 13. A diferencia de las anteras de trigo, las de tabaco sostienen por mu-

Medio de cultivo	M - S + recomendaciones de Ouyang et al									M - S + recomendaciones de Ouyang et al + 1 mg/l ASA								
	Sobrevivencia (%)									Sobrevivencia (%)								
	3 días			5 días			7 días			3 días			5 días			7 días		
Espiga No.	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV
1	47.3	21.1		35.1	21.9		12.5	13.1		36.0	27.8		40.9	29.1		28.7	30.2	
2	33.3	25.5		35.6	23.4		6.4	13.6		33.6	32.3		35.2	33.0		18.4	28.9	
3	55.2	24.3		38.8	29.2		35.7	24.3		38.1	22.8		27.2	30.1		20.5	17.0	
4	57.8	15.0		36.2	18.5		9.6	22.4		38.6	29.7		51.7	28.8		29.9	25.7	
5	39.7	27.0		43.5	16.3		25.8	21.8		51.2	17.4		35.8	28.0		19.8	23.7	
	46.6	22.4	48.2	37.8	21.8	57.6	18.0	19.0	105.5	39.5	26.0	65.8	38.1	29.8	78.2	23.4	25.1	107.2
	7.1			6.9			6.0			8.2			9.4			7.9		

CUADRO 12. Cinética de la sobrevivencia del polen de trigo variedad Era. en medio de cultivo con y sin ASA. Nótese el descenso brusco de la sobrevivencia del polen y el aumento en la misma forma del C.V.

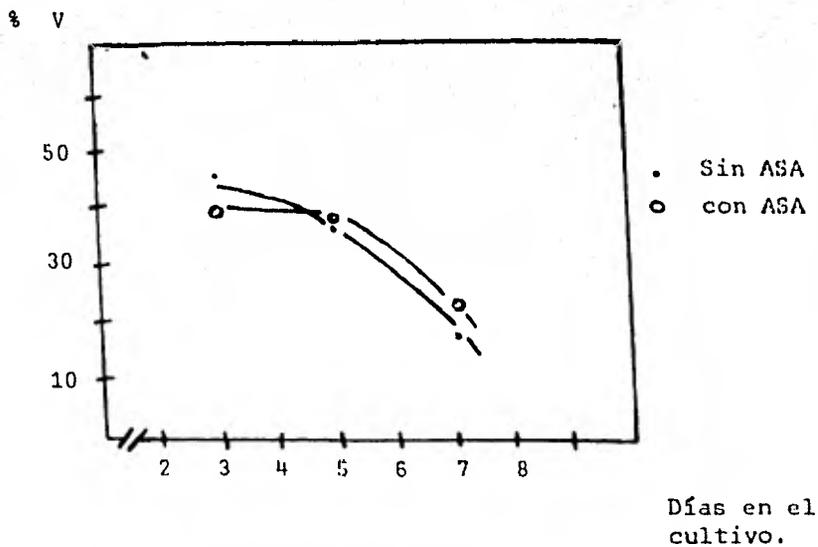


FIGURA 12. Sobrevivencia del polen de anteras de trigo de la variedad Era en medio M -S + recomendaciones de Ouyang et.al. (1973) con y sin ASA.

MEDIO M - S + modificaciones de
Madrigal (1978)

Días de siembra	Viabilidad (%)			Anteras Contadas
	\bar{X}	S	C.V'	
1	100	-	-	45
9	91.3	9.9	10.8	45
18	76.3	19.6	25.6	22
28	42.7	27.2	63.7	25

CUADRO 13. Sobrevivencia del polen de anteras de tabaco - W-38 en medio de cultivo. A los 28 días 54.4 % de las anteras presentaban embriones.

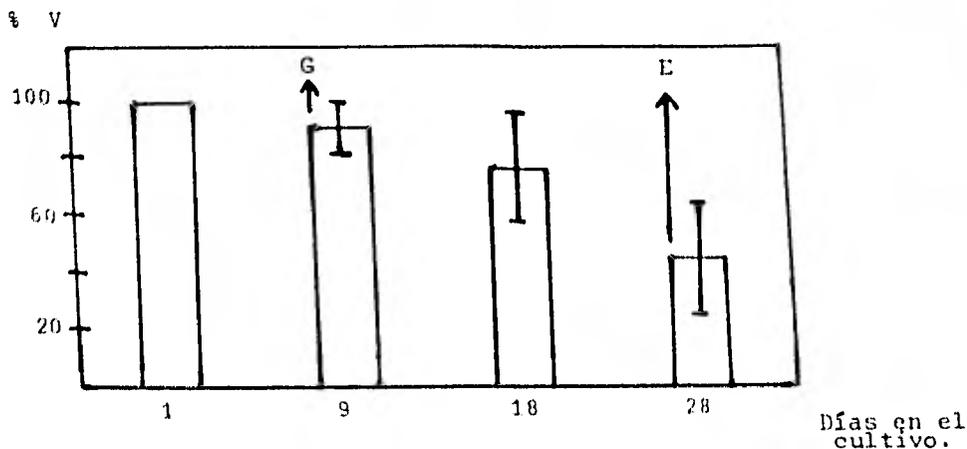


FIGURA 13. Sobrevivencia del polen de anteras de tabaco - W-38 en medio de cultivo. G = Germinación del polen. E = Embriones.

cho mayor tiempo la viabilidad del polen. Tal caso se desprende por ejemplo, de la Figura 13, en donde se observa - que a los 18 días de cultivo permanece vivo 76.3 % del polen. Además se nota que a los 9 días de la siembra, algunos granos de polen germinaban (Figura 14A), lo que indica que el polen continuaba su desarrollo normal en el cultivo. La formación de embriones se detectó hasta los 28 - días de cultivo. Se encontró en esta última fecha que - 54.4 % de las anteras presentaban embriones. Algunos de - éstos se muestran en la Figura 14B, C y D.

4. Factores que controlan la viabilidad del polen.

Una de las diferencias básicas entre las anteras - de trigo y tabaco es la viabilidad inicial del polen. Así durante las mediciones de viabilidad para determinar el tamaño de muestra se observó que la media para 9 espigas de la variedad Era fue de 36.2 % y para 10 de la variedad Lerma Rojo de 55.6 % (Cuadro 5). En el caso del tabaco se - encontró que esta fue de 100%.

Para comprobar si realmente la viabilidad del trigo era tan baja se podían hacer dos cosas: a) Muestrear espigas de trigo maduras, durante la antésis y b) Utilizar - otro método para distinguir entre polen vivo y muerto. En ambos casos los porcentajes debían coincidir o ser menores que los obtenidos con espigas jóvenes y con Azul de Evans. Se decidió hacer al mismo tiempo las dos variantes, es decir, contar la viabilidad del polen en anteras maduras y - con otra técnica de tinción. La nueva técnica de tinción

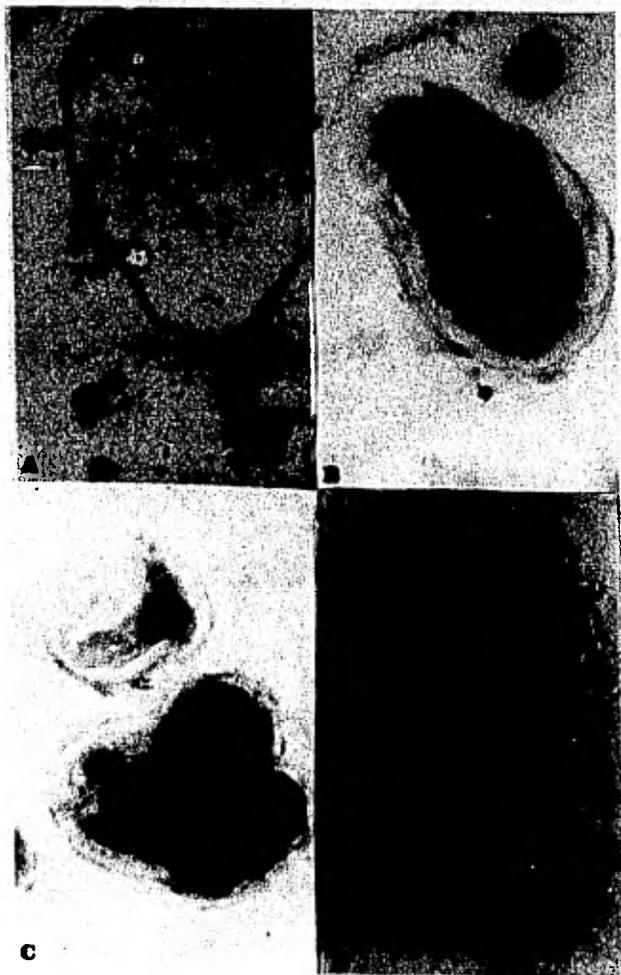


FIGURA 14. Germinación de polen y embriones de tabaco. A. - Polen en germinación a los nueve días de cultivo. B y C Embriones observados a los 28 días de cultivo. D. Embrión de 12 semanas observado en anteras que también presentaban plántulas.

fue la propuesta por Alexander (1969). Los resultados de estos conteos se muestran en el Cuadro 14a. Como se ve, - con la nueva técnica de tinción se obtienen 72.8 % de polen vivo inicial y con un coeficiente de variación mucho menor, lo que significa una distribución de la viabilidad más homogénea.

Al buscar una de las posibles causas de la discrepancia de la viabilidad medida con el Azul de Evans y con el colorante de Alexander (1969) se encontró cuando se observó que una preparación con Azul de Evans que inicialmente mostraba alta viabilidad; después de 5 a 10 minutos la mostraba muy baja. En el caso de los conteos de las - espigas de trigo con el Azul de Evans las preparaciones se hacían de 5 en 5 y entre el conteo de la primera y la última transcurrían hasta 9 minutos. De acuerdo a esto, si se hacen las preparaciones una a una y se cuentan inmediatamente, se obtendrán porcentajes más altos. Al llevar a cabo esto con dos espigas jóvenes de la variedad Lerma Rojo se obtuvo un promedio de 84.2 % y con un coeficiente de variación de 15. Los resultados anteriores se muestran en - el cuadro 14b. En el caso del tabaco, las preparaciones se hicieron siempre de dos en dos.

Lo anterior afecta los valores iniciales y finales de la viabilidad del polen de las anteras de trigo durante el cultivo; pero probablemente no ocurra lo mismo con la - relación de disminución de la viabilidad durante el mismo. Para determinar esto último se tiñó con el colorante de - Alexander polen de tabaco y trigo en dos condiciones: a) Polen de anteras con 9 y 10 días de cultivo (respectivamen

TRIGO ERA (Maduro, en antésis)

Espiga No.	Viabilidad (%)			No. de anteras utilizadas
	\bar{X}	S	C.V.	
1	52.9	36.9	68.9	20
2	81.9	9.4	11.5	20
3	80.8	6.4	7.9	20
4	55.9	27.3	49.0	20
5	92.9	11.6	12.5	20
A)	<u>72.8</u>	<u>18.3</u>	<u>25.1</u>	

TRIGO LERMA ROJO

Espiga No.	Viabilidad (%)			No. de anteras utilizadas
	\bar{X}	S	C.V.	
1	83.3	11.4	13.6	10
2	85.1	14.1	16.5	10
B)	<u>84.2</u>	<u>12.7</u>	<u>15.0</u>	

CUADRO 14. A. Viabilidad del polen maduro en espigas de la variedad Era. Se utilizó el colorante de Alexander (1969). B. Viabilidad del polen en espigas de la variedad Lerma Rojo. Los conteos se hicieron con Azul de Evans y las preparaciones se hicieron una por una y se contaron inmediatamente.

te) y b) Polen de anteras en antésis.

Se observó que el polen de trigo con 10 días de cultivo tenía un aspecto vacío (Figura 16D). El polen de tabaco con 9 días de cultivo presentaba en cambio un citoplasma más denso (Figura 17B). El polen de trigo y tabaco de anteras en antésis tenían ambos un citoplasma con mucho almidón (figura 16A y 17C, respectivamente). Si se observa el polen de tabaco al momento de la siembra (Figura 17B) se encuentra que el citoplasma es muy claro, lo que indica que el polen, probablemente, gana nutrientes al final de los nueve días en el cultivo. En el caso del trigo, esto no parece ocurrir.

De acuerdo a lo anterior, la androgénesis del polen de tabaco en cultivo está acompañada de un enriquecimiento del citoplasma (probablemente almidón) de algunos granos de polen y esto no ocurría en las anteras de trigo en las mismas condiciones. Este enriquecimiento del citoplasma significaba mayor viabilidad del polen de acuerdo al colorante de Alexander. Sin embargo, el polen de trigo unido a la planta sí presente alto porcentaje de viabilidad, por lo que se pensó que el factor que podría influir sería la presencia de las hojas.

Para determinar si existe una influencia de las hojas en la viabilidad del polen se establecieron dos lotes de espigas. En uno de ellos se cortaban las plantas a nivel del suelo y, conservando las hojas, se colocaban en un matraz con agua. En el otro lote se despojaba a la espiga de todas las hojas y se cortaba el tallo a nivel de la mis

ma. La espiga era entonces introducida en tubos de vidrio de 2.5 x 8.5 cm. con un poco de agua. En ambos casos se sellaron los recipientes con parafilm para evitar la evaporación excesiva. Los dos lotes se colocaron en la cámara de cultivo en las condiciones ya mencionadas. Al cabo de 10 días se contó la viabilidad del polen con el colorante de Alexander. En ningún caso se hizo una medición de la viabilidad inicial para no dañar las espigas.

Los resultados de estos experimentos se muestran en el Cuadro 15 y la Figura 15. Se observa que las espigas de la variedad Era que conservaron las hojas y el tallo producen 78.6 % de polen vivo contra 3.4 % de la espiga aislada. En el caso de la variedad Lerma Rojo este experimento se llevó a cabo solamente con espigas sin hojas, presentando 10.6 % de sobrevivencia. En la Figura 16B y C se muestra el aspecto del polen de una espiga con hojas y de una espiga aislada, respectivamente.

Espigas de trigo variedad
ERA con hojas (+) y sin
hojas (-)

Espigas de trigo varie-
dad Lerma Rojo, sin -
hojas (-).

Espiga No.	Sobrevivencia final (%)						Sobrevivencia final (%)		
	(+)			(-)			(-)		
	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV	\bar{X}	S	CV
1	85.7	26.3		0.0					
2	47.2	29.7		0.0			17.1	13.6	
3	93.8	4.2		4.9	11.9		12.5	12.2	
4	69.9	32.7		1.9	6.0		2.2	4.1	
5	96.4	5.6		0.0			<u>10.6</u>	<u>9.3</u>	87.7
	<u>78.6</u>	<u>19.7</u>	25.0	<u>3.4</u>	<u>8.9</u>	261.7			

CUADRO 15. Sobrevivencia del polen de las espigas de trigo ERA y Lerma Rojo con y sin hojas. Los valores finales se obtuvieron después de 10 días. Conteos con el colorante de Alexander (1969).

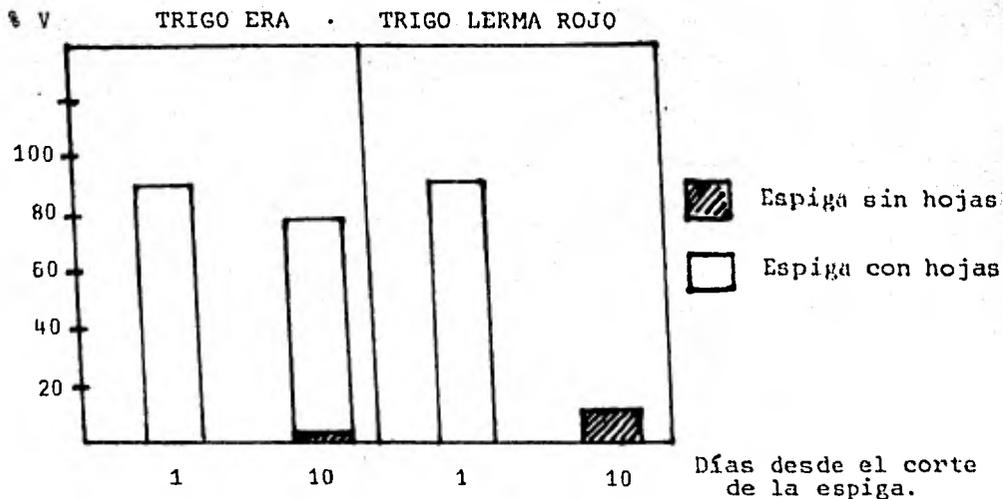


FIGURA 15. Sobrevivencia del polen de espigas de trigo con y sin las hojas. Las espigas se cortaron a nivel del suelo y se colocaron en agua. El valor inicial de las espigas de la variedad Lerma Rojo se obtuvo del Cuadro 14B y el de la variedad Era se supone debe ser mayor o igual que el valor final. No se contaron los iniciales para evitar dañar la espiga. Conteos con el colorante de Alexander (1969).

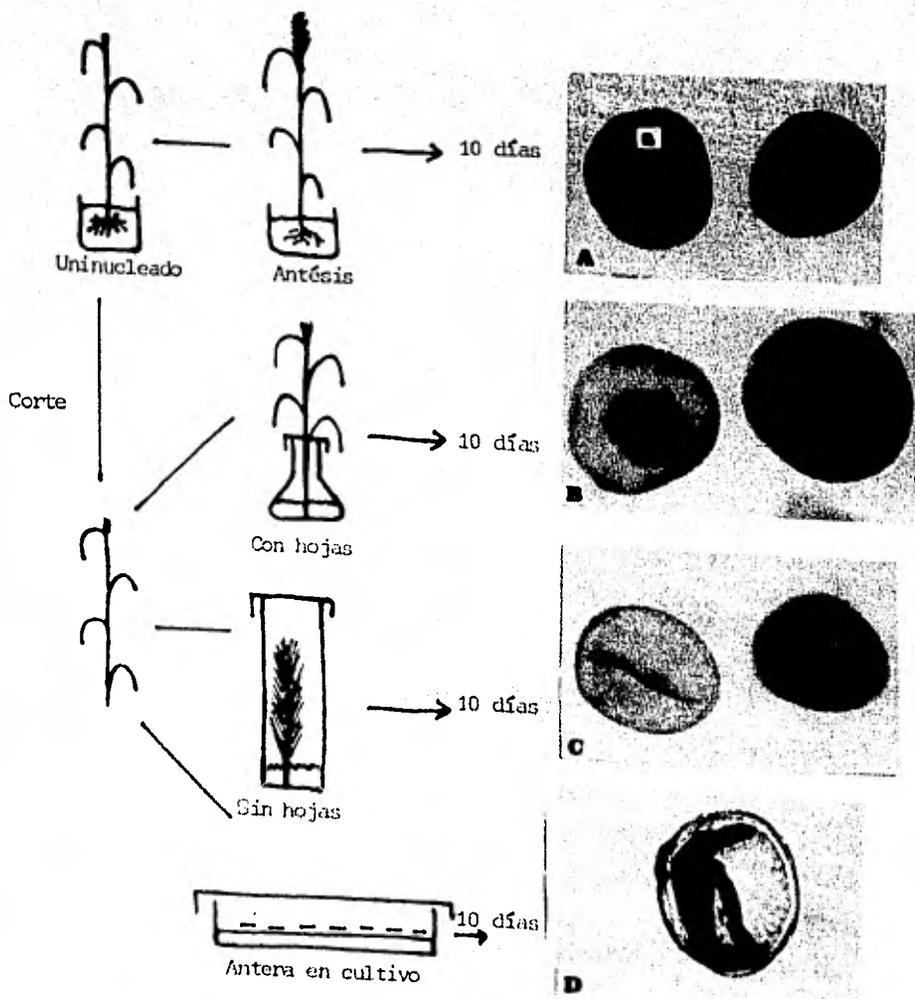


FIGURA 16. Sobrevivencia del polen de espigas de trigo de la variedad Lerma Rojo. A. Polen durante la antésis. B. Polen de espigas con hojas al cabo de 10 días. Nótese la presencia de almidón (a). C. Polen de espigas sin hojas. D. Polen de anteras cultivadas por 10 días. Nótese la falta de almidón. Tinciones con el colorante de Alexander (1969).

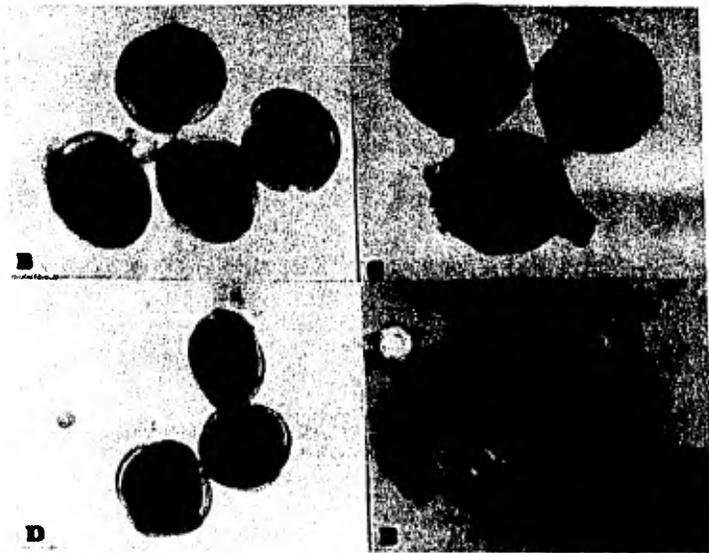
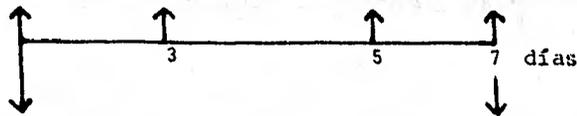


FIGURA 17. Sobrevivencia del polen de tabaco, W.38 A. Tiempo del desarrollo de los botones florales. B. Polen en estado uninucleado. Nótese la transparencia del citoplasma. C. Polen durante la antésis. D. Polen con 9 días en cultivo. Obsérvese la densidad del citoplasma. Todas las tinciones anteriores fueron hechas con el colorante de Alexander (1969) E. Germinación del polen en Azul de Evans a los 9 días de la siembra.

V. DISCUSION.

1. Determinación de la viabilidad del polen.

La observación de que el Azul de Evans nos muestra diferentes porcentajes de viabilidad del polen según el tiempo en que aquél esté en contacto con el colorante nos llevaría a dos cosas: 1) Poner en duda la utilidad del Azul de Evans para los conteos de viabilidad y b) Que las afirmaciones de Gaff y Ohong'O-ogola (1971) de que deben esperarse 5 minutos antes de llevar a cabo el conteo y de que el colorante no es tóxico deben aceptarse con cautela.

Sin embargo, las bondades del Azul de Evans para llevar a cabo los conteos de viabilidad del polen se realzan cuando se prueban otros colorantes, como el cloruro 2, 3,5-trifeniltetrazolio (Vieitez, 1952) que produce coloraciones demasiado tenues para distinguir claramente los granos vivos de los muertos o el diacetato de fluoresceína que aun cuando produce respuestas aceptables requiere de filtros adecuados para las lámparas del microscopio (Heslop-Harrison y Heslop-Harrison, 1970). Otra buena alternativa para contar la viabilidad del polen es el colorante propuesto por Alexander (1969), basado en la tinción del contenido citoplásmico en las células de polen maduros. Esto se lleva a cabo fácilmente cuando el polen contiene almidón en gran cantidad, pero difícilmente en granos de polen jóvenes, uninucleados, que tienen un citoplasma muy transparente.

En cambio, el Azul de Evans proporciona un método - muy fácil para discernir una célula viva de una muerta pro- vocando contrastes muy fuertes entre unas y otras, no re- quiere de aditamentos especiales y puede aplicarse a célu- las muy jóvenes. Finalmente, la dificultad impuesta por - el Azul de Evans puede resolverse cuando las preparaciones se hacen una a una y se cuentan inmediatamente, producién- dose de esta manera altos porcentajes de viabilidad ini- cial (Cuadro 14b), tal como las mediciones de viabilidad - en espigas con el colorante de Alexander hacía necesario - (Cuadro 14a).

2. Curvas de coeficiente de variación y tamaño de la mues- tra.

Uno de los problemas que se presentaron durante el trazo de las curvas de coeficiente de variación para las - diferentes espigas (Figura 7) fue la dispersión de los pun- tos de la curva, lo que llevaba a que el trazo de las mis- mas fuese aproximado. Otro problema fue la diferencia de valores en los C.V. tan marcados entre una espiga y otra, - lo que evitaba reunir las espigas en una sola gráfica. En un intento de conseguir una sola gráfica se trazó la - correspondiente a C.V. mayor/C.V. menor (Figura 8). De - acuerdo a estas gráficas el punto de inflexión de la curva se encuentra entre 3 y 4 espiguillas, es decir, entre 6 y 8 anteras. Como ya se dijo, por seguridad se contaron 10 anteras.

Debe hacerse notar en la Figura 8 que aun con el -

conteo de 5 y 7 espiguillas se obtienen puntos fuera de la curva. Parece entonces recomendable utilizar grupos de espigas y trabajar con el promedio de éstos. Para lograr esto puede determinarse el número de espigas que deben integrar el grupo siguiendo el trazo de curvas semejantes a las anteriores. Otra alternativa sería trazar de nuevo las gráficas de C.V. tomando en cuenta el posible efecto tóxico del Azul de Evans y observar al final si los puntos se dispersan menos y siguen la curva más fielmente.

3. Viabilidad del polen durante el cultivo.

Los resultados obtenidos nos señalan que las anteras de trigo presentan dos diferencias importantes con respecto a las de tabaco.

La primera es que los porcentajes iniciales de polen viable son muy diferentes, siendo éstos de 55.6 % en la variedad Lerma Rojo, y 36.2 % en la variedad Era (Cuadro 5) y de 100 % en el polen de tabaco W-38.

La segunda diferencia es la sobrevivencia del polen durante el cultivo, presentándose una mortalidad en las anteras de trigo que va de 82.7 % en el medio N-6 hasta 45.7 en el medio M-S con las modificaciones de Ouyang et al (1973) (Cuadro 10). En cambio, las anteras de tabaco presentaron, en un lapso semejante, solamente 8.7 % de mortalidad del polen (Cuadro 13). Debe hacerse notar que las anteras de trigo presentaron además durante la siembra un incremento notable del coeficiente de variación que en la

mayoría de los casos es casi del doble. Esto indica que algunas anteras permanecen con valores relativamente altos de viabilidad del polen y otros con valores muy bajos de la misma. Correlacionado con las respuestas de viabilidad del polen se observa que las anteras de trigo produjeron aproximadamente 0.44 % de anteras con embriones y las anteras de tabaco, a los 28 días de cultivo, 54.4 %. Existe pues, la posibilidad de que las observaciones de *N. tabacum* de Sunderland (1978) y Horner y Street (1978b) y con *D. innoxia* de Nitsch y Norreel (1972) y Sangwan-Norreel (1977) que asocian menor mortalidad del polen durante los pretratamientos con mayor porcentaje de androgénesis puedan explicar también las bajas respuestas de androgénesis en plantas como el trigo y las altas respuestas en otras como el tabaco.

Siguiendo entonces el modelo de la androgénesis de Sunderland (1974) podríamos decir que las especies que presentan una baja frecuencia de androgénesis si tienen, probablemente, una receptividad del polen (P) y que, en base a los resultados anteriores, las anteras aisladas de las mismas plantas carecen de los factores de la pared de la antera (α y β) que mantienen la sobrevivencia del polen en el cultivo. En cambio, las anteras de las especies con alta frecuencia de androgénesis deben presentar ambos factores. En este último caso, si se daña a la pared de la antera se afectaría a los factores α y β y la productividad androgénica disminuiría, que sería lo que ocurrió durante los experimentos de *N. tabacum* de Horner y Street (1978b) donde se cortó en varios grados a la pared y disminuyó paralelamente la frecuencia de respuesta. En el caso

de los experimentos de Raghavan (1978) en donde un corte - en cuatro de las anteras de *H. niger* no afecta la respuesta androgénica, la discrepancia podría explicarse por los - tiempos en que ocurre ésta. Así, en *H. niger* se observan las primeras divisiones a las 24 horas. (Raghavan, 1979), y en cambio, en tabaco se requieren de 12 a 15 días - (Dunwell y Sunderland, 1975). Lo anterior nos llevaría a la posibilidad de que en el caso del tabaco el polen dependiese más de la pared de la antera que *H. niger*.

Sin embargo, podría presentarse que la posibilidad de que el Azul de Evans altere la viabilidad del polen por un efecto tóxico cambie la firmeza de las conclusiones anteriores.

Aún cuando las mediciones de viabilidad del polen - en el trigo durante la siembra se viesen afectadas por permanecer mucho tiempo en el Azul de Evans consideramos que esto alteraría los valores iniciales y finales de la siembra, pero que no ocurriría lo mismo con la relación básica propuesta de disminución drástica de la viabilidad del polen de trigo durante el cultivo. La afirmación anterior - se apoya en lo siguiente:

a) Los conteos de las anteras de tabaco se llevaron a cabo también con Azul de Evans y durante éstos se observó que el polen con nueve días de permanecer en cultivo germinaba en el colorante y después moría, tiñéndose éste (Figuras 14A y 17E). En ningún caso el polen de tabaco al inicio de la siembra germinó durante la tinción con Azul de Evans. Así pues, el polen de tabaco ma

duró en el cultivo y estaba vivo al agregar el colorante puesto que germinó. En cambio, el polen de trigo nunca presentó germinación después de la siembra, por lo que podemos pensar que no maduró y que al momento de agregar el Azul de Evans ya estaba muerto.

b) Cuando se tifieron las anteras de trigo que habían permanecido 10 días en cultivo con el colorante de Alexander el polen de estas se veía en la mayoría de los casos vacío (Figura 16D). En cambio, el polen de las anteras de tabaco con 9 días de cultivo presentaba un citoplasma más denso, de color rojizo (Figura 17D) que cuando se había sembrado (Figura 17B).

c) Si las diferencias de viabilidad del polen de trigo durante el cultivo se debiesen al Azul de Evans y no al medio de cultivo los coeficientes de variación de las espigas debían de ser similares antes y después del cultivo, puesto que ambos se midieron de la misma forma. Como ya se dijo anteriormente, los coeficientes de variación aumentaban al final de la siembra.

Quando se tiñe el polen de las anteras de trigo que habían permanecido 10 días en el cultivo se observó que éste estaba vacío (Figura 16D). En cambio, el polen de anteras de tabaco con 9 días de cultivo parecía haber ganado nutrientes (Figura 17D).

Se sabe que las auxinas pueden incrementar la mobilización de sustancias hacia los puntos de alta concentra

ción de las mismas. Específicamente, Patricks y Wareing (1973) mostraron que ocurría una acumulación creciente de sacarosa marcada con ^{14}C en la parte superior de los tallos de frijol tratados con AIA.

Aún cuando los medios de cultivo empleados para el cultivo de las anteras de trigo contenían auxinas (2,4-D) no se mostraba un incremento de nutrientes en el citoplasma del polen y quizá a esto se deba la baja respuesta androgénica.

Aún cuando se observan granos de polen multinucleados en los medios de cultivo con ASA, la frecuencia encontrada de tal fenómeno (0.44%) niega la posibilidad de una relación causa - efecto. Sin embargo, la posibilidad de que esta u otras sustancias que influyen sobre la fuerza de la demanda pueda mejorar la respuesta androgénica - se refuerza cuando se recuerda el trabajo de González-Medina y Bouharmont (1978); quienes encontraron un aumento en la producción de callos en anteras de cebada cuando sumergieron éstas en una solución de 2,4-D antes de sembrarlas.

4. Factores que controlan la viabilidad del polen.

Durante los experimentos de la cinética de la viabi-

lidad del polen durante el cultivo de anteras de trigo se desprendió que por cierto tiempo el polen permanecía vivo y que después empezaba un descenso más o menos brusco de la viabilidad (Cuadro 12 y Figura 12).

Clapham (1977) sugiere que los embriones de anteras de cebada pueden morir por tres causas principales: a) Presencia de productos tóxicos a partir de las anteras, b) Difusión inadecuada de los nutrientes y c) Acción de genes recesivos. Sin dificultad podrían aplicarse estas causas a la mortalidad del polen en el trigo. Sin embargo, en el caso de la acción de genes recesivos éste debía producir una disminución constante de la viabilidad y no una caída brusca, además de que el trigo es hexaploide, lo que ocultaría la acción de genes recesivos, aún en el polen. La gráfica obtenida en la Figura 12 podría explicarse más fácilmente si se supone una acumulación creciente de toxinas o un agotamiento de reservas alimenticias y la incapacidad posterior de absorberlas directamente del medio.

En el caso del tabaco se observa que la viabilidad en el cultivo es alta y que a los nueve días algunos granos de polen germinan (Figura 14a y Figura 17e) y que algunos más se tiñen intensamente con el colorante de Alexander del mismo modo que se tiñen los granos de polen durante la antesis (Figura 17D y C respectivamente), lo que indica presencia de almidón. Un comportamiento semejante fue señalado en *N. tabacum* por Sunderland (1973) y por Dunwell y Sunderland (1974) quienes observaron que algunos granos de polen presentaban indicios claros de haber sufrido un proceso de maduración normal, pues ocurría germina-

ción del polen y depósito de almidón. Aún más, Sunderland y Roberts (1977) Rashid y Street (1974) en *N. tabacum* y *N. sylvestris* respectivamente, reportan dehiscencia de las anteras durante la siembra de las mismas. Sunderland y Roberts (1977) encuentran que algunos de los granos liberados llevan a cabo la embriogénesis.

Lo anterior nos llevaría a suponer que las anteras de tabaco no acumulan sustancias tóxicas durante el cultivo y en cambio, sí presentan niveles adecuados de nutrientes para suministrarlos al polen. Sobre el origen de estos nutrientes pueden sugerirse dos cosas:

a) Que los nutrientes ya están contenidos en las anteras al momento del corte, como parece desprenderse de la observación de Sunderland (1973) quien menciona que las anteras de tabaco en estado de desarrollo antes, durante y poco después de la mitosis han completado crecimiento en términos de peso seco y fresco.

b) Que los nutrientes necesarios los absorbe del medio de cultivo, como se desprende del comentario de Sunderland (1979) quien menciona que el polen de las anteras de *N. tabacum* flotadas en agua destilada degenera rápidamente. Si en cambio se agrega sacarosa y agar al agua tiene lugar la embriogénesis.

Cuando se observan los granos de polen de trigo se muestra que éstos viven poco durante el cultivo, no presentan germinación después de cierto tiempo en éste y carecen

de almidón (Figura 16d). Puede suponerse entonces, que la baja viabilidad del polen durante el cultivo se debe a un agotamiento de las reservas nutritivas de las anteras y no a la acumulación de sustancias tóxicas. Tal afirmación puede además apoyarse en las observaciones de Ouyang et al (1973) y Chu et al (1973) quienes comentan que las anteras de *T. aestivum* y *T. vulgare* (respectivamente) que habían presentado formación de callos presentaron también dehiscencia. Esto podría implicar -ya que no se menciona directamente- que por similitud con el tabaco, el polen poseería almidón y es capaz de germinar.

Todo lo anterior nos llevaría a la suposición de - que si otorgamos a las anteras de trigo las condiciones de desarrollo del polen durante el cultivo, se incrementarían los niveles de respuesta androgénica.

Los experimentos con espigas de trigo con y sin hojas nos llevan a la conclusión de que la dotación de almidón es donado por las hojas (Cuadros 15 y Figura 15). Por la misma causa, al separar las anteras de la espiga para la siembra éstas adquieren un aspecto vacío (Figura 16). Esto podría explicar porqué Ouyang et al (1973) observan - gran cantidad de polen vacío durante el cultivo de anteras de *T. aestivum* y porqué Wilson (1977) encuentra durante el cultivo de espigas completas de *T. vulgare* que aquellas anteras que se desprendían por el filamento de la espiga detenían su desarrollo.

Así pues, parece que para incrementar la respuesta androgénica en *T. aestivum* se requiere de la siembra de

espigas completas con hojas. Conclusión que coincide y aclara los experimentos de Wilson (1977) con *H. vulgare* y Kasperbauer et al (1980) con *F. arundinaceae*, quienes aumentaron los rendimientos de androgénesis mediante la siembra respectivamente, de espigas completas y de porciones de panícula de florecillas.

Entonces, la siembra de espigas completas restauraría el factor de la pared de la antera (a y B) propuesto por Sunderland (1974) y el factor interno de los tejidos por Kasperbauer et al. (1980) y Wilson (1977) sería el mantenimiento de la viabilidad del polen durante el cultivo.

VI. BIBLIOGRAFIA

- Aalders, L.E. (1958). Monoploidy in cucumbers. *J. Hered.* 49: 40-44.
- Alexander, M.P. (1969). Differential staining of aborted pollen. *Stain Technology* 44(3): 117-122.
- Amos, J.A. and R.S. Scholl. (1978). Induction of haploid callus from anthers of four species of *Arabidopsis*. *Z. Pflanzenphysiol.* 90: 33-43.
- Bajaj, Y.P.S. (1977). *In vitro* induction of haploids in wheat (*Triticum aestivum* L. .) *Crop. Improv.* 4(1): 54-64.
- Barclay, I.R. (1975). High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. *Nature* 256: 410-11.
- Basu, R.N. (1969). Effect of auxin synergist in rooting of Fresh beans (*Phaseolus vulgaris*) cuttings. *Curr. Sci.* 38: 533-35.
- Bhojwani, S.S., J.M. Dunwell and N. Sunderland (1973). Nucleic-acid and protein contents of Embryogenic tobacco pollen. *J. Exp. Bot.* 24(82): 863-71.
- Bouharmont, J. (1977). Cytology of microspores and calli after anther culture in *Hordeum vulgare*. *Caryologia* 30 (3): 351-60.
- Bretell, R. (1980). Maize anther culture Maize Genetics Cooperation. *News Letter* 54.
- Carlson, P.S. (1970). Induction and Isolation of auxotrophic mutants in somatic cell cultures of *Nicotiana tabacum*. *Science* 168: 487-89.
- Carlson, P.S. (1973). Methionine sulfoximine-resistant mutants of tobacco. *Science* 180: 1366-68.
- Clapham, D.H. (1977). Haploid induction in cereals. In: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj (Eds.) *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ culture.* pp. 279-98, Springer Verlag.

- Collins, G.B. (1977). Production and utilization of anther derived haploids in crop plants. *Crop Science* 17: 583-86.
- Collins, G.B. and N. Sunderland. (1974). Pollen derived haploids of *Nicotiana knogthiana*, *N. raimondii* and *N. attenuata*. *J. Exp. Bot.* 25: 1030-39.
- Corduan, G. (1975). Regeneration of anther derived plants of *Hyscyamus niger* L. *Planta* 127: 27-36.
- Chen Chi-Chang. (1978). Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice. *Crop Science* 18: 905-06.
- Chu Zhih-Ching, Wang Chin-Chu, Sun Chin-San and ChienNanfan. (1973). Investigations on the induction and morphogenesis on the induction and morphogenesis of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants. *Acta Bot. Science* 15: 1-11 (Resumen en Inglés).
- Dale, P.J. (1975). Pollen dimorphism in anther culture in barley. *Planta* 127: 213-20.
- Duncan, E.J. and E. Herberle. (1976). Effect of temperature shock on nuclear phenomena in microspores of *Nicotiana tabacum* and consequently on plant production. *Protoplasma* 90: 173-77.
- Dunwell, J.M. (1978). Division and differentiation in cultured pollen, In Thorpe A.T. (Ed.) *Frontiers of Plant Tissue culture*. Proceedings of the 4th. International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Calgary, Canada.
- Dunwell, J.M. and N. Sunderland. (1974a). Pollen ultrastructure in anther culture of *Nicotiana tabacum* I. Early stages in culture. *J. Exp. Bot.* 25: 352-61.
- Dunwell, J.M. and N. Sunderland. (1974b). Pollen structure in anther culture of *Nicotiana tabacum* II. Changes associated with embryogenesis. *J. Exp. Bot.* 25: 363-73.
- Dunwell, J.M. and N. Sunderland. (1975). Pollen ultrastructure in anther cultures of *Nicotiana tabacum* III. The first sporophytic division. *J. Exp. Bot.* 26: 240-52.

- Durr, A. and J. Fleck. (1980). Production of haploid plants of *Nicotiana glauca*. Plant Science Letters 18: 75-79.
- Fujii, T. (1970). Callus formation in wheat anthers. Wheat Information Service. 31: 1-2.
- George, L. and S. Narayanaswamy. (1973). Haploid *Capsicum* through experimental androgenesis. Protoplasma 78: 467-70.
- Gaff, D.F. and O. Okong'o-ogola. (1971). The use of nonpermeating pigments for testing the survival of cells. J. Exp. Bot. 22(72): 756-58.
- González-Medina, G. and J. Bouharmont. (1978). Experiments in anther culture in barley. Influence of culture methods on cell proliferation and organ differentiation. Euphytica 27: 553-59.
- Gresshoff, P.M. and C.H. Doy. (1972a). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). Planta 107: 161-70.
- Gresshoff, P.M. and C.H. Doy. (1972b). Haploid *Arabidopsis Thaliana* callus and plants from anther culture. Aust. J. Biol. Sci. 25: 259-64.
- Guha-Mukherjee, S. (1973). Genotypic differences in the *In vitro* formation of embryoids from rice pollen. J. Exp. Bot. 24: 139-49.
- Guha, S. and Maheshwari, S.C. (1964). *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature 204: 497.
- Herlop-Harrison, J. and Y. Heslop-Harrison (1970). Evaluation of pollen viability by enzymatically induced fluorescence; intracellular hydrolysis of fluorescein diacetate. Stain Technology 45(3): 115-20.
- Hu Han, Hsi Tze-ying, Tzeng Chu-chin, Ouyang Tsun-won and Ching-kang. (1978). Application of anther culture to crop plants. In: Thorpe, A.T. (Ed.) frontiers of Plant Tissue Culture. Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture. Calgary, Canada.

- Horner, M. and M.E. Street. (1978a). Problems encountered in the culture of isolated pollen of a burley cultivar of *Nicotiana tabacum* J. Exp. Bot. 29(100): 217-226.
- Horner, M. and M.E. Street. (1978b). Pollen dimorphism—origin and significance in pollen plant formation by anther culture. Ann. Bot. 42: 763-71.
- Horner, M. and R.L. Mott. (1979). The frequency of embryogenic pollen grains is not increased by *in vitro* anther culture in *Nicotiana tabacum* L. Planta 147: 156-58.
- Institute of Genetics, Academia Sinica. (1974). Investigation on the induction androgenic expression of rice pollen plants. Scientia Sinica 17(2): 209-22.
- Kasha, K.J. and N.K. Kao. (1970). High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.). Nature 225: 879-
- Kasperbauer, M.J. and G.B. Collins. (1974). Anther-derived haploids in tobacco: Evaluation of procedures. Crop Science 14: 305-07.
- Kasperbauer, M.J. and H.M. Wilson. (1979). Haploid plant production and use. In: Durbin, R.F. (ed.) *Nicotiana* procedures for Experimental use. Tech. Bull. No. 1586 U.S. Dep. of Agriculture.
- Kasperbauer, M.J., R.C. Buckner and W.D. Springer. (1980). Haploid plants by anther-panicle culture of tall fescue. Crop Science 20: 103-07.
- Keller, W.A. and G.R. Stringan. (1978). Production and utilization of microspore derived haploid plants. In: Thorpe, A.T. Frontiers of Plant Tissue Culture. Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Cultures. Calgary, Canada.
- Keller, W.A. and K.C. Armstrong. (1979). Stimulation of embryogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet. 55: 65-67.
- Kockhar, T., P.S. Sabharwal and J. Engelberg. (1971). Production of homozygous diploid plants by tissue culture technique. J. Hered. 62: 59-61.

- La Cour, L.F. (1949). Nuclear differentiation in the pollen grain. *Heredity* 3: 319-339.
- Machlis, L. and J.G. Torrey. (1956). *Plant in action. A laboratory Manual of Plant Physiology.* W.H. Freeman. Sn. Francisco.
- Madrigal, R. (1978). Development of androgenetic embryos and plant in anther cultures of *Nicotiana tabacum* L. PhD. Tesis. University of California, Riverside.
- Maeda, E., V.M. Villalobos and T. Sugiura. (1978). Fine structure of the regenerating calls in *Fragaria* anther cultures. *Japan J. Breed* 28: 143-46.
- Muñoz, A. (1980). *Experimentación Agrícola. Apuntes de curso.* UACH, Chapingo, México.
- Murashige, T. and F. Skoog. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* 15: 473-97.
- Nishi, T. and S. Mitsuoka. (1969). Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant *Japan J. Genetics* 44: 341-46.
- Nitsh, C. (1974). Pollen culture: a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In: Kasha, K.J. (Ed.). *Haploids in Higher Plants.: Advances and Potential.* Proceedings of First International Symposium. Guelph, Univ. of Guelph.
- Nitsh, C. (1977). Culture of isolated microspores. In: Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj (Eds.). *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* Springer-Verlag.
- Nitsh, J.P. and C. Nitsh (1969). Haploid plants from pollen grains. *Science* 163: 85-87.
- Nitsch, C. and B. Norreel. (1972). Factors favoring the formation of androgenetic embryos in anther culture. In: Srb, A.M. (Ed.) *Gene, Enzymes and Populations.* Vol. 2 pp. 129-49, Plenum Press. New York.
- Ono, H. and E.N. Larter. (1976). Anther culture of *Triticale*. *Crop Science* 16: 120-22.

- Orlikowska, T. (1977). Induction of androgenesis *in vitro* in *Secale cereale* and triticale. *Genetica Polonica* 18: 52-59.
- Ouyang Tsun-wen, Hu Han, Chuang Chia-chum and Tseng Chung Chi. (1973). Induction of pollen plants from anther of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. *Scientia Sinica* 16(1): 79-95.
- Pan Ching-li, Pai Show-ksin, Kuan Chi-liang and Yu Huiksia. (1975). Certain factors affecting the frequency of induction of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants. *Acta Botánica Sinica* 17: 161-66 (Resumen en Inglés).
- Patrick, J.W. and P.F. Wareing. (1973). Auxin-promoted transport of metabolites in stems of *Phaseolus vulgaris* L. *J. Exp. Bot.* 24(83): 1158-71.
- Quazi, M.H. (1978). Regeneration of Plants from anther of broccoli (*Brassica oleracea* L.) *Ann. Bot.* 42: 473-75.
- Raghavan, V. (1976). Role of the generative cell in androgenesis in henbane. *Science* 191: 388-89.
- Raghavan, V. (1978). Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultures anther segments *Hyoscyamus niger* (henbane). *Amer. J. Bot.* 65(9): 989-1002.
- Raghavan, V. (1979). Embryogenic determination and ribonucleic acid. Synthesis in pollen grains of *Hyoscyamus niger* (henbane). *Amer. J. Bot.* 66(1): 36-39.
- Rajasekavan, K. and M.H. Mullins. (1979). Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines. *J. Exp. Bot.* 30(116): 399-07.
- Rashid, A. and H.E. Street. (1974). Segmentations in microspores of *Nicotiana sylvestris* and *Nicotiana tabacum* which lead to embryoid formation in anther cultures. *Protoplasma* 80: 323-39.
- Reinert, J., Y.P.S. Bajaj and E. Heberle. (1975). Induction of haploid tobacco plants from isolated pollen. *Protoplasma* 89: 191-96.

- Reinert, J. and Y.P.S. Bajaj. (1977). Anther culture: Haploid production and its significance. In: Reinert J. and Y.P.S. Bajaj (Eds.). Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag.
- Sangwan-Norreel, B.S. (1977). Androgenetic stimulating factors in the anther and isolated pollen grain culture of *Datura innoxia* M.H.J. Exp. Bot. 28: 893-52.
- Scowcraft, W.R. (1979). Symposium on Plant tissue culture in Peking, China, 1978. IAPTC. News Letter 27: 24-27.
- Sharp, D.K., Dougall and E.F. Paddock. (1971). Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicum*. Bull Torrey Bot. Club. 98: 219-22.
- Sharp, W.R. and R.S. Raskin. (1972). The use of nurse culture in the development of haploid clones in tomato. Planta 104: 357-61.
- Sheridan, F.W., C. Nitsch and M.G. Neuffer. (1980). Anther culture studies. Maize Genetics Cooperation. News Letter 54.
- Sink, K.C. Jr. and V. Padmanabhan. (1977). Anther and pollen culture to produce haploids: Progress and applications for the plant breeder. Hort Science 12(2): 143-48.
- Sopory, S.K. (1977). Development of embryoids in isolated pollen culture of dihaploid *Solanum tuberosum*. Z. Pflanzenphysiol. 84: 453-57.
- Sopory, S.K. and S.C. Maheshwari. (1976a). Development of pollen embryoids in anther culture of *Datura innoxia* I. General observations and effects of physical factors. J. Exp. Bot. 27(96): 49-57.
- Sopory, S.K. and S.C. Maheshwari. (1976b). Development of pollen embryoids in anther culture of *Datura innoxia* II. Effects of growth hormones. J. Exp. Bot. 27(96): 58-68.
- Sopory, S.K., E. Jacobson and G. Wenzel. (1978). Production of monohaploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Science Letters 12: 47-54.

- Sun Chin-san, Wang Chin-chu and Chi Zhih-ching. (1973). Cytological studies on the androgenesis of Triticale. *Acta Botánica Sinica* 15(2): 163-73.
- Sunderland, N. (1970). Pollen plants and their significance. *New Scientist* 47: 142-44.
- Sunderland, N. (1971). Anther culture: A progress report *Sci. Prog.* 54: 527-49.
- Sunderland, N. (1973). Pollen and anther culture. In: Street, H.E. (Ed.) *Plant Tissue and Cell Culture. Botanical Monographs II.* University of California Press. Deikeleyand, Los Angeles.
- Sunderland, N. (1974). Anther culture as a means of haploid induction. In: Kasha, K.J. (Ed.) *Haploid in Higher Plants Advances and Potential* Guelph, University of Guelph.
- Sunderland, N. (1978). Strategies in the improvement in anther culture. *Proceeding of symposium of Plant Tissue Culture.* Peking, Science Press.
- Sunderland, N. (1979). Towards more effective anther culture. *IAPTC News Letter* 27: 10-12.
- Sunderland, N. and F.W. Wicks. (1971). Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum* *J. Exp. Bot.* 22(70): 213-26.
- Sunderland, N. and M. Roberts. (1977). New approach to pollen culture. *Nature* 270: 236-38.
- Sunderland, N. and J.M. Dunwell. (1974). Pathway in pollen embryogenesis. In: Street, H.E. (Ed.). *Tissue Culture and Plant Science. Proceeding of the Third International Congress of Plant Tissue and Cell Culture.* Academic Press.
- Tomes, D.T. and G.B. Collins. (1976). Factors affecting haploid plant production from *in vitro* anther cultures of *Nicotiana* species. *Crop Science* 16: 837-90.
- Vicitz, E. (1952). El uso de 2,3,5-Trifeniltetrazolium para determinar la vitalidad del polen. *Anales de Edafología y Fisiología Vegetal* 2: 297-308.

- Wang, Ching-chu, Chu Chih-Ching, Sun Ching-sand and Wu Su-knuen. (1973). The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum*) anthers cultured *in vitro*. *Scientia Sinica* 16 (2): 218-22.
- Weatherhead, M.A. and G.G. Henshaw. (1979). The induction of embryoids in free pollen culture of potatoes. *Z. Pflanzenphysiol.* 94: 441-97.
- Weatherhead, M.A., J. Burdon, and G.G. Henshaw. (1979). Effects of activated charcoal as an additive plant tissue culture media: Part. 2 *Z. Pflanzenphysiol* 94: 399-405.
- Wilson, H.M. (1977). Culture of whole barley spikes stimulates high frequencies of pollen calluses in individual anthers. *Plant. Sci. Letters.* 9: 233-38.
- Wilson, H.M., G. Mix and B. Foroughi-Wehr. (1978). Early microspore divisions and subsequent formation of microspore calluses at high frequency in anthers of *Hordeum vulgare* L. *J. Exp. Bot.* 29(108): 227-38.