



UNIVERSIDAD NACIONAL  
AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**"ANÁLISIS CROMOSÓMICO EN PLANTAS DE CHICHARO  
(Pisum sativum) PROVENIENTES DE CULTIVO  
IN VITRO"**

TESIS PROFESIONAL  
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE  
B I O L O G O  
P R E S E N T A  
ANA MARIA CAMACHO MARIN

FECHA DE ORIGEN

MEXICO, D. F.

1990



## **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 está 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

	Pág
RESUMEN	1
I. INTRODUCCION.	3
II. ANTECEDENTES.	6
II.1 Cromosomas	
II.1.1. Composición Química	6
II.1.2. Variaciones cromosómicas	7
II.2 Estabilidad Genética de Plantas Regeneradas <u>in vitro</u>	15
II.3 Características Generales de <u>Pisum sativum</u> L. cv. Century	
II.3.1. Clasificación	22
II.3.2. Cariotipo	25
II.3.3. Estabilidad Genética	26
III. OBJETIVOS	28
IV. MATERIALES Y METODOS	
IV.1 Material Biológico	29
IV.2 Preparación del Material	30
IV.3 Cariotipo	32
IV.4 Cuantificación de Aberraciones	33
V. RESULTADOS Y DISCUSION	34
VI. CONCLUSIONES	63
APENDICE I	65
APENDICE II	67
APENDICE III	71
BIBLIOGRAFIA	75

## RESUMEN

En el presente trabajo se hizo un análisis cromosómico a partir de células meristemáticas de plantulas de semillas germinadas y obtenidas de plantas de *Pisum sativum* L. provenientes de cultivo *in vitro* originadas a partir de hojas inmaduras (RT1) así como la subsecuente generación lograda a partir de semillas (RT2).

Las preparaciones para el estudio cromosómico fueron realizadas de meristemas radiculares y se ensayaron diferentes (condiciones) variables como: mitostáticos, tiempo de aplicación, longitud de la raíz, etc.

Las anomalías cromosómicas que se tomaron en cuenta fueron tanto estructurales como numéricas, dentro de las estructurales se analizaron porcentajes de aberraciones, cromosomas retardados y micronúcleos, así como la longitud relativa porcentual y la relación de brazos en el cariotipo.

El cariotipo no presentó grandes modificaciones para todos los lotes considerados y sólo en los cromosomas VII y IV en el parámetro relación de brazos fue diferente para RT1 comparado con todos los demás lotes tanto testigos como RT2.

Se observó que para las plantas regeneradas *in vitro* el número de células en división fue mayor que las regeneradas *in vivo* en general podemos decir que no hay modificaciones en el número cromosómico y los cambios estructurales en el plasma germinal fueron translocaciones e inversiones, viéndose reflejadas en los porcentajes de aberraciones siendo más

elevados en los controles debido probablemente a la edad de las semillas.

## 1. INTRODUCCION

La alimentación siempre ha sido una de las necesidades del hombre que ha requerido de una gran atención y en la actualidad, el aumento rápido de la población ha hecho necesario adoptar técnicas y políticas muy particulares que no siempre son las más adecuadas. Una de ellas es la reducción en las fuentes alimenticias de origen vegetal, pues de muy pocas especies (no más de 30) se constituye el 95% de la alimentación humana, esto no solo implica depender de muy pocas especies, además las variedades de maíz, trigo, arroz, etc. que se cultivan son más susceptibles a factores adversos, un ejemplo son las variedades de maíz (*Zea mays* L.) que se siembra en el norte y centro de Nuevo León y Tamaulipas (Reyes, 1987) esto debido ha que se han destruido las poblaciones silvestres ocasionando la reducción de la variabilidad genética y la pérdida de germoplasma valioso que podría contener genes de resistencia a determinados factores y que a través de la hibridación tradicional o mediante técnicas de modificación genética se pudieran lograr plantas mejoradas (Villalobos, 1984; Rubluo, 1985)

La familia Leguminosae es una de las más grandes dentro del reino vegetal y es importante en la vida del hombre como un recurso genético disponible y utilizado para el bienestar y satisfacción de sus necesidades, como alimento directo, forraje o en el proceso de fijación del nitrógeno (Mroginski y Kartha, 1984).

En particular *Pisum sativum* L. tiene importancia agronómica, forma parte de la dieta del hombre, y no obstante su alto

consumo, su rendimiento promedio (kg / ha) es a menudo bajo, por lo que es necesario implementar diversas técnicas que conduzcan a su mejor aprovechamiento (Pearson, 1981).

Una alternativa han sido las técnicas de cultivo de tejidos vegetales que se han utilizado en la regeneración in vitro de Pisum sativum L. debido a que han demostrado ser de gran valía, pues permiten rebasar las barreras biológicas y eventualmente alterar la información genética característica de una especie, recuperando clones libres de enfermedades, conservando el germoplasma valioso y multiplicando rápidamente las variedades seleccionadas (Villalobos, loc cit.; Rubluo, loc cit.) además se pueden aplicar para buscar solución a un amplio rango de problemas en aspectos básicos de morfogénesis, bioquímica, fisiología, citogenética, etc. (Street, 1977), también en estudios de producción de fármacos y otros productos naturales (Griesbach, 1987).

Se conoce que en las células en cultivo, existen factores físicos, químicos y biológicos que las inducen a modificar su contenido genético y que anteriormente éstas se consideraban como variaciones indeseables, sin embargo este concepto se ha ido modificando al grado que se considera de gran interés estudiar el material genético en estas condiciones (Villalobos, loc cit.; Jaroslavy y Novak, 1985).

El poder mantener el contenido genético sin variaciones o alterar y formar combinaciones más adaptadas a las nuevas exigencias es de gran interés puesto que es en el ADN donde se almacena toda la información y es el material del cual depende la formación, función y adaptación del organismo (Cervantes,

1978; Gardner, 1979).

Los primeros estudios sobre la estabilidad genética en cultivo in vitro fueron tabaco y zanahoria y consistían en detectar las modificaciones numéricas en el contenido cromosómico debido a que las técnicas empleadas no eran las adecuadas. En la actualidad usando técnicas sencillas de tinción es posible hacer observaciones de (marcas citológicas) relación de brazos, posición del centrómero, longitud del cromosoma y localización del organizador nucleolar y en cuanto a las bandas Giemsa son una de las estrategias citológicas que reditúan más información (Phillips, 1988).

Este trabajo forma parte de investigaciones anteriores sobre regeneración de plantas (Rubluo y Kartha, 1984) a partir de hojas inmaduras de chicharo donde al mismo tiempo que era importante la micropropagación también era comprobar si se mantiene la estabilidad genética usando tejido no meristemático como explante y también analizando las generaciones posteriores.

## II ANTECEDENTES

### II.1 Cromosomas

#### II.1.1 Composición química

El ADN contiene y permite la transferencia de la información genética. Es un componente principal de las células y constituye junto con el ácido ribonucleico (ARN) entre el 5 y el 15 por ciento de su peso seco (Leningher, 1978).

Los nucleótidos son las unidades monómeras de los ácidos nucleicos. Cada nucleótido está formado por tres componentes: una molécula de azúcar, un grupo fosfato y una base nitrogenada que puede ser del tipo de las purinas (adenina o guanina) o de las pirimidinas (citocina o timina). Estos tres componentes se integran en una serie, número y secuencia característicos de encadenamiento y enlaces de adenina-timina y de guanina-citocina, unidos los primeros por dos átomos de hidrógeno, los últimos por tres y lateralmente por fosfatos y desoxirribosas, de tal manera que se asemeja una escalera o cadena helicoidal (Jiménez, 1988).

En los eucariontes, el cromosoma es un organelo altamente complejo y está formado por ADN, proteínas histónicas, ARN que en su conjunto estructuran la cromatina. (Smith y Keary, 1979). Las histonas junto con el ADN, estructuran el primer nivel de compactación que es el nucleosoma o corazón, compuesto de un octámero formado por dos moléculas de cada una de las histonas; a este octámero lo rodea la doble hélice de ADN dándole cerca de dos vueltas completas; después de esto la cadena de ADN presenta un puente antes de llegar al siguiente corazón. A la mitad del puente de ADN se encuentra una molécula de la histona 1, la cual

estabiliza, orienta y permite sobreponer uno tras otro a los corazones o coros de cada nucleosoma (corazón y puente), este estado de fibra presenta el segundo nivel de estructuración de cromatina, siendo la compactación del ADN de 5 a 7 veces, resultando ser 1000 veces menor a la compactación del cromosoma metafásico. Si esta fibra se replica en si misma se genera una de diámetro mayor llamada solenoide, siendo este el tercer nivel de estructuración. El empaquetamiento permite concentrar al ADN llegando a un cuarto o quinto nivel de estructuración, formando así las fibras del cromosoma que conocemos (Wolfe reportado en Jiménez loc cit.). Su principal función es almacenar, replicar y transmitir la información hereditaria en forma ordenada que no sería posible en grupos de unidades genéticas distribuidas al azar (Swanson, 1968 ; Stebbins, 1971).

El cromosoma presenta una o varias constricciones; una de ellas muestra un delicado gránulo, el centrómero o cinetocoro por donde el cromosoma se fija al huso acromático durante la división celular. En organismos pluricelulares, el centrómero nunca es terminal; a uno y otro lado del centrómero, el cromosoma presenta una porción denominada brazo, pero uno de los brazos puede ser mas corto, a veces una constricción secundaria llamada también satélite corresponde al organizador nucleolar, que es la región que controla al nucleolo constituido por heterocromatina (Curtis, 1976).

#### II.1.2. Variaciones cromosómicas

Para cada especie biológica y categoría de células los cromosomas se encuentran en número constante y como

individualidades transmisibles con caracteres biológicos propios. Las células somáticas de las plantas superiores y de los animales generalmente tienen números cromosómicos  $2n$ ; o sea que cada cromosoma se encuentra por duplicado, mientras que las células germinales, las cuales sufren una división reductora tienen un solo miembro de cada par. Sin embargo en realidad muy frecuentemente puede ocurrir una alteración en el material genético; en el sentido más amplio las mutaciones comprenden todos los cambios incluyendo tanto las alteraciones, en las partículas submicroscópicas como las estructurales y numéricas de los cromosomas, aunque generalmente el término mutación lo emplean los genetistas en sentido estricto para especificar solamente cambios de gen o de punto en contraste con los cambios cromosómicos visibles; es de presumirse que los cambios menores ocurren en los genes constantemente sin producir ninguna alteración fenotípica, sin embargo influyen en la selección natural y representan así un factor en la evolución debido a que al ocurrir esos cambios se perpetúan en las siguientes generaciones (Gardner, 1979; Smith-Keary, 1979)

Cambios en la estructura cromosómica se han detectado en una amplia variedad de organismos, clasificándose en cuatro tipos las alteraciones que pueden ser debidas a cambios en el número de genes en los cromosomas (delección y duplicación), o en la ubicación de los genes en los cromosomas (inversiones y translocaciones) (Ayala y Kiger, 1980).

a.- Delección. Consiste en la pérdida de un segmento cromosómico y, por consiguiente, de la información genética contenida en él,

considerandose como deficiencia si el segmento no incluye centrómero e intersticial cuando si lo incluye; se identifican ambas citológicamente en células somáticas cuando son lo suficientemente grandes como para observarse en los cromosomas metafásicos y las deficiencias en células en anafase como fragmentos, sin embargo el momento más propicio para identificar la delección es cuando se da el apareamiento entre cromosomas homólogos. En general puede ser este tipo de cambio estructural letal pero en determinadas especies en las que existe una repetición de información genética como las poliploides, la pérdida de algún segmento cromosómico puede ser tolerado por los individuos. (Lacadena, 1981)

b.- Duplicación. Es un cambio estructural que produce la repetición de un segmento cromosómico de mayor a menor extensión. Como consecuencia de la duplicación de segmentos pueden originarse puentes anafásicos en las divisiones meióticas con una posterior rotura y fusión y citológicamente las duplicaciones pueden tener la apariencia similar al de la delección en el apareamiento entre cromosomas homólogos, aunque la prueba citológica más evidente de la existencia de las duplicaciones es sin duda la identificación banda a banda. (Ayala y Kiger, loc cit.; Lacadena, loc cit.).

c.- Inversión. Es un cambio estructural por el cual un segmento cromosómico cambia de sentido dentro del propio cromosoma haciendo giros de 180 grados y pueden clasificarse en: i) simples paracéntricas cuando en un cromosoma determinado sólo hay un segmento invertido y no incluye al centrómero, ii) simples pericéntricas cuando el centrómero está incluido en el segmento invertido y iii) complejas cuando se invierten simultáneamente

varios segmentos de un mismo cromosoma. El comportamiento citológico de las inversiones paracéntricas y pericéntricas es distinto, tanto en las células somáticas como en las meióticas; en la mitosis las pericéntricas pueden cambiar la morfología del cromosoma y las paracéntricas no, mientras que en la meiosis las inversiones paracéntricas originan la formación de puentes y fragmentos acéntricos y cuando la inversión incluye al centrómero no se producen puentes anafásicos y como consecuencia de una inversión doble pericéntrica y paracéntrica ocurre el sobrecruzamiento en un lugar próximo al centrómero originando un puente anafásico (Ayala y Kiger, loc cit.; Lacadena, loc cit.).

d.-Translocación. Es un cambio estructural en el que algún o algunos segmentos cromosómicos cambian de posición relativa dentro del complemento cromosómico, clasificándose en los siguientes tipos i) translocaciones internas o intracromosómicas cuando un segmento cromosómico cambia de posición dentro del propio cromosoma y ii) translocaciones intercromosómicas cuando los cambios ocurren entre cromosomas, llamándose transposición cuando un segmento de un cromosoma pasa a otro y translocación recíproca cuando el cambio de segmentos cromosómicos es mutuo entre dos cromosomas siendo simétrica si en el cambio cada cromosoma conserva su centrómero o asimétrica si en el cambio ambos centrómeros quedan juntos originando esta última cromosomas dicéntricos y fragmentos acéntricos.

Los fragmentos acéntricos se desintegran en el citoplasma o forman micronúcleos al no incorporarse a ningún grupo anafásico, mientras que los cromosomas dicéntricos pueden originar

cromosomas retardados ó puentes anafásicos tanto en mitosis como en meiosis. (Lacadena, loc cit.)

Además de los comportamientos citológicos (puentes, fragmentos y micronúcleos) producidos por las cuatro variaciones estructurales antes mencionadas existen las anafases multipolares donde el huso acromático presenta disturbios los cuales impiden su buena formación y funcionamiento y los cromosomas retardados producto de la inactivación del centrómero (Balza, 1980).

Los cambios en el número de cromosomas puede afectar a los cromosomas de diferentes formas, ya sea por la pérdida o adquisición de uno o más cromosomas o de dotaciones completas de ellos, debido a esto este tipo de variaciones se clasifican en varios tipos (Smith - Keary, 1979)

a.-Fusiones y Fisiones. Llamados también sistemas Robertsonianos, estos cambios alteran el número de cromosomas pero no incrementan o reducen la cantidad de material hereditario (Ayala y Kiger loc cit.)

Las fisiones centroméricas o translocaciones Robertsonianas originan cambios en la estructura, de forma que un cromosoma metacéntrico produce un par de cromosomas telocéntricos por división transversal del centrómero; por su parte las fusiones Robertsonianas resultan de las fusiones de dos cromosomas acro- o telocéntricos para dar lugar a un cromosoma metacéntrico, este tipo de cambios morfológicos ocasionan una reducción en el número total de cromosomas y al igual que en las fisiones, se mantiene constante el número de brazos mayores, la fusión cromosómica es mucho más común que la fisión (Ayala y Kiger, loc cit.;

García, 1985)

b.- Haploidia. llamada también Monoploidia es la condición de un organismo, tejido o célula con un solo juego de cromosomas y puede ser un estado normal o anormal en la naturaleza. La posibilidad de que un animal haploide llegue al estado adulto es pequeña pero en el reino vegetal, por el contrario la haploidia anormal ocurre con cierta frecuencia (Lacadena, loc cit.)

c.- Aneuploidia es la condición de un individuo, órgano, tejido o célula cuya constitución cromosómica no comprende un número exacto de los juegos cromosómicos básicos propios de la especie; se utiliza el término nulisómico para individuos deficientes de un par de cromosomas homólogos de su complemento somático y monosómico, trisómico, tetrasómico, etc. se refieren a la presencia de un cromosoma determinado, una, tres, cuatro veces (Ayala y Kiger, loc cit.; Lacadena, loc cit.).

d.- Poliploidia es la duplicación dos o más veces del juego cromosómico y se denomina tri, tetra o n-poliploide según el número de juegos idénticos de cromosomas que tenga. Dos clases de poliploides pueden distinguirse de acuerdo al origen del juego cromosómico i) autopoliploides se originan mediante la duplicación directa del complemento cromosómico derivada de la misma especie ii) alopoliploides también llamados anfidiplóides se deriva su juego cromosómico de especies diferentes. (Ayala and Kiger, 1980)

La endomitosis y la endoreduplicación (reduplicación) son causas de las poliploidias mientras que una aneuploidia su principal causa es la translocación, la no disyunción mitótica o deleción (Evans y Reed, 1981). La endomitosis consiste en una

división celular sin que ocurra una telofase completa (Curtis, 1976) y la endoreduplicación (Torrey, 1958) consiste en duplicar la cantidad del ADN durante la interfase en dos ocasiones sin que ocurra una división celular entre ambas. Los dos procesos anteriores han sido estudiados detalladamente detectándose algunos pasos o mecanismos que ocurren durante estos procesos (González et al., 1985).

Aunque el número cromosómico en si representa el número de agrupamientos en los cuales se divide el material genético, el trayecto evolutivo de una especie determinada puede seguirse en algunos casos por la comparación numérica y las relaciones estructurales de sus cromosomas con los de otras especies del género, siendo el material genético acompañado de otros estudios un factor importante en la determinación de los esquemas evolutivos (Gardner, loc cit.; Mercado, 1983)

Se podría hablar mucho de los cambios evolutivos originados por los cambios en el material genético ya que las alteraciones en la frecuencia génica representan la base del cambio en la estructura genética de las poblaciones naturales y en esencia, esto es evolución. Sin embargo, se requiere de algo más para establecer cambios en las frecuencias genéticas de las unidades de población en los periodos de tiempo pues el desarrollo de una planta y la respuesta que dé a un medio ambiente determinado va a influir en el genotipo. (Gardner, loc cit.)

La Fisiología nos ayuda a conocer el control genético y a su vez este último nos ayuda a tener un mejor entendimiento de la fisiología, un ejemplo es el control de la floración el cual está dado por un sistema poligénico que actúa de acuerdo a las

condiciones del medio ambiente, pudiendose ver las expresiones de dichos genes en la manifestación morfológica ya que las condiciones medio ambientales o tratamientos favorecen la expresión de un gen en particular o combinaciones de genes y así obtener segregación distinta (Barber en Murfet, 1977)

No obstante y a pesar de lo anteriormente dicho, en estudios como el de Pisum sativum realizado por Lamprecht se encontró que un fenotipo similar no es siempre una prueba de homogeneidad genética y por otro lado la diversidad fenotípica no es siempre debido a una heterogeneidad genética lo que quizás sea resultado de una penetrancia incompleta de un gen y no una impureza genética (Murfet, loc cit.)

Las fuentes o posibles causas que modifican el genoma en los organismos son muchas ya que pueden ser naturales o inducidas; entre ellas podemos citar los siguientes tratamientos: las temperaturas elevadas, presión de oxígeno, edad de los progenitores, rayos X y los rayos ultravioleta, cultivos celulares y regeneración de tejidos; otra fuente son ciertos agentes químicos como el fenol, los análogos de bases nitrogenadas, la colchicina que es un alcaloide, el acenafteno y ácido indolacético entre otros y las hibridaciones intra e inter específicas (Lacadena, 1981).

Como se apuntó anteriormente, la mayoría de las variaciones a nivel genético causan alteraciones en los organismos bajo condiciones de su medio natural usual, debido a que con los cambios al azar es remota la posibilidad de mejoramiento de la planta o animal, no obstante los cambios podrían estar coordinados

(o ser inducidos) con situaciones ambientales controladas por el hombre y causar un mejoramiento en favor al mismo hombre y a su ambiente; por ejemplo, las ovejas de patas cortas las cuales son más deseables para el hombre, los frutos sin semilla así como la selección de plantas y frutos más deseables (Gardner, loc cit.).

## 11.2. Estabilidad Genética de Plantas Regeneradas in vitro.

Cuando Morel en 1960 describió la técnica de propagación de plantas utilizando ápices de orquídeas del género Cymbidium, se creyó que las plantas derivadas al ser fenotípicamente homogéneas indicaba estabilidad genética; sin embargo con el tiempo se encontró que no era así, y a partir de entonces muchos trabajos han aparecido sobre la variación y estabilidad cromosómica (Gamborg y Shyluk, 1981). Estas inestabilidades incluyen cambios numéricos o estructurales en los cromosomas (D'Amato, 1977).

Los cambios estructurales o pérdida de material genético puede ser una fuente de variación más frecuente que cambios en el número cromosómico (Evans et al., 1981); aunque estos estudios dan a conocer el grado de cambio citogenético en los cultivos celulares ó plantas regeneradas, son pocos los realizados hasta ahora y los análisis cromosómicos no han sido diseñados de manera que generen un máximo de información citogenética (Phillips y Wang, 1984).

Con respecto a los tejidos meristemáticos in vivo las células en división mantienen el número cromosómico diploide. Esto es asegurado por dos grandes propiedades que poseen las células meristemáticas: 1) El estricto control de la secuencia en la síntesis del ADN en la mitosis que no permite

extraduplicaciones que son responsables de la poliploidía somática y 2) La continua división la cual elimina partes menores de los cambios estructurales en los cromosomas que ocurren espontáneamente (D'Amato, loc cit.) aunque no siempre sucede así estrictamente. En estudios realizados en tejidos in vivo se ha establecido que en un gran número de especies en plantas superiores tanto Monocotiledóneas como Dicotiledóneas, las células de tejidos diferenciados como la corteza, endodermis y metaxilema sufren duplicación de cromosomas sin mitosis subsecuentes por lo cual el contenido de ADN en los núcleos pueden ser dobles o cuádruples (Torrey, 1961) un ejemplo son los cromosomas politénicos observados en Phaseolus coccineus L. y Phaseolus vulgaris L. lo que parece ser una condición muy usual en la constitución de muchos tipos de células, los núcleos se encuentran en diferentes condiciones a las que estuvieron al final de la mitosis inmediatamente antes de la diferenciación (D'Amato, 1977)

Con respecto a la estabilidad genética en cultivos in vitro se ha propuesto que está determinada por muchos factores, de los cuales podemos mencionar entre otros el tipo de explante utilizado, los nutrientes que se encuentran en el medio, el tiempo de cultivo empleado (Constantin, 1981)

a) La variabilidad cromosómica in vitro puede aparecer en los primeros subcultivos pero está mucho más asociada en cultivos de largos periodos (Evans y Reed, 1981). Trabajos con dos cultivos de Triticum monococcum L. ( $2n=14$ ) a partir de un mismo callo, el primero examinado después de dos años y el segundo después de tres años, se obtuvo lo siguiente; la mayoría de las células en el cultivo de dos años tenía 16 cromosomas y la minoría de 15 a

17, en el otro cultivo el número cromosómico vario de 27 a 30 presentando una alta frecuencia de 28 cromosomas (Kao et al., 1970). Las investigaciones de callos cultivados por mucho tiempo permiten suponer que las fluctuaciones o irregularidades del complemento cromosómico *in vitro* se han ido acumulando (Kallak et al., 1978) posiblemente causados probablemente por medios tóxicos. Así como también una activa tasa de crecimiento tiene niveles uniformes de ploidias (Gamborg and Shyluk, 1981), por lo que una posible explicación a la estabilidad de callos de Lirio fue su crecimiento relativamente lento (Sheridan, 1975).

b) Para hablar acerca de la variabilidad genética producida por sustancias, debemos mencionar en forma general, que el medio nutritivo para el cultivo de tejidos vegetales esta constituido de cuatro componentes esenciales y uno opcional. Los nutrientes esenciales son sales inorgánicas, fuentes de carbono y energía, vitaminas y reguladores de crecimiento, como nutriente opcional se menciona a los suplementos orgánicos (Martínez, 1985), siendo los reguladores de crecimiento los puntos de interés debemos mencionar que entre las hormonas vegetales mas usadas estan las auxinas y citocininas, las cuales pueden ser de origen natural o sintético. De las auxinas más utilizadas se tiene el ácido indolacético (AIA), el ácido indolbutírico (IBA), ácido naftalenacético (ANA) y el ácido 2-4 diclorofenoxiacético (2,4-D) (Dodds and Roberts, 1982) siendo el primero de origen natural.

Entre las citocininas, la zeatina (Z) es el primer compuesto natural activo sobre la división celular, sin embargo por ser muy difícil su extracción la 6 bencilamino purina (BA) y la cinetina

(K) de origen sintético son más utilizadas (Morel, 1974).

La auxina (2,4-D) se reporta que induce células aneuploides con mayor frecuencia que el ácido naftalenacético (ANA) (Griesbach, 1987) y en estudios de Haplopappus gracilis Nutt se observó que después de 18 subcultivos en un medio con ANA 1 mg/l se obtiene 100% de mitosis poliploides, mientras que cultivos con altas concentraciones de ANA 4 mg/l con el mismo número de subcultivos se obtiene el menor número de mitosis poliploides (1%) (Sheridan, 1975).

La cinetina actúa como un disparador de mitosis en células endorreducidas y en cultivos de raíz de Pisum sativum L. puede inducir endorreducción antes de la mitosis (D' Amato, 1977) y cuando estos fueron cultivados en el medio de Shigemura sólo células diploides proliferaron, pero cuando se adicionó al medio Cinetina mas 2,4-D, las células tetraploides también fueron selectivamente estimuladas para pasar a la mitosis. Otra de las causas de inestabilidad es la carencia o bajas concentraciones de fósforo en el medio (Evans y Reed, 1981).

En Brachycome dichromosomática (2n=4) en la formación de callos a partir de partes vegetativas usando ANA 0.5mg/l y cinetina 0.1mg/l se observa un potencial alto de rizogénesis y con 2mg/l de cinetina la formación de raíz fue completamente suprimida; en este trabajo merece especial atención la existencia de variabilidad fenotípica, a pesar de que se presentó un cariotipo normal (Gould, 1979).

c) De acuerdo al tipo de explante también se reportan diferentes respuestas genéticas, tal es el caso del cultivo de órganos los cuales no garantizan una estabilidad genética después

de su desdiferenciación y diferenciación a plantas completas (Martínez, 1985) con excepción del cultivo de embriones, donde la frecuencia de ploidias en forma natural es extremadamente baja (Young et al., 1981) un ejemplo son los trabajos sobre plantas regeneradas en maíz por cultivo a partir de embriones inmaduros donde arriba del 90% de las plantas son de cariotipo normal (Phillips y Wang, 1984).

El utilizar el cultivo de meristemas garantiza con un amplio rango de seguridad la estabilidad genética durante el cultivo, obteniendo plantas clonadas, siendo esto asegurado por las dos grandes propiedades de las células meristemáticas anteriormente mencionadas (D'Amato, 1977; Mroginski y Kartha, 1984; González et al., 1985).

Las células de callo como las de cultivos en suspensión asociadas con el factor tiempo son particularmente más variables en su número cromosómico que otros comprobándose en numerosos trabajos (Evans and Reed, 1981) en especies como *Crepis capillaris* L., *Nicotiana tabacum* L., *Haplopappus gracilis* L. (Kallak et al., 1978) *Triticum monococcum* L., *T. aestivum* L. y *Melilotus alba* Desr. Whites S.c., White M., Bukhara (Kao, 1970).

Los cultivos de protoplastos están sujetos a variación cromosómica como los de callos o de cultivos en suspensión, sin embargo plantas con número cromosómico diploide han sido regeneradas de cultivos de protoplastos (Evans loc cit.).

Además de estos factores que favorecen o influyen en la estabilidad genética cabe mencionar también una posible resistencia de las plantas, ya que trabajos con avena han

demostrado que una variedad puede ser mas estable cromosomicamente que otra (Phillips y Wang, loc cit.). De las especies que se reportan con poca variación se encuentra el lirio Lilium longiflorum thunb. Trumpet. L., White T, L. y Allium cega L. (Sheridan, 1975).

La manifestación de poliploidias puede explicarse por dos posibles causas: i) Que células diploides hayan duplicado sus cromosomas endomitoticamente en el tejido maduro in vivo y fueron preexistiendo en los explantes reflejandose con el tiempo de tratamiento en las condiciones in vitro (Kao, 1970; Sheridan, loc cot.; D'Amato, 1977), como se puede apreciar en estudios realizados en callos de Vicia hajastana y Haplosporus gracilis L. (Singh, 1972) o ii) Los niveles de ploidia son diferentes de los tejidos originales siendo los reguladores de crecimiento los inductores de las células diploides a reduplicarse (Gamborg and Shyluk, 1981). En los resultados obtenidos en cultivos de células en suspensión de Triticum monococcum L. (Kao, loc cit.); tanto in vivo como in vitro se observa que bajo las condiciones de cultivo ensayadas las células con número cromosómico variable reemplazan con el tiempo a las de número normal; sin embargo en algunas especies sólo plantas diploides se han recuperado de callos mixoploides, sugiriendo que las células diploides son selectivamente favorecidas durante la regeneración de plantas (Evans y Reed, 1981) por lo que se permite concluir que opera un mecanismo de selección (Kallak et al., 1978).

Con respecto a cultivos in vitro de tumores muy pocos análisis citogenéticos se han realizado; en la mayoría de los cultivos, células poliploides y aneuploides fueron predominantes;

mientras que las células diploides fueron raras o ausentes. Las poliploides y aneuploides son reportadas en tumores in vivo por lo que se sugiere que estas condiciones son responsables de la tumorigenesis, sin embargo muchos reportes indican que la poliploidia o pérdida cromosómica son el producto y no la causa de el estado neoplástico, ejemplos de especies cultivadas y estudiadas potencialmente tumorales son: Osmunda cinnamomea L., Pteridium aquilinum (L.) Kuhn, Picea glauca (Moench) Voss, Nicotiana tabacum L. (Singh, loc cit.) y Crepis capillaris L. en donde gracias a la técnica de bandeos se encontraron además numerosos rearrreglos estructurales (Ashmore y Gould, 1981).

Sea cual sea la causa de la inestabilidad genética tanto estructural como numérica podemos decir que tiene gran influencia en ello las condiciones de cultivo en relación con características de actividades reproductivas y metabólicas de las células (Kallak et al., loc cit.).

La pérdida o ganancia de cromosomas para algunas especies no trae consigo trastornos graves teniendo una alta multiplicidad genética, mientras que una alteración en especies con un número cromosómico menor como Haplopappus gracilis L. puede causar suficientes trastornos en el balance genético (Kao, loc cit.).

Como anteriormente se ha dicho muchas variantes fenotípicas descritas para una cierta variedad en sistema de cultivo puede ser causado por alteraciones cromosómicas y en otras ocasiones el fenotipo de plantas regeneradas puede no siempre deberse a anomalías cromosómicas sino a factores medioambientales (Phillips y Wang, 1984).

Existen razones para inducir poliploidias en cultivos celulares, por ejemplo si uno esta interesado en la regulaci3n de un gen y en metabolitos secundarios, las c3lulas poliploides pueden ofrecer algunas ventajas; un ejemplo es la inducci3n de clones tetraploides de Phlox drummondii Hook donde la actividad de la deshidrogenasa alc3hlica fue aproximadamente dos veces mas alta que en c3lulas diploides y s3lo en estos clones se encontraron flavonoides los cuales en c3lulas diploides no estan presentes, adem3s que se demuestra que la inducci3n de poliploides puede romper o cambiar los mecanismos de regulaci3n asociados con la expresi3n de genes (Griesbach, 1987).

### II.3 Caracteristicas Generales de Pisum sativum L. cv Century

#### II.3.1 Clasificaci3n (Cronquist, 1981)

Divisi3n	Magnoliophyta
Clase	Magnoliopsida
Subclase	Rosidae
Orden	Fabales
Familia	Fabaceae
G3nero	<u>Pisum</u>
Especie	<u>Pisum sativum</u> L

La subespecie con vainas comestibles es Pisum sativum L subsp. saccharatum, (Casseres, 1984)

#### Morfologia

Trepadora, anual glabra y glauca con zarcillos. Estipulas grandes y foliosas (usualmente tan grandes como los foliolos). Foliolos ovales uavadas, 2-3 pares, el foliolo terminal en zarcillo; con pocas flores sobre un ped3nculo axilar, blancas;

semillas globulares. El chicharo se encuentra en muchos lugares por lo cual ha recibido varios nombres. Hay dos tipos principales de cultivares, aquellos que crecen por la semilla y aquellos que crecen por la vaina comestible (Bailey, 1950)

#### Origen

Nunca se ha definido el verdadero centro de origen de Pisum sativum L ya que desafortunadamente los fósiles consisten principalmente de semillas carbonizadas por lo que es más difícil fijar el tiempo de domesticación, pero se considera que fue de las primeras plantas cultivadas, algunos restos indican que ya se encontraba bien domesticado aproximadamente 6000 años A.C. a fines del Neolítico. Formas primitivas y silvestres fueron encontradas en una vasta región con sus centros en Oriente y Etiopía usados como hortalizas, incluyendo áreas de Asia Central, Abisinia y el Mediterráneo. La dispersión de Pisum sativum L por muchas partes del viejo continente no esta asociada con la distribución, migración, y actividad del hombre.

Mucha confusión e incertidumbre existe sobre el ancestro de Pisum sativum L. encontrandose mucha similitud con Pisum arvense L. y Pisum sativum L lo que sugiere muy probablemente se originaron, del mismo ancestro siendo el chicharo actual, un producto de procesos evolutivos. En contraste con el guisante moderno, las semillas de formas primitivas encontradas eran duras y amargas y eventualmente contenían sustancias tóxicas, por lo que el hombre evidentemente seleccionó y propagó mutantes con valor agrícola (Marx, 1977).

#### Métodos de propagación.

Básicamente es por semillas, con la densidad de siembra más

apropiada de 80 kilogramos de semilla por hectárea (Casseres, loc cit)

Importancia Económica.

La producción de Pisum sativum L se destina principalmente para el consumo fresco, frecuentemente en ensaladas y cremas, las hojas, el tallo o la planta completa constituyen un alimento excelente para el ganado como forraje verde o seco. La fisiología de Pisum sativum L está determinada en gran medida por el factor genético (el patrón de ramificación es de interés considerable cuando esto es utilizado para la interpretación de algunos resultados especialmente a los concernientes a mutaciones) y depende la forma y el desarrollo de la planta sólo hasta cierto punto de las condiciones ambientales, como la sequía y temperaturas altas que inducen una maduración temprana (Pearson, 1981) Es propio de climas frescos, pero sin demasiada lluvia.

El problema que se tiene al cultivar Pisum sativum L es que se utilizan para la siembra variedades de baja calidad cuyo grano, se vuelve rápidamente almidonado o duro. Esta es una hortaliza que puede mejorarse mucho, mediante la introducción de mejores cultivares y la adopción de mejores prácticas de cultivo y cosecha; la mayoría de los países para obtener alta calidad dependen de semillas importadas, sin embargo el alto costo de la semilla limita la expansión de siembras en América latina.

Se considera una hortaliza fina y en algunos países es más fácil obtener el chicharo de alta calidad enlatado que fresco, es un artículo de bastante consumo pero por su precio se clasifica

en algunos lugares como un alimento para personas de alto nivel económico. Sin embargo podría ser un artículo de consumo de mucha gente como producto recién cosechado, con la introducción de cultivares de alta calidad y con el mejoramiento de los sistemas de cosecha, enlatado, transporte y comercialización (Casseres, loc cit.).

### 11.3.2 Cariotipo

El número cromosómico de Pisum sativum L.  $2n=14$ , fué reportado por Canon en 1903 y confirmado por Nemec y Strasburger en 1904 y 1907, la existencia de satélites en el cariotipo fue reportada en años posteriores con algunos resultados interesantes que indicaron la presencia de estos sobre el brazo corto de uno de los cromosomas (Sansome, 1932). Sin embargo esto no fue confirmado en forma convincente por otros investigadores, esto probablemente sólo demostró la falta de trabajo sistemático en este campo. En artículos posteriores se reportan satélites pero estos se muestran en los brazos mas largos (Blixt, 1972).

La línea 110 fue propuesta como la línea-tipo y representante del cariotipo normal de Pisum sativum L. , (Blixt b, 1958) propone la siguiente clave para identificar cada uno de los cromosomas.

#### A Cromosomas con satélite (sobre brazo largo)

I Satélite grande relación de brazos 2.2, longitud % 7.6 VI

II Satélite corto relación de brazos 1.9, longitud % 7.1 IV

#### B Cromosomas sin satélite.

I Constricción marcadamente subterminal, relación

de brazos 2.8, longitud % 7.0 VII

- IIa Constricción media-submedia (cromosoma mas corto)
- + Cromosoma con la constricción no exactamente a la mitad, relación de brazos 1.2 a veces muestra una constricción secundaria III
  - ++ Cromosoma corto con la constricción media, relación de brazos menos 1.1 longitud % 6.0 II
- IIb Constricción submedia, relación de brazos 1.5-1.7
- + Cromosoma el mas grande longitud % 8.6 relación de brazos 1.5 I
  - ++ Cromosoma corto, longitud % 7.0 relación de brazos 1.7 V

### II.3.3. Estabilidad genética en Pisum sativum L

Las características mutantes de tipo Mendeliano, se deben a pequeñas modificaciones en los cromosomas y al igual que en otros organismos, Pisum sativum L presenta variaciones genotípicas, tanto naturales como inducidas: sobre las mutaciones espontaneas podemos afirmar que la existencia de diferentes tipos de radiaciones en la naturaleza es una causa o factor que interactúa con el ADN de la célula. Existen además 2 causas relacionadas, con la variabilidad, que son intrínsecas del organismo y que afectan la tasa de mutaciones en Pisum, una es la heterocigosidad genética observada en una gran cantidad de material y que es considerablemente alta en F1 de cruza que en líneas puras (Lamprecht, 1939 citado por Blixt, 1972).

El otro factor es la edad de las semillas donde la tasa de aberraciones en semillas viejas fue de 10-12 % y alrededor del 1-

3 % de puentes (D'Amato, 1951 citado en Blixt, 1972).

Entre los agentes que inducen aberraciones cromosómicas en chicharo se encuentran las radiaciones y en especial las ionizantes. Presentan un efecto directo y modifican las condiciones metabólicas durante y después de la radiación.

Una gran diversidad de acción en daño cromosómico de los agentes químicos se ha encontrado, ya que algunos químicos rompen cromosomas sin inducir mutaciones otros inducen mutaciones sin romper cromosomas, mientras que algunos hacen ambas cosas y otros rompen preferentemente en regiones heterocromáticas.

Específicamente en cultivo de tejidos de Pisum sativum L se observó que durante la formación de callo a partir de raíz ocurrió un doblamiento cromosómico, originando núcleos poliploides en presencia de extracto de levadura en el medio (Torrey, 1958) además de la levadura, la cinetina se reporta como un disparador de mitosis en células vegetales maduras que han sufrido duplicación endomitótica (Torrey, 1961) sin embargo plantas completas que se formaron a partir de hojas maduras e inmaduras por vía organogénica (con formación de callo marcadamente escasa) contiene el número diploide normal y sólo se encontró una variación en la frecuencia de regeneración de brotes y yemas (Rubluo y Kartha, 1984).

### III. OBJETIVOS.

El objetivo planteado para el presente trabajo, fue el análisis de la estabilidad cromosómica de chícharo (Pisum sativum L.) en meristemas radiculares de semillas derivadas de plantas obtenidas por cultivo in vitro (a partir de hojas inmaduras) así como en la generación posterior obtenida por semilla. Para el logro de este objetivo se analizaron las alteraciones cromosómicas en anafase (fragmentos, puentes, cromosomas retardados y anafases multipolares) además, se obtuvo el cariotipo tanto de las plantas derivadas de cultivo in vitro como de testigos, considerando su fórmula cariotípica, número fundamental, relación de brazos y longitudes porcentuales de cada tipo de cromosoma. .

#### IV MATERIALES Y METODOS

##### IV.1 Material Biológico.

Para la realización de este trabajo se utilizaron 5 lotes de semillas:

i) El primer lote fue de semillas de *Pisum sativum* L. var. Early utilizada para realizar ensayos preliminares y mejorar la técnica, así como tratar de encontrar el número adecuado de la muestra que fuera representativo y mínimo, ya que el material de interés era escaso y en trabajos similares anteriormente reportados, el tamaño de la muestra eran muy grande o muy pequeña (Blixt b, 1958; Kallak et al., 1978; Rubluo et al., 1978; Rubluo y Kartha, 1984).

ii) Los cuatro lotes restantes de la variedad Century objeto de este estudio fueron proporcionados por el Dr. Abraham Rubluo Islas; 2 de los lotes fueron controles (Ct1 y Ct2) y 2 de semillas obtenidas de plantas regeneradas por técnica de cultivo de tejidos (Rt1 y Rt2) (Rubluo y Kartha, 1984) ver figura 1.

Cada uno de los lotes de semilla (Ct1, Ct2, Rt1 y Rt2) se analizaron en 2 aspectos a) Elaboración y comparación de sus cariotipos en metafase y b) alteraciones cromosómicas encontradas en anafase.

Para el 1er aspecto se utilizaron 20 semillas por cada lote realizando una preparación permanente por cada semilla, seleccionando 10 de las mejores, tomando un campo de cada una de ellas.

Para el 2o análisis se utilizaron 12 semillas de cada

lote, pero se encontró que 11 individuos por lote era un número adecuado.

Las semillas a germinar se colocaron en frascos que contenían una capa de algodón humedecido con agua destilada. Se incubaron en obscuridad y temperatura ambiente debido a que el fotoperíodo en plantas influye en el número de divisiones celulares por lo que se recomienda que los cortes de los meristemas radiculares se realicen en las primeras horas de la mañana y a temperaturas no demasiado bajas (Gimenez et al., 1977). Una vez que las semillas germinaron y se observaron las raíces primarias se cortaron aquellas que tuvieran una longitud de 2-2.5 cms. (Street, 1977)

#### IV.2 Preparación del Material.

El material que se utiliza en estudios Citológicos es generalmente zonas meristemáticas, en el caso particular fueron meristemas radiculares. Es de suma importancia realizar un tratamiento adecuado para obtener una mayor y precisa información de dicho material. El tratamiento para cariotipo consiste básicamente en 5 pasos: Un pretratamiento, periodo de fijación, hidrólisis, tinción y aplastamiento; los cuales todos son importantes y cada uno tiene una función específica, por lo que su conocimiento, prueba y práctica de cada uno es esencial. En la realización de las preparaciones para aberraciones el primer paso no se incluye pues en este caso la fase en la división celular que se requiere es la anafase y no la metafase. (García, 1972; Street, 1977).

Para la realización de este trabajo se utilizó primero una solución de 8-hidroxiquinoleína a una molaridad de .002 como lo

reporta Blixt (1958a) para detener las células en metafase; sin embargo para mejorar esta técnica se encontró que es el P-diclorobenceno a una solución saturada es el que mejor actúa, (Berlyn y Miksche, 1976) ambos se emplearon en la oscuridad y con una temperatura de -4 C, con el tiempo optimo de 6h.

El siguiente paso fue la fijación y el fijador utilizado fue el de Farmer (alcohol etílico: ácido acético glacial 3:1) (Ashmore y Gould, 1981) llamado también de Carnoy por algunos autores (Torrey, 1961; Street, loc cit.) durante 24 horas mínimo, aunque el material fijado puede ser almacenado en solución fijadora y mantenido en refrigeración por algún tiempo.

Después de lavadas las raíces se pasaron a un tubo vial que contenía HCl 1N precalentado en una incubadora a 60 C, el periodo óptimo de hidrólisis encontrado para este material fue 10 minutos. Posteriormente el ácido fue eliminado y las raíces se introdujeron en una solución de Feulgen hecha a base de fucsina básica, según la fórmula de García (loc cit.) por 2 horas. El reactivo de Schiff para la técnica de Feulgen es uno de los colorantes específicos para cromosomas, ya que actúa solamente sobre el ADN. (Phillips, 1984).

Cada segmento de raíz fue transferido a un portaobjetos cortando y dejando únicamente la zona meristemática teñida con una gota de aceto-orceína al 2 %, colocando sobre este el cubreobjetos para hacer el squash (aplastamiento) con la punta de unas pinzas de relojero golpeando suavemente el cubreobjetos con movimientos circulares y posteriormente con la goma de un lápiz se presiona fuertemente la preparación de esta manera el

aplastamiento.

Para hacer las preparaciones permanentes, se colocaron sobre hielo seco hasta que se congelaron, posteriormente se desprendió el cubreobjetos con un bisturí y se deshidrataron con dos cambios rápidos de etanol absoluto, se secó el exceso de alcohol y se montaron en bálsamo de Canadá ya secas las preparaciones se observaron al microscopio óptico, recorriendo todo el campo y seleccionando las mejores células en metafase en donde se podían contar los cromosomas sin estar encimados unos con otros, donde la pared celular estuviera completa y se observara su morfología con detalle.

#### IV.3. Cariotipos.

De cada preparación se fotografió la mejor célula en metafase por preparación, a partir de las fotografías se elaboraron los cariotipos de la siguiente manera: a los cromosomas se les tomaron tres medidas, que fueron longitud total, longitud del brazo largo y longitud del brazo corto; realizando las mediciones sobre las fotografías en base a esto y a la posición del centrómero los cromosomas fueron ordenados e identificados por parejas de homólogos, la localización de el centrómero puede ser expresado como una diferencia entre las longitudes de los brazos, la cual se conoce como relación de brazos o el índice centromérico (Levan et al., 1964).

El índice centromérico (IC) y la relación de brazos (R) se determinaron de acuerdo a las siguientes formulas:

$$IC = \frac{P}{P+Q} (100)$$

$$R = \frac{Q}{P}$$

donde:

P = longitud del brazo corto

Q = longitud del brazo largo

Ya identificados los pares de cromosomas se calculó la longitud relativa porcentual (LR%) de cada par cromosómico. Tanto a la longitud relativa porcentual como a la relación de brazos se les calculó la Media y el Error Estandar y con estos valores se encontró los límites de confianza para la Media Poblacional (M) de ambos basandose en la distribución de Student (t) y posteriormente con estos resultados se hizo la comparación entre los cuatro lotes existentes, aplicando el procedimiento estadístico de Diferencia Mínima Significativa (Snedecor y Cochran, 1981).

#### IV.4. Cuantificación de Aberraciones

Ya secas y seleccionadas las preparaciones de cada lote las cuales se hicieron con el metodo antes mencionado se observaron al microscopio, recorriendo toda la preparacion.

El análisis se realizó en células en anafase (ya que generalmete se observan los cromosomas en las etapas de metafase y/o anafase más contraídos e identificables) y encontrando el porcentaje de alteraciones cromosómicas en cada preparación; las alteraciones observadas fueron: fragmentos, puentes, cromosomas retardados y Anafases multipolares; obteniendo un promedio de anormalidades cromosómicas de cada lote, comparando estos promedios y evaluando estadísticamente las diferencias entre los cuatro lotes (CT1, CT2, RT1 y RT2).

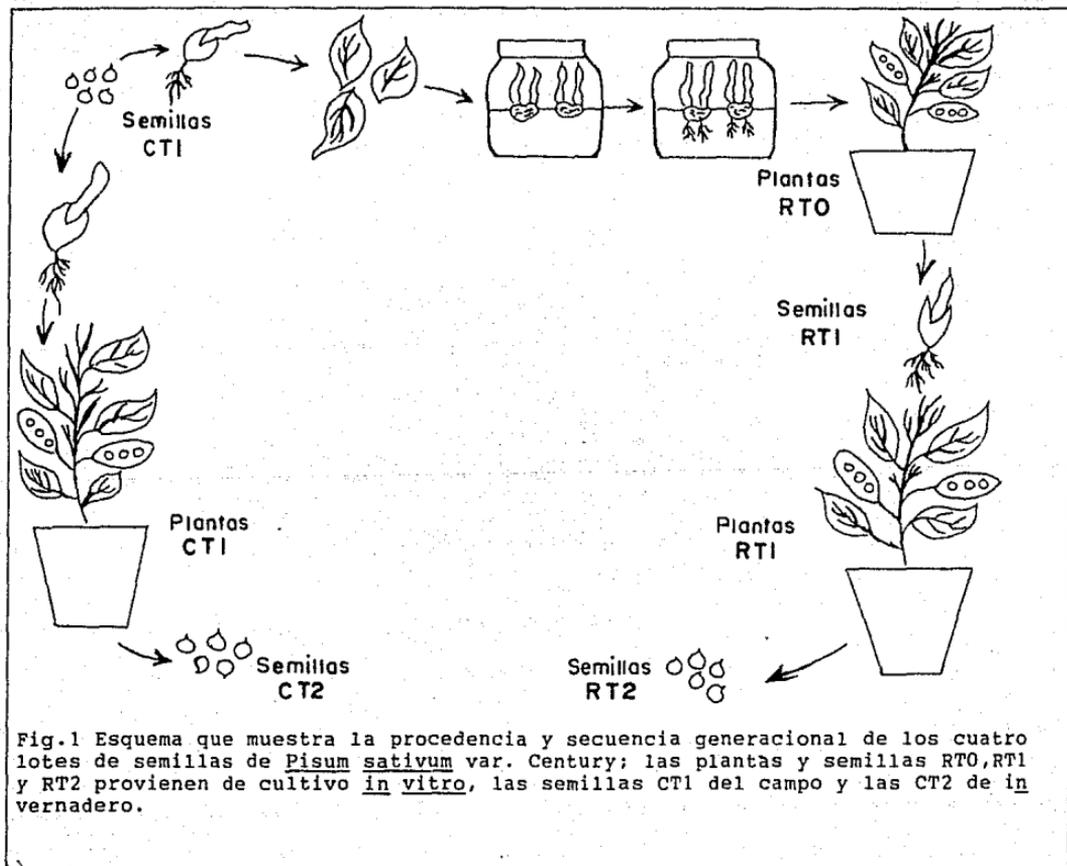


Fig.1 Esquema que muestra la procedencia y secuencia generacional de los cuatro lotes de semillas de *Pisum sativum* var. Century; las plantas y semillas RTO, RT1 y RT2 provienen de cultivo *in vitro*, las semillas CT1 del campo y las CT2 de *in vernalero*.

## V. RESULTADOS Y DISCUSION

RESULTADOS PRELIMINARES. Las tablas 1 y 2 corresponden a la primera parte del experimento, la cual tuvo como propósito establecer las mejores condiciones para asegurar buenos resultados tanto de forma.

La tabla 1 muestra las diferentes respuestas que dan dos mitostáticos en la obtención de cromosomas metafásicos con una contracción adecuada. Para la realización de este trabajo se utilizó primero una solución de 8-hidroxiquinoleina, a una molaridad de 0.002 como lo reporta Blixt (1958); sin embargo en la búsqueda de mejorar esta técnica se encontró que algunos agentes químicos presentan una contracción más homogénea reflejándose en la desviación estandar de las muestras, siendo el p-diclorobenceno el que mejor actúa (Berlyn, et al., 1976). En este trabajo el que mostró mejores resultados es también el p-diclorobenceno ya que con esta sustancia se obtuvo mayor número de campos adecuados, diez en tan sólo tres preparaciones contra veintuno en veintitrés preparaciones con la solución de 8-hidroxiquinoleina, corroborando lo encontrado en la bibliografía. Además se observó que al prolongar el tiempo de pretratamiento para estos dos mitostáticos la respuesta es diferente debido a que en el p-diclorobenceno es conveniente alargar a 6 horas el periodo de exposición y con 8-hidroxiquinoleina al prolongar el tiempo no se obtiene respuesta, esto se puede tomar en cuenta pues en estudios de plantas con cromosomas cortos se menciona que se requiere de pretratamientos breves (García, 1972).

Se utilizó el coeficiente de variación que se designa como C

en estadística porque es la medida que describe el monto de variación en una población y se puede juzgar parcialmente el éxito de un experimento simplemente observando  $\bar{C}$  debido a que en valores grandes podría pensarse si se ha cometido algún error en los cálculos o bien si alguna circunstancia rara arroja cierta duda sobre la validez del experimento y al tratar de descubrir la causa y reducir  $\bar{C}$  se puede mejorar en precisión.

En la tabla 2 se observan los valores de coeficiente de variación en la longitud relativa porcentual de la variedad century utilizada en la obtención de plantas por medio de la técnica de cultivo de tejidos vegetales y la variedad early empleada para probar la técnica de cariotipo, pero además se muestran los valores reportados por Blixt (1958) para el cariotipo patrón de *Pisum sativum* en el cual con 18 preparaciones obtuvo 75 campos adecuados siendo este número el tamaño de la muestra; en esta tabla 2 se ve que el tamaño de la muestra es independiente de los valores que presenta puesto que son muy heterogéneos ya que como se observa en cada uno de los siete cromosomas, si bien con un tamaño de muestra de 10 campos adecuados los coeficientes son los más grandes también en cinco cromosomas (II, III, IV, VI y V de los lotes CT1 y RT1) con ese tamaño de muestra los valores resultan ser los más pequeños y solo los cromosomas VII y I son menores con un tamaño de muestra de 25 campos adecuados que corresponden a la variedad early.

Considerando que para eliminar esos casos extremos se podría incrementar el tamaño de la muestra, sin embargo se consideró que la elaboración de un doble trabajo y utilización de material no

se compensa con la disminución del coeficiente y precisión del experimento, aunque esto es relativo y para otros trabajos y personas esto se podría realizar, una posible razón de la diferencia en los valores de las variedades early y century es debido a diferencias en el pretratamiento, a la práctica y el cuidado con que se realicen las preparaciones pues la clase de colorante depende de sus disolventes y puede engrosar o encoger al cromosoma, más que el número de individuos que se utilicen en el trabajo (Jackson, 1971).

**CARIOTIPO.** En las tablas 3 y 4 en las que se reportan los valores para la relación de brazos y la longitud relativa porcentual no sólo están registrados los resultados para las muestras que se hicieron, sino que en base a la distribución t estos resultados muestran con un 95% de confianza los valores que se esperarían en la población total de semillas. En estas tablas tomando en cuenta su  $\pm t(sx)$  se puede observar a simple vista si los valores entre lotes son diferentes, pero las diferencias que podrían existir se observan si son significativas en las tablas 5 y 6 que corresponden ya al análisis de las tablas 3 y 4 y muestran los valores numéricos de las diferencias y marcan cuáles de estas diferencias fueron significativas.

La utilización de  $\pm t(sx)$  no sólo sirvió para dar los valores de la Media Poblacional de cada lote sino que además este valor es mucho menor que el de la simple desviación estándar reduciendo así el rango que tuviera cada lote y por tanto la aplicación del tratamiento de la diferencia es más preciso.

Observando la tabla 3 podemos decir que la longitud relativa porcentual es muy parecida para todos los lotes y por tanto las

plantas que nos interesan RT1 y RT2 son semejantes a sus controles y si observamos la tabla 5 sólo en una ocasión es la diferencia significativa, pero se podría considerar que esto es natural ya que si bien existe una diferencia en el cromosoma VII entre las plantas regeneradas RT1 y RT2 también eso ocurre entre los controles en el cromosoma IV.

En las tablas 4 y 6 en la Relación de Brazos esta variable considerada es más precisa en la detección de algunas modificaciones y se puede ver que a diferencia de la tabla 5 que sólo muestra en dos ocasiones la marca \*, en la tabla 6 se muestra en siete ocasiones

Analizando con detenimiento la tabla 6 se observa que las preparaciones de RT1 que son las que más nos interesan por ser la primera generación obtenida *in vitro* muestran una diferencia bastante significativa en comparación con los dos controles y aún a su F1 para el cromosoma VII y para el cromosoma IV solo con los lotes RT2 y CT1; la diferencia consiste en una pequeña reducción en el valor de la relación de brazos (tabla 4) para ambos cromosomas, haciendo que la posición se más media, la causa más probable de este cambio en su morfología es que haya ocurrido una mutación de tipo Traslación recíproca desigual o inversión pericéntrica pues el comportamiento citológico en las células somáticas que han sufrido estas variaciones se caracterizan en la formación de puentes anafásicos (Lacadaena, 1981) así como una modificación en la longitud del cromosoma afectado coincidiendo este último aspecto con lo observado en la tabla 3 donde estos mismos cromosomas muestran una reducción en sus valores

comparándolos con los lotes CT1, CT2, y RT2 siendo la diferencia significativa (tabla 5); pudiendo atribuirse en primera instancia esta diferencia significativa a su origen *in vitro* sin embargo en general y para el resto de los cinco tipos de cromosomas restantes se puede decir que su cariotipo es semejante a sus controles e incluso en estas tablas se observa que entre los controles también ocurre lo mismo y por tanto se confirma que algunas modificaciones pueden ocurrir en la naturaleza sin pasar por un sistema artificial de propagación. Es muy común observar diferencias en la longitud cromosómica entre cromosomas metafásicos en células meristemáticas de raíz causadas por diferencias en la penetración de las sustancias fijadoras ó hidrolizantes. (Jackson, loc cit.).

Sólo en las plantas de la segunda generación denominadas RT2 se encontró una diferencia significativa entre el segundo control CT2 en los cromosomas V y VI (tabla 6).

Además en la tabla 4 observando la parte  $\pm t(sx)$  de los valores para los siete pares de cromosomas, se comprueba lo reportado por Levan (1964) donde él afirma que existe menos variación de contracción de los brazos en los cromosomas que presentan la posición del centrómero en la región média (II, III, I) a diferencia de los que presentan el centrómero en la región submedia (V, IV, VI) y más aún a lo observado en el cromosoma VII en el cual la posición del centrómero es en la región terminal; esta reducción en la contracción se ve reflejada en la disminución de  $t(sx)$  que es análogo al valor estadístico de desviación estandar, presentando esta conducta en los cuatro lotes sin importar su procedencia.

La figura 2 muestra los cromosomas de Pisum sativum L. var. century en la que se observa que su número cromosómico es  $2n=14$  y su fórmula cariotípica  $2m+4sm+1st$  donde  $m$ = metacéntrico (cromosoma I y III),  $sm$ = submetacéntrico (I, IV, V y VI) y  $st$ =subtelocéntrico (cromosoma VII) y dentro de los 4 pares de cromosomas  $sm$  dos de ellos (IV y VI) muestran satélites en sus brazos largos, en el cromosoma IV la constricción secundaria y por tanto el satélite fue débilmente desarrollado; en algunos organismos la constricción secundaria puede ser trasladada al centrómero a través de inversiones o traslocaciones, por lo que esta no puede ser fácilmente reconocida (Jackson, loc cit.).

Aunque la variedad early sólo se utilizó para probar la técnica de cariotipo es importante mencionar que en varias de las preparaciones se observan satélites en el brazo corto del cromosoma III figura 3 letra c mientras que en la variedad century no se observa esta constricción secundaria, reportado en (Pellew y Sansome, 1932) y que no fue confirmado por otros investigadores como Krajevoj en 1935 y Koller en 1938 (Blixt, 1972).

La causa de esta diferencia no es que sean de diferentes variedades sino que esta constricción no siempre es visible en las preparaciones, dependiendo de las técnicas para cariotipo empleadas, por ejemplo con bromoxiquinoleína es raramente observada (Blixt, 1958 b) mientras que la sustancia 5,7-dibromo 8-hidroxiquinoleína tiene efectos superiores por lo que en estas circunstancias sí se observan los satélites (Blixt, 1972) confirmando la importancia del conocimiento de las sustancias

mitostáticos empleadas en el tratamiento de las preparaciones.

**NIVELES DE POLIPLOIDIA.** Al revisar las preparaciones tanto para cariotipo como para aberraciones no se observaron células poliploides en los lotes CT1, CT2 y RT2; solo en RT1 en preparaciones para cariotipo, cinco de ellas presentaron una o dos células poliploides, pero considerando que se observaron completamente todas las preparaciones y el número de células totales es muy grande no se puede decir que el tejido presenta duplicaciones en el número cromosómico. La importancia que tienen

los análisis de variación numérica es que fueron los primeros estudios que se realizaron y más específicamente en los sistemas clásicos de zanahoria y tabaco pero que posteriormente viendo sus limitaciones, los estudios se enfocaron más a los cambios estructurales y pérdida de material genético y aún en estas fechas el mejor análisis ha sido realizado con microscopio de luz (Lee et al., 1988), siendo necesario disponer de una amplia batería de técnicas genéticas las cuales podrían ser usadas para realizar una mejor evaluación de la variación somaclonal

Las tablas 7, 8, 9 y 10 muestra los porcentajes de alteraciones cromosómicas de cada uno de los lotes (CT1, CT2, RT1 y RT2) en todas sus preparaciones, en estas tablas se observa que hay diversidad en los resultados y en ocasiones se alejan de los promedios pero al aplicar los sistemas estadísticos esto queda contemplado y ajustado, además estos valores se utilizaron posteriormente para calcular  $S \chi^2$  en cada porcentaje de alteraciones para encontrar así los valores de la diferencia (tabla 12) la cual nos ayudó a ver si esta diferencia es debida

al azar y se encuentran en las mismas condiciones o no.

La tabla 11 muestra en forma global y rápida la situación en las 4 tablas anteriores y de cada anomalía cromosómica como aberraciones (fragmentos y puentes) y anafases multipolares se ilustran ejemplos en las figuras 4 a-f; en general se presentó una alteración por anafase, pero en ocasiones hubo más de una (4 c, d). En esta tabla se puede observar que el lote que presenta mayor número de células en anafase es el de semillas provenientes de cultivo in vitro segunda generación RT2 con un valor de 2776 anafases encontradas, mientras que el que tuvo el valor inferior fue el control CT1, en esta tabla también, se observa que el número de células en división representado por el número de anafases está asociado a como se lleva a cabo la división celular, pues una causa que provoca la disminución de la frecuencia de divisiones celulares es la producción de alteraciones cromosómicas ya que estas causan la muerte celular (Davidson, 1959; Wu y Grant, 1966; 1967; George et al., 1970 citados en Baiza, 1980) y CT1 presenta el mayor porcentaje de anafases anormales siendo también el que presenta menor número de células en esta fase de división celular.

En los cuatro lotes el porcentaje de fragmentos es más elevado que el porcentaje de puentes y en las figuras 4 a-c se muestran diferentes células con este tipo de aberración; una característica que se encontró y se muestra en la figura 4c es que los satélites son la región más sensible para que ocurra un rompimiento en el cromosoma; una explicación fue hecha en estudios realizados con las especies vegetales Crepis capillaris L. y Zea mays L. donde se sugiere que existen regiones o puntos

de rompimiento específicos en los cromosomas, particularmente regiones que contengan heterocromatina como son los satélites que contienen la región del organizador nucleolar (NOR) y el centrómero donde ocurren preferentemente traslocaciones recíprocas e inversiones originados posiblemente por una perturbación en la sincronización entre la replicación cromosómica durante la fase S y la división celular, pues las regiones heterocromáticas replican más tarde que los segmentos eucromáticos y puede ser vulnerable su integridad a fluctuaciones en el ciclo celular (Lee y Phillips 1988). Al ver los porcentajes de anafases anormales y aberraciones en CT1 se pensaría que las plantas regeneradas *in vitro* ofrecen más estabilidad cromosómica; pero revisando bibliografía se encontró que *Pisum sativum* presenta el problema de que las semillas con el tiempo van teniendo porcentajes elevados de aberraciones llegando a tener un nivel de 10-12 % para fragmentos y 1-3 % de puentes, valores que son muy parecidos a los obtenidos en este trabajo el cual fue muy elevado pues fue de 15.49 % en fragmentos para CT1 y corroborándose o haciéndose patente en la tabla 12 donde se compara este valor con los demás lotes, la diferencia es significativa; por este motivo *Pisum sativum* no es muy recomendable para estudios citogenéticos (D'Amato, 1951 citado en Blixt, 1972).

Las aberraciones (fragmentos y puentes) se clasifican en tres tipos: subcromatídicas, cromatídicas y cromosómicas, dependiendo en que etapa del ciclo celular ocurre el daño en el ADN; las aberraciones subcromatídicas se producen cuando el daño

ocurre durante la profase y su sustrato es la media cromátida, las aberraciones cromatídicas se producen en células en S y G2 teniendo como unidad de ruptura la cromátida y las aberraciones cromosómicas se forman cuando el cromosoma es la unidad y esto sucede en células en G1.

En las figuras 4 a, d se muestran las aberraciones de tipo cromatídico pues en estas únicamente hay un fragmento o puente por cada célula, mientras que las figuras 4 b, e son aberraciones de tipo cromosómico y en cada célula hay dos fragmentos o puentes dependiendo del caso (Evans, 1976).

Los porcentajes de cromosomas retardados y anafases multipolares para RT2 y CT1 en la tabla 11 presentan valores muy elevados por lo que podemos decir que este tipo de anomalías no están relacionadas con el factor tiempo o edad de las semillas.

Las causas más probables de la aparición de cromosomas retardados y anafases multipolares (figuras 4 c, f) fueron posiblemente daños al centriolo o al huso acromático más que daño al centrómero pues si hubiera sido esta última causa no se presentaría el caso de que en los lotes donde el porcentaje de cromosomas retardados es mayor coincide con los porcentajes de anafases multipolares igualmente grandes; dicho huso está constituido por microtúbulos, que son el resultado de la polimerización lineal de las moléculas de tubulina, unidas mediante enlaces -S-S- (disulfuro); las alteraciones en la formación y funcionamiento del huso puede traer como consecuencia la producción de anafases multipolares, integrándose más de los dos grupos normales de cromosomas, que en telofase se presentan

como núcleos separados, los cuales pueden ser divididos por paredes celulares individuales, produciéndose células con números menores de  $2n$  (Baiza, 1980).

La tabla 12 marca los valores de las diferencias entre los cuatro lotes para los diferentes porcentajes de anomalías cromosómicas que corresponden a la parte llamada Inferencia Estadística y se observa que el lote CT1 se encuentra muy significativamente diferente genéticamente con respecto a los lotes RT1, RT2 y CT2, los fragmentos son el tipo de anomalías más encontrados en CT1 siendo significativamente la diferencia con lo encontrado para los tres lotes restantes considerando este lote de semillas más inestable.

Entre los controles CT1 y CT2 también se encuentran diferencias en el porcentaje de anafases anormales (producidas por la aparición de fragmentos que se ven reflejados en el porcentaje de aberraciones) siendo que provienen o tienen el mismo origen *in vivo* las condiciones son diferente, que no son solo de condiciones en su formación sino del tiempo que tenían las semillas.

En los resultados de anafases multipolares se observa que en las plantas regeneradas *in vitro* RT1 su valor es muy pequeño (tabla 11) siendo la diferencia muy significativa con respecto a las semillas CT1 y RT2 lo que indica que la multipolaridad no depende de la edad de la semilla.

Para los lotes RT1, RT2 y CT2 la diferencia entre lo encontrado en cada uno de ellos con respecto a las alteraciones no es significativa por lo que se puede decir que las semillas

están en las mismas condiciones en su material genético.

Considerando esto la técnica de cultivos de tejidos vegetales ofrece muchas ventajas, en este caso permitió no tener variaciones genéticas considerables, sin embargo puede constituir una forma de incrementar la variabilidad genética y esto en fitomejoramiento resulta valioso, además se ofrece como una vía de producción de plantas, al realizar clonaciones por ejemplo de variedades mejoradas ó bien con su material genético original. Los estudios citogenéticos como el presente deben estimularse y realizarse como una medida para evaluar las características de las plantas regeneradas *in vitro* ya que al igual que en todos los vegetales en *Pisum sativum* su fisiología, la forma y el desarrollo están determinados por el factor genético en combinación con las condiciones ambientales (Pearson, 1981).

En particular en nuestro caso se puede decir que no hubo variaciones considerables en las plantas regeneradas *in vitro* (únicamente en la relación de brazos de RT1 y sólo en el cromosoma VII donde la diferencia fue significativa) y si el objetivo es el de mantener así el germoplasma, la obtención de plantas por vía organogénica con poca formación de callo es una buena opción; aunque esto no implica que las variaciones aquí detectadas aunque pequeñas no podrían afectar a la planta, pues hay una correspondencia paralela y parcial en los cambios del cariotipo y morfología (Jackson, loc cit.).

En forma general estos estudios nos mostraron las condiciones genéticas en las que se encontraron las plantas regeneradas *in vitro* pero se podría obtener mayor información de las condiciones si se acompaña de otro tipo de estudios

morfológicos, fisiológicos, fitoquímicos o de bandeó.

En callo es posible que ocurran cambios genéticos a lo largo de su desarrollo por lo que en ciertos puntos esta vía es limitada en uso; como Pinus taeda L. Loblolly P., Old-Field P. Frankincense P. donde los brotes meristemáticos que ocasionalmente se formaron sobre callo revelaron tener contenidos de DNA anormales siendo deletérea al pino estas condiciones (Renfroe, 1985). Pero si el objetivo es la generación de plantas, con variaciones nuevas el desarrollo de cultivos celulares seleccionados, a través de callo como una fuente para generar variabilidad genética, es una buena razón para su uso; como en callos de tabaco tolerantes a ciertos herbicidas que fueron seleccionados y regeneraron plantas las cuales mostraron una tolerancia genotípica aunque en menor grado (Swartzberg et al., 1985).

Es importante tomar en cuenta las condiciones físicas y los componentes del medio, especialmente hormonas y reguladores de crecimiento que modifican el contenido del ADN; como la auxina 2-4 D en callos de Allium sativum L. donde aparecieron poliploides probablemente provocó la síntesis ininterrumpida del ADN o de sus precursores. (Jaroslav, 1985), sin embargo en otros casos el material genético tiende a adaptarse y tiene la capacidad de responder, tales son los casos de cultivos en suspensión en dos especies de Nicotiana donde se observó que en su establecimiento y primeras etapas de desarrollo presentó porcentajes de variabilidad elevados a comparación de los cultivos más viejos

(Balzan, 1981) y en callos de Arabidopsis thaliana (L.) Heynh. inducidos de anteras primeramente originaron substancialmente aneuploidias y poliplodias pero en los brotes generados de estos callos manifestaron poca variabilidad en el número cromosómico y se lograron plantas normales (Keathley et al., 1983)

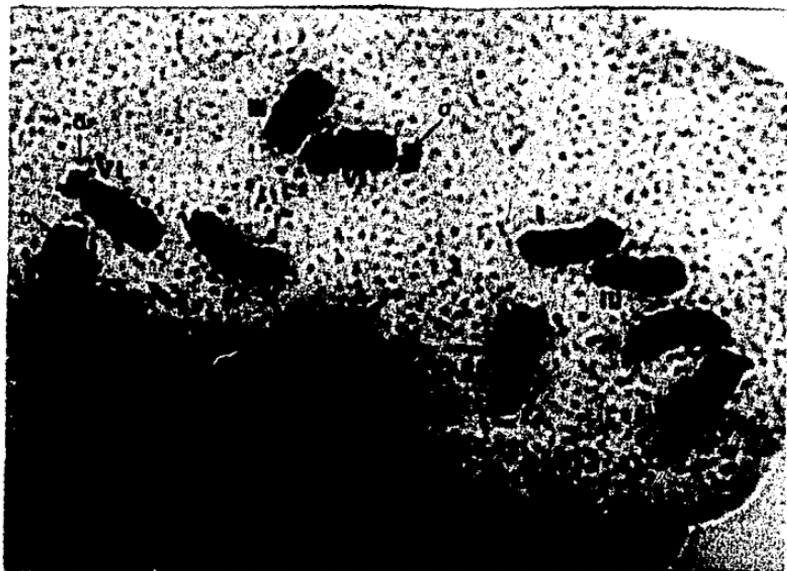


Fig.2 Célula somática en metafase de Pisum sativum variedad Century donde se observa el número cromosómico  $2n=14$ , cada cromosoma está identificado con un número romano el cual corresponde a lo establecido por Blixt (1958 b), las letras indican los cromosomas con satélite.



Fig.3 Célula somática en metafase de Pisum sativum variedad early donde se observa el número cromosómico  $2n=14$ , cada cromosoma esta identificado con número romano el cual corresponde a lo establecido por Blixt (1958 b) las letras indican los cromosomas con doble constricción.



Fig.4 Células en anafase de Pisum sativum. variedad century que muestra los diferentes tipos de alteraciones cromosómicas: a) fragmento sencillo , b) fragmento doble, c) anafase multipolar con fragmentos, mostrando los satélites como regiones sensibles, d) puente y fragmento sencillo, - e) puentes dobles, f) anafase multipolar.

labial. Respuesta en el número de metafases y calidad de contracción utilizando dos tipos de mitostáticos en meristemas radiculares de *Pisum sativum* L. var. Early a diferentes tiempos de exposición.

SUSTANCIA	# Preparaciones	Tiempo (h)	Campos adecuados
p-Diclorobenceno 0.002M	2	5	1
p-Diclorobenceno	3	6	10
8-Hidroxiquinoleína soluc. saturada	23	5	21
8-Hidroxiquinoleína	5	7	0

Tabla 2. Coeficiente de variación en los valores de longitud relativa -- porcentual para los siete pares de cromosomas en los cuatro lotes de semillas de *Pisum sativum* L. var. century (CT1, CT2, RT1 y RT2) así como de la variedad Early y la reportada por Blixt (1958) tomando en cuenta el tamaño de la muestra en los tres -- casos

Cromosoma	Early	CT1	CT2	RT1	RT2	Blixt
II	10.16	6.52	8.87	8.93	14.24	7.65
III	11.24	6.81	15.42	13.51	9.8	7.59
I	6.28	15.60	8.67	10.65	16.73	8.69
V	12.52	12.59	13.27	9.03	12.18	10.30
IV	8.57	7.25	8.76	11.79	10.53	8.64
VI	7.94	5.76	10.59	9.58	14.80	6.88
VII	6.43	6.44	13.3	6.48	10.17	9.8
tamaño de muestra	25	10	10	10	10	75

CT1= provenientes de campo, CT2= de invernadero, RT1= de plantas regeneradas in vitro primera generación, RT2= segunda generación.

Tabla 3. Valores de los límites de confianza de la media poblacional  $\bar{M}$  (basados en la distribución  $t$ ) de la longitud relativa porcentual en los siete cromosomas de *Pisum sativum* L. var. century en sus cuatro lotes de semillas -- (CT1, CT2, RT1 y RT2)

LOTES	CT1 $M = \bar{x} \pm t(sx)$	CT2 $M = \bar{x} \pm t(sx)$	RT1 $M = \bar{x} \pm t(sx)$	RT2 $M = \bar{x} \pm t(sx)$
CROMOSOMAS				
II	6.28 $\pm$ 0.19	6.42 $\pm$ 0.28	6.49 $\pm$ 0.27	6.53 $\pm$ 0.41
III	6.31 $\pm$ 0.20	6.68 $\pm$ 0.51	6.66 $\pm$ 0.42	6.57 $\pm$ 0.28
I	7.56 $\pm$ 0.55	7.38 $\pm$ 0.32	7.51 $\pm$ 0.38	7.35 $\pm$ 0.55
V	7.54 $\pm$ 0.45	7.16 $\pm$ 0.47	7.75 $\pm$ 0.38	7.27 $\pm$ 0.39
IV	7.58 $\pm$ 0.26	7.19 $\pm$ 0.31	7.38 $\pm$ 0.41	7.31 $\pm$ 0.34
VI	7.80 $\pm$ 0.21	7.65 $\pm$ 0.40	7.62 $\pm$ 0.34	7.50 $\pm$ 0.49
VII	7.29 $\pm$ 0.22	7.35 $\pm$ 0.49	7.10 $\pm$ 0.22	7.54 $\pm$ 0.34

CT1= provenientes de campo, CT2= de invernadero, RT1= de plantas regeneradas in vitro primera generación y RT2= segunda generación.

Tabla 4. Valores de los límites de confianza de la media poblacional  $\bar{M}$  (basados en la distribución  $t$ ) de la relación de brazos en los siete cromosomas de *Pisum sativum* L. var. century en sus cuatro lotes de semillas (CT1, CT2, RT1 y RT2)

LOTES	CT1 $\bar{M} = \bar{x} \pm t(sx)$	CT2 $\bar{M} = \bar{x} \pm t(sx)$	RT1 $\bar{M} = \bar{x} \pm t(sx)$	RT2 $\bar{M} = \bar{x} \pm t(sx)$
CROMOSOMAS				
II	1.08 $\pm$ 0.03	1.11 $\pm$ 0.04	1.08 $\pm$ 0.03	1.09 $\pm$ 0.04
III	1.19 $\pm$ 0.06	1.28 $\pm$ 0.06	1.22 $\pm$ 0.04	1.24 $\pm$ 0.06
I	1.55 $\pm$ 0.08	1.54 $\pm$ 0.10	1.49 $\pm$ 0.07	1.49 $\pm$ 0.09
V	1.08 $\pm$ 0.08	2.10 $\pm$ 0.15	1.77 $\pm$ 0.10	1.72 $\pm$ 0.08
IV	2.03 $\pm$ 0.07	1.81 $\pm$ 0.11	1.77 $\pm$ 0.09	1.96 $\pm$ 0.13
VI	2.36 $\pm$ 0.11	2.39 $\pm$ 0.17	2.19 $\pm$ 0.14	2.08 $\pm$ 0.14
VII	3.41 $\pm$ 0.31	3.38 $\pm$ 0.38	2.67 $\pm$ 0.25	3.26 $\pm$ 0.28

CT1= provenientes de campo, CT2= de invernadero, RT1= de plantas regeneradas in vitro primera generación y RT2= segunda generación.

Tabla 5. Resultados de las pruebas de diferencia comparando los valores de las medias poblacionales de la longitud relativa porcentual para los siete cromosomas de *Pisum sativum* L. var. century en sus cuatro lotes (C11, C12, -R11 y RT2):

Cromosomas	VII	II	III	I	V	IV	VI
CT1 & RT1	0.05	1.25	1.44	0.07	1.04	1.00	1.39
CT2 & RT2	1.04	0.45	-0.59	0.13	0.58	0.64	0.59
CT1 & RT2	1.47	0.27	1.31	0.53	1.24	1.35	1.50
CT2 & RT1	1.19	0.33	0.03	0.50	1.54	1.11	0.18
CT1 & C12	0.14	0.93	1.42	0.44	0.55	2.22*	0.63
RT1 & RT2	2.61*	0.45	0.60	0.57	2.50	0.35	0.60

CT1= provenientes de campo, C12= de invernadero, R11= de plantas regeneradas in vitro primera generación, RT2= segunda generación, &= comparando con y \* = diferencia significativa

Tabla 6. Resultados de las pruebas de diferencia comparando los valores de medias poblacionales de la relación de brazos para los siete cromosomas de *Pisum sativum* L. var. century en sus cuatro lotes (CT1, CT2, RT1 y RT2)

Cromosomas	VII	II	III	I	V	IV	VI
CT1 & RT1	4.00*	0	0.75	1.0	0.30	3.85*	1.70
CT2 & RT2	0.48	0.66	0.50	0.63	2.90*	1.50	2.21*
CT1 & RT2	0.77	0.33	0.63	0.75	1.00	0.89	2.80
CT2 & RT1	2.73*	1.00	1.50	0.71	2.00	0.44	1.43
CT1 & CT2	0.04	1.00	1.80	0.14	1.91	2.88	0.25
RT1 & RT2	2.95*	0.66	0.29	0	0.56	2.11*	0.92

CT1= provenientes de campo, CT2= de invernadero, RT1= de plantas regeneradas in vitro primera generación, RT2= segunda generación, &= comparando con y \*= diferencia significativa

Tabla 7. Porcentajes de alteraciones cromosómicas en anafase en plántulas de semillas de *Fisum sativum* var. centurvy provenientes de campo CII, encontradas en cada una de las preparaciones.

# Preparación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	promedio
Total de Anafases	137	99	41	93	113	83	149	195	214	44	103	
% de Anaf. Anormales	9.49	9.09	2.44	16.13	2.65	14.46	11.41	2.56	2.34	31.82	9.71	10.19
Fragmentos A	2.19	7.07	4.88	26.68	0.89	32.5	20.13	1.54	0.47	53.43	29.39	15.49
Puentes (senc.+dobl.) B	4.38	2.02	2.44	2.15	0.89	2.41	2.89	1.03	0.47	0.00	1.97	1.86
Aberraciones = A + B	6.57	9.09	7.32	29.03	1.78	34.91	22.82	2.57	0.94	53.43	31.36	17.35
Cromosomas Retardados	2.92	0.00	0.00	4.30	0.65	1.21	0.00	0.51	1.40	13.64	1.94	2.43
Anafases Multipolares	0.73	2.02	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	1.03	0.47	2.27	0.00	0.59

Tabla 8. Porcentajes de alteraciones cromosómicas en anafase en plántulas de semillas de *Fisica sativum* var. century provenientes de invernadero CI2, encontradas en cada una de las preparaciones.

Preparación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PROMEDIO
Total de Anafases	160	193	230	94	108	314	141	204	195	184	181	114	
% de Anaf. Anormales	10.00	6.22	2.17	2.13	4.63	4.46	4.96	4.90	5.13	1.63	4.44	3.51	4.52
Fraquentos A	16.87	2.07	0.87	1.06	0.92	6.05	2.64	2.45	1.03	0.00	3.87	2.63	3.39
Puentes(enc.+dobl.) B	0.00	2.07	1.30	1.06	1.85	1.59	0.71	0.98	2.05	0.00	0.55	0.00	1.01
Aberraciones = A + B	16.87	4.14	2.17	2.12	2.77	7.64	3.35	3.43	3.08	0.00	4.42	2.63	4.40
Cromosomas Retardados	2.5	0.52	0.00	0.00	0.92	1.9	0.00	2.45	1.54	1.63	0.55	0.00	1.21
Anafases Multipolares	1.25	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.71	0.00	0.00	0.00	1.11	0.00	0.26

Tabla 9. Porcentajes de alteraciones cromosómicas en anafase en plántulas de semillas de *Fisum sativum* var. century provenientes de plantas regeneradas in vitro primera generación (P1), encontradas en cada una de las preparaciones.

Preparación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	PROMEDIO
Total de Anafases	59	127	188	296	14	93	239	69	108	245	237	
% de Anaf. Anormales	0.00	1.58	9.57	2.41	28.57	11.83	4.18	11.59	7.41	4.08	4.22	7.77
Fraquetos A	0.00	2.36	10.11	3.10	28.57	1.08	5.02	1.45	4.63	0.41	4.22	5.54
Puentes (senc. + dobl.) B	0.00	0.00	2.13	1.03	14.29	7.53	1.26	7.25	0.93	0.82	1.27	3.32
Aberraciones = A + B	0.00	2.36	12.24	4.13	42.86	8.61	6.28	8.70	5.56	1.23	5.49	8.86
Cromosomas Retardados	0.00	0.79	3.19	1.03	0.00	3.23	0.00	2.50	1.65	2.86	0.00	1.44
Anafases Multipolares	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.00	0.42	0.00	0.00	0.00	0.00	0.04

Tabla 10. Porcentajes de alteraciones cromosómicas en anafase en plántulas de semillas de Pisum sativum var. centuria provenientes de plantas regeneradas in vitro segunda generación F12, encontradas en cada una de las preparaciones.

# Preparación	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	PRÓMEDIO
Total de Anafases	231	64	397	345	175	244	187	267	229	101	90	446	
% de Anaf. Anormales	5.63	7.81	2.52	2.61	4.57	2.87	1.60	10.11	7.42	5.94	6.67	2.47	5.02
Fraquentos A	3.46	14.06	0.00	1.74	0.57	3.28	2.14	10.11	3.06	9.90	3.33	2.01	4.47
Puentes (senc. + dobl.) B	1.30	0.00	0.00	0.29	1.14	0.00	0.53	1.87	1.75	0.00	11.11	0.45	1.54
Aberraciones = A + B	4.76	14.06	0.00	2.03	1.71	3.28	2.67	11.56	4.81	9.9	14.44	2.46	6.01
Cromosomas Retardados	1.30	4.69	1.01	1.16	2.29	1.64	0.00	7.25	3.06	0.00	6.67	1.12	2.10
Anafases Multipolares	0.43	1.56	0.00	0.00	0.57	0.41	0.53	1.50	0.67	0.00	1.11	0.22	0.60

Tabla 11. Valores promedio de los porcentajes de alteraciones cromosómicas en anafase de *Pisum sativum* var. century de sus cuatro lotes de semillas (C11, C12, R11 y R12).

LOTE	C11	C12	R11	R12
Total de Anafases	1276	2118	1660	2776
% Anafases Anormales	10.19	4.52	7.77	5.07
Fragmentos %	15.49	3.39	5.54	4.47
Puentes (Sencillos + Dobles) %	1.81	1.01	3.32	1.54
% Aberraciones (frag. + puen)	17.35	4.40	8.86	6.01
% Cromosomas Retardados	2.43	1.21	1.44	2.1
% Anafases Multipolares	0.59	0.26	0.04	0.6

C11= provenientes de campo, C12= de invernadero, R11= de plantas regeneradas in vitro primera generación y R12= segunda generación

Tabla 12. Resultados de las pruebas de diferencia comparando los porcentajes de alteraciones cromosómicas en anafase de *Pisum sativum* L. var. century entre sus cuatro lotes de semillas (CT1, CT2, R11 y R12)

Comparaciones DE	CT1 & R11	CT2 & R12	CT1 & R12	CT2 & R11	CT1 & CT2	R11 & R12
% Anafases Anormales	0.68	0.51	1.99	1.37	2.21*	1.15
% Fragmentos	2.19*	0.59	2.87*	0.80	3.14*	0.40
% puentes (senc. + dobl)	1.04	0.58	0.32	1.78	2.17	1.13
% Aberraciones	1.37	0.81	2.26*	1.23	2.61*	0.77
% Cromosomas Retardados	0.79	1.41	0.26	0.46	1.05	0.94
% Anafases Multipolares	2.12*	1.62	0.03	1.47	1.18	3.29*

CT1= provenientes de campo, CT2= de invernadero, R11= de plantas regeneradas in vitro primera generación, R12= segunda generación, &= comparando con y \*= diferencia significativa

## CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.

- No se encontraron variaciones en el cariotipo considerando su fórmula cariotípica, número fundamental, relación de brazos y longitud relativa porcentual en las semillas de *Pisum sativum* L. provenientes de la técnica de cultivo de tejidos vegetales a excepción de los cromosomas VII y IV en la relación de brazos.
- El cromosoma VII clasificado como subtelocéntrico es más sensible de modificar su morfología.
- En nuestro experimento se observó que los cambios estructurales como traslocaciones e inversiones pueden ser fuentes de variación más frecuente que los cambios en el número cromosómico.
- Los cambios estructurales producen aberraciones cromosómicas siendo en su mayoría fragmentos.
- Los porcentajes de aberraciones para las plantas regeneradas *in vitro* RT1 y RT2 fueron más bajos que en el control CT1, debido a que los factores físicos, químicos y biológicos que se establecieron en la regeneración al final no fueron causa de modificación del plasma germinal en la última fase que fue la obtención de plantas completas y sus generaciones posteriores.
- La edad de las semillas es un factor que afectó el porcentaje de la variabilidad cromosómica.
- En base a que uno de los controles presentaron los porcentajes más elevados de aberraciones se puede decir que la semilla como los cultivos de tejidos en general al paso del tiempo acumulan cambios genéticos por lo que debe explorarse cada vez más tejidos y métodos *in vitro* para que durante su cultivo cualquiera que

sea el objetivo, propagación y almacenamiento el material genético se mantenga estable, hasta ahora esta condición se cumple solo en meristemos.

- Se deben de realizar otros estudios genéticos ya que el estudio del contenido genético es importante pues permite manejar con más confianza , complejos problemas biológicos tales como la diferenciación celular, morfogénesis etc para poder disponer de métodos más eficaces para la selección de mutantes raros y combinados genéticos.

- Estos estudios citogenéticos se deben de realizar conjuntamente con estudios químicos y morfológicos de la planta, así como tratar de realizar la técnica de bandeo que muestra con mayor claridad la presencia de nuevos arreglos en el ADN.

## APENDICE I

### Preparación de las sustancias utilizadas.

#### I. Reactivo de Schiff:

Fucsina básica .....	0.1 gr.
Metabisulfito .....	2.0 gr.
Acido clorhídrico .....	0.2 ml.
Carbón activado .....	0.2 ml.
Agua destilada .....	100.0 ml.

En el agua hirviendo se disuelve la fucsina básica y se agrega el ácido clorhídrico concentrado, para acelerar la disolución de la fucsina se puede emplear un agitador magnético. Se deja enfriar un poco (a  $\pm 4$  C°) y se agrega el metabisulfito de potasio: se agita por 15-20 minutos utilizando un matraz Erlenmeyer. La boca del matraz se cubre con un vidrio de reloj, y el agitador se acelera a fin de que forme turbulencia: esto ayuda a que el SO<sub>2</sub> que se libera no se pierda y pueda reaccionar decolorando la fucsina básica. Se almacena en un frasco ambar en completa oscuridad y bajo refrigeración.

#### II. Aceto-orceina (solución madre):

Orceina sintética .....	2.25 gr.
Acido acético .....	100.0 ml.

Se disuelve la orceina en el ácido acético y se hierve lentamente por 2 a 3 horas, dejándose enfriar y luego filtrar. Se toman 9 ml de esta solución y se mezcla con 11 ml de agua destilada y 2 ml

de ácido clorhídrico.

III. P-diclorobenceno.

Esta solución se lleva a la saturación.

(García, 1977).

## APENDICE II

### Cultivo de Tejidos Vegetales.

#### Generalidades.

El hombre desde su origen ha dependido de los vegetales ya que através de ellos obtiene materiales para su bienestar, así como el acondicionamiento ambiental general; es por ello que el material genético existente representa una gran riqueza y debido a esto surge la necesidad de conocerlo, conservarlo y mejorarlo, analizando la variabilidad del material y obtener más y saber con que fuentes se cuenta (Cervantes, 1978). Existen varios procedimientos o técnicas para preservarlo, tal es el caso de la técnica relativamente nueva (se inicio en este siglo) de Cultivo de Tejidos Vegetales, esta técnica consiste en cultivar una sección u órgano de una planta en un medio con los suplementos nutricionales, así como sus condiciones medioambientales necesarios para la obtención de una o varias plantas (clonación) completas (Hartmann y Kester, 1982).

Morel cultivó meristemas apicales de *Cymbidium* (Orchidaceae) logrando regenerar plantulas libres de virus del mosaico utilizando protocormos (término dado por Bernard para designar un estado de desarrollo en el embrión de orquideas el cual está formado de solo unos cientos de células; (Withner, 1974) donde se tiene el sistema de clonación en un tiempo relativamente corto, diferentes investigadores modifican y profundizan estos estudios en años posteriores y son aplicados industrialmente (Morel, 1974; Vajrabhaya, 1977; Hartmann y Kester, loc cit.).

Dentro de las ventajas que nos ofrece la técnica de cultivos de tejidos vegetales podemos mencionar: la reducción del tiempo en la propagación de plantas que se desarrolla lentamente y que tienen una alta demanda comercial (Morel, loc cit.) resuelve problemas de cultivo en plantas con producción pobre de semillas, problemas de daño genético durante el almacenamiento o pérdida de viabilidad, así como permite superar problemas en cultivos que se propagan vegetativamente en forma ineficiente, ofrece la erradicación viral del germoplasma, la recuperación de genotipos en peligro de extinción (Sharp, et al., 1982) y es extremadamente útil en el establecimiento de nuevas variedades, aún cuando sólo haya pocas plantas iniciales disponibles (Evans, et al., 1981) así como en estudios específicos de diferenciación, Fisiología y genética (Kallak et.al., 1978).

#### Fuentes de Explante.

Por conveniencia, la tecnología del cultivo de tejidos vegetales se divide en cinco clases (Gamborg y Shyluk, 1981) las cuales están basadas en el material usado.

1) Cultivo de Callos. Es el crecimiento de masas celulares desorganizadas en un medio sólido con agar que se forma a partir de la desorganización, división y crecimiento de célula del explante (Gamborg y Wetter, 1975; Gamborg y Shyluk, loc cit.) siendo su desarrollo dependiente de la composición del medio, el material usado y las condiciones de incubación, presentándose a su vez una gran variedad de callos tanto por su textura como su color (Dodds y Roberts, 1982).

2) Cultivo de Células. Es el cultivo de células libres y

pequeños agregados celulares dispersos y creciendo en un medio líquido, siendo las tasas de crecimiento de estos cultivos generalmente más altas que en agar, debido a que existe un mayor número de células en contacto más directo con los nutrientes del medio (Gamborg y Wetter, loc cit.). Los cultivos en suspensión son iniciados usualmente a partir de callo, también de tejidos de plántulas o embriones disgregados mecánicamente (Street, 1977).

3) Cultivo de Organos. Como anteras (microsporas), ovarios, raíces, ápices y otros órganos vegetales en forma aséptica, habiendo formación de brotes y plantas por 2 vías: La directa, es decir, sin pasar por callo o indirecta la cual implica la formación de callo (Evans and Reed, 1981; Young et al., 1981)

4) Cultivo de Meristemas. Como los embriones los cuales se han utilizado en estudios de morfogénesis y en regeneración de plantas completas. Los meristemas exhiben un amplio rango de respuestas morfogénéticas en cultivo, debido a que al igual que en el cultivo de órganos depende de varios factores (Rubluo y Kartha, 1984): la edad de las plantas madre, el medio de cultivo, la clase y concentración de los reguladores del crecimiento, las condiciones ambientales como la luz, temperatura, fotoperiodo, las fluctuaciones estacionales el tipo de material de vidrio utilizado para el cultivo, etc. (Kantha, 1981).

5) Cultivo de Protoplastos. Los protoplastos son células sin pared celular (Gamborg y Shyluk, loc cit.) la cual es degradada al tratar los tejidos con una mezcla de enzimas (Gamborg y Wetter, loc cit.). Los protoplastos se han destinado a estudios de hibridación somática, absorción de virus, de bacterias, de

ESTA TESIS NO DEBE  
SALIR DE LA BIBLIOTECA

organelos, transformación genética, estudios de membrana y de síntesis de pared celular, fisiología y bioquímica comparativa entre protoplastos y células in vitro (Soriano, 1977).

## APENDICE III

### Métodos Estadísticos. (Generalidades)

Distribución t de "student". En la mayoría de las aplicaciones en que las medias de muestras se utilizan para estimar la media de población ( $\mu$ ), el valor de  $\mu$  no se conoce. Podemos sin embargo, obtener una estimación, a partir de los datos de la muestra que nos da el valor de  $\bar{x}$ . Si la muestra es de tamaño  $n$ , la estimada  $\hat{\mu}$  esta basada en  $(n-1)$  grados de libertad y para ello necesitamos una distribución que nos permita calcular los límites de confianza para  $M$  (media poblacional) descubierto por W.S. Gosset en 1908. Esta distribución ha revolucionado la estadística de pequeñas muestras.

La cantidad  $t$  esta dada por la ecuación

$$t = \frac{\bar{x} - M}{\hat{\sigma} / \sqrt{n}}$$

Sin  $M$ ,  $t$  no se puede calcular; pero su distribución de muestreo se ha desarrollado en tablas, las cuales se pueden encontrar en cualquier libro de Estadística y aunque no se conozca  $M$  se puede hacer alguna hipótesis sobre ella. Encontrándose los límites de confianza para  $M$  con la siguiente relación:

$$\bar{x} - t \hat{\sigma} / \sqrt{n} < M < \bar{x} + t \hat{\sigma} / \sqrt{n}$$

nota: La desviación estandar o  $\hat{\sigma}$  también se puede designar en los

libros con la letra s por lo tanto  $\frac{2}{Jn} = \frac{s}{Jn} = (sk)$ .

Diferencias Significativas.

Después de haber realizado un experimento y obtener resultados, otra parte muy importante la cual ayuda y es determinante en la conclusión a la que se llegue, es el tratamiento que se realiza con los datos y que en Estadística se llama INFERENCIA. Una de las formas son las PRUEBAS de DIFERENCIAS debido a que las investigaciones muchas veces se diseñan para descubrir y evaluar diferencias entre efectos (Experimental y testigo por ejemplo). Para cualquier par la diferencia entre las mediciones proporcionadas por los dos miembros es una estimada de la diferencia en los efectos de los dos tratamientos o procedimientos, por lo que con un solo par es imposible decir si la diferencia en comportamiento ha de atribuirse a la diferencia en condiciones, al azar o en parte a ambos; tiene que haber un número de pares y los datos que se analicen consisten en una muestra de  $n$  diferencias en medidas pudiendo decir que existe una media poblacional MD.

Existe otro factor que se debe tomar en cuenta y es la llamada HIPOTESIS NULA la cual nos indica que la media poblacional de las diferencias MD puede ser igual a cero o mayor que cero pero que el valor de las diferencias no es significativo; y por tanto en experimentos puede o no rechazarse la Hipótesis Nula.

Cuando no se recurre a hacer pares, se tiene dos muestras independientes con medias  $X_1$  y  $X_2$  que son estimadas de sus respectivas medias poblacionales  $M_1$  y  $M_2$ .

Las pruebas de significación e intervalos de

confianza, concernientes a la diferencia de población M1 y M2 estan nuevamente basadas en la distribución t de "Student" que ahora tiene el valor de:

$$t = \frac{(\bar{x}_1 - \bar{x}_2) - (M_1 - M_2)}{S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}$$

y si se hace la suposición de que  $\bar{x}_1$  y  $\bar{x}_2$  estan normalmente distribuidas y son independientes. Por teoria, su diferencia, está también normalmente distribuida, de modo que el numerador de t es normal con media cero, y los valores de t que sean menores que el valor dado en las tablas de cualquier libro de Estadística podrá decirse que nos indica que se acepta la Hipótesis nula.

En una derivación de la anterior ecuación y para fines prácticos la parte  $(M_1 - M_2)$  queda suprimida por lo que:

$$t = \frac{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}{S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}}$$

$S_{\bar{x}_1 - \bar{x}_2}$  es un tanto complicado porque hay dos tipos (si son análisis de dos muestras de tamaño igual o de tamaño desigual) y además porque su valor se obtiene de los siguientes datos y operaciones:

$n$  = tamaño de la muestra

$g_1 = n - 1$

media =  $\bar{x}$

$\sum X^2 = A$

$(\sum X) / n = B$

$\sum (X - \bar{x})^2 = C$

$C_1 + C_2 = D$

$g_1 + g_2$

por lo tanto:

$$Sx_1 - x_2 = \sqrt{\frac{D}{n}} \quad \text{o} \quad Sx_1 - x_2 = JD \sqrt{\frac{n_1 + n_2}{n_1 * n_2}}$$

Nota 1: En algunas de estas operaciones se ha colocado una letra (A,B,C,D) para facilitar su comprensión, aclarando que cada una de estas operaciones se realizan dos veces ya que se están comparando dos tratamientos ( 1 y 2).

Nota 2: C también se puede obtener realizando la siguiente operación:

$$C = A - B$$

BIBLIOGRAFIA.

- AYALA, F. J. and S.A. KIGER. 1980. Modern Genetic. The Benjamin Cummings Co. Inc. USA.
- ASHMORE, E.S. y R.A. GOULD. 1981. Karyotype Evolution in a Tumour. Derived Plant Tissue Culture Analysed by Gimsa C-Banding. *Protoplasma*, 106: 297-308.
- BAILEY, H. L. 1950. The Standard Cyclopedia of Horticulture Vol. III. Eds. Mac. Millan .New York.
- BAILEY, H.L. and BAILEY, E.1978.Hortus Third a Concise Dictionary of Plants Cultivated in the United States and Canada. Mac. Millan Publishing CO. INC.USA: p1226.
- BAIZA, M.A.1981 Efectos Producidos por el Malatión en los Cromosomas de las células Meristemáticas de la Raiz de Vicia faba tesis profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. México.
- BALZAN, S.1981.Chromosomal Variability of Suspension Cultures of 2 Nicotiana species. *Boll. Soc. Ital. Biol.sper* 57 (15) pp. 1596-1600.
- BENTZER, R.B., BOTHMER, L., ENGSTRAND, M. y S. SNOGERUP. 1971.Some Sources of Error in the Determination of Arm Ratios of Chromosomes. *Bot. Notiser*. vol 124: 65-74.
- BERLYN, P.G. y P.J. MIKSCH. 1976. Botanical Microtechnique and Cytochemistry. The Iowa State University Press. Amer. Iowa: 304-306.
- BLIXT, S. 1958 a. Cytology of Pisum. I Methodical Investigation. *Agri. Hort. Genet.* 16: 66-77.
- BLIXT, S. 1958 b. Cytology of Pisum. II the Normal Kariotype. *Agri. Hort. Genet.* 16: 221-237.
- BLIXT, S. 1972. Mutation Genetics in Pisum. *Agri. Hort. Genet.* XXX: 1-293.
- CASSERES, E. 1984. Produccion de Hortalizas. 3a ed. Instituto Interamericano de Cooperacion para la Agricultura, San Jose, Costa Rica.
- CERVANTES, S.T. 1978. Recursos Genéticos Disponibles a Mexico. Sociedad Mexicana de Fitotecnia A.C. Chapingo, Mexico.
- CONSTANTIN, J.M. 1981. Chromosome Instability in Cell and Tissue Cultures and Regenerated Plants. *Environmental and Experimental Botany*, Vol. 21, No 3/4, pp 359-368.
- CRONQUIST, A.1981. An Integrated System of Classification of Flowering Plants. New York Columbia University Press p.1262.
- CURTIS, P.J. 1976. Introduccion a la Citologia Vegetal Departamento de Ensenanza, Investigacion y Servicio en Fitotecnia. Universidad de Chapingo, Mexico.
- D'AMATO, F. 1975. The Problem of Genetic Stability in Plant Tissue and Cell Cultures. En: D.H. Fronkenl y J.G. Hawkes. *Crop Genetic Resources for Today and Tomorrow*. Ed. Cambridge Univ. Press. Cambridge.
- D'AMATO, F. 1977. Cytogenetics of Differentiation in Tissue

- and Cell Culture. En: J. Reinert y Y.P.S. Bajaj. Plant Cell, Tissue, and Organ Culture. Ed. Springer Verlag, New York 343-357.
- De La TORRE, C., GONZALEZ, F.A. y M.G GIMENEZ, 1971. Cell Flow and its Application to the Estimate of Cell Cycle Parameters in Meristems. Biol. Zbl. 90: 707-710
  - DODDS, J.H. y L.W. ROBERTS. 1982. Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press. Cambridge.178.
  - DUFFOS, C. y C. SLAUGHTER. 1985. Las Semillas y sus Usos. AGT editor S.A. México.
  - EVANS, D.A y M.S. REED. 1981. Cytogenetic Techniques.213-240. En T.A. Thorpe. Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Ed. Academic Press, New York;
  - EVANS, H.J. 1976. Cytological Methods for Detecting Chemical Mutagens: 1-8 En: Mullander A. Chemical Mutagens. Principles and Methods for their Detection. Vol. 4
  - EVANS, H.J. SHARP,W.R. y C.F. FLICK. 1981. Growth Behavior of Cell Cultures: Embriogenesis and Organogenesis: 45-113. En T.A. Thorpe .Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Ed. Academic Press, New York
  - GAMBORG, O.L. y J.P. SHYLUK. 1981. Nutrition Media and Characteris of Plant Cell and Tissue Culture. 21-42. En: T.A. Thorpe. Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Academic Press. New York
  - GAMBORG, O.L. y L.R. WETTER. 1975. Plant Tissue Culture Methods. Nacional Research Coucill, Canada: 1-2.
  - GARCIA, V.A. 1972. Manual de Técnicas de Citogenética. Colegio de Postgraduados. Escuela Nacional de Agricultura, Chapingo. México.
  - GARCIA, V. A. 1985. Sistemas Robertsonianos: su Papel en Evolución Cromosómica en Plantas Superiores: 41-53. En: Memorias del Seminario Sobre la Investigación Genética Básica en el Conocimiento y Evaluación de los Recursos Genéticos. Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM. México.
  - GARNER, E.J. 1979. Principios de Genetica. 2a edición. Editorial Limusa - Wiley, S.A. Mexico: 201-227.
  - GIMENEZ, M.G., de la TORRE,C. y J.F. LOPEZ-SAEZ. 1977. Cell Division in Higher Plants. 261-307. En: Rost, L.T. Dowden, Hutchinson & Ross, Mechanisms and Control of Cell Division. Ed. Inc. Stroudsburg. Pennsylvania.
  - GONZALEZ, F.A., HERNANDEZ, P. y J.F. LOPEZ-SAEZ. 1985. Effect of caffeine and adenosine on G2 repair: Mitotic Delay and Chromosome Damage. Mutation Research 00 MTR03999.
  - GOULD, R.A. 1979. Chromosomal and Phenotypic Stability During Regeneration of Whole Plants from Tissue Cultures of *Brachycome dichomosomatica* (2n=4) Aust.J. Bot. 27:117-210.
  - GRIESBACH,R.J. 1987. Selected Topics on Induced Chromosome Changes in Tissue-Cultured Cells. Hort. Science. Vol.22 (6):
  - HARTMANN H.T. y D.E. KESTER. 1982. Propagacion de Plantas,

- Principios y Practicas. CECSA. Mexico:237-272 639-666
- JACKSON, R. C. 1971. The Karyotype in Systematics.: 327-368. En: Annual Review of Ecology and Sistematic. Vol. 11.
  - JAROSLAV, D. y F.J. NOVAK. 1985. Kariological and Cytophotometric Study of Callus Induction in *Allium sativum* L. J. Plant Physiol Vol.118. pp.421-429.
  - JIMENEZ R.M. 1988. Análisis Cariotipico de Algunas Especies del Género *Allium*. tesis Profesional, Facultad de Ciencias. UNAM. México.
  - KALLAK, H., JAVERKULGI, L., PALM, M., M. VAPPER. 1978. Plant Tissue Culture as a Convenient Model for Studying Various Cytogenetic Problems. En: Genetics in Soviet Estoma, Academy of Sciences of the Estoman. S.S.R. Tallium.
  - KAO, K.N. MILLER, R.A. 1970. Vriations in Chromosome Number and Structure in Plant Cells Grown in Suspension Cultures. Can. J. Genet. Cytol. 12: 297-301.
  - KARTHA, K.K. 1981. Meristem Culture and Cryopreservation. Methods and Applications. 181-211. En: F.A. Thorpe. Plant Tissue Culture, Methods and Applications in Agriculture. Ed. Academic Press. New York.
  - KEATHLEY, D.F. and R.L. SCHOLL. 1983. Chromosomal Heterogeneity of *Arabidopsis thaliana* anther Callus, Regenerated Shoots and Plants. Z. Pflanzenphysiol. Bd. 112. p.247-255.
  - KRIKORIAN, A.D., O'CONNOR, S.A. y FITTER M.S. Chromosome Numer Variation and Karyotype Stability in Cultures and Culture Derived Plants. pp.541-582. En: Evans D.A. Hand book of Plant Cell Culture Vol.1 Ed. Macmillan Publishing Co. New York.
  - LACADAENA, T.R. 1981. Genética. A.G.E.S.A. España.
  - LEE, M. y PHILLIPS L.R. 1988. The Chromosomal Basis of Somaclonal Variation. Ann. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol. 39 pp. 413-437.
  - LENINGHER, L.A. 1978. Bioquímica. 2a edición. Ediciones Omega. España.
  - LEVAN, A., FREDGA, K. y SANDBERGA, A. 1964. Nomenclature for Centromeric Position on Chromosomes. Hereditas 52: 201-219.
  - MARTINEZ, P.A. 1985. Induccion in vitro de Brotacion Multiple en *Bletia urbana* Dressler (Orchidaceae) a partir de protocormos seccionados. tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM. Mexico, 66.
  - MARX, G.A. 1977. Classification, Genetics and Breeding. En: The Physiology of the Garden pea Experimental Botany. An. Int Series of Monographs vol. 12 Ed. Sutcliffe, J.F. Pate S.S. Academic Press New York.
  - MERCADO, R.P. 1983. Determinación y Análisis del Número Cromosómico y Cariotipo de dos Especies del Género *Oxyrhynchus* (Tribu Phaseoleae. Familia Leguminosae. Tesis Profesional. Facultad de Ciencias. UNAM.
  - MOREL, G.M. 1974. Clonal Multiplication of Orchids. 169-222. En: Carl, L. Withner, The Orchids Scientific Studies. Ed. Wiley, J. and Sons. New York.
  - MROGINSKI, L.A. y K.K. KARTHA. 1984. Tissue Culture of Legumes

- for Crop Improvement. Plant Breeding Reviews 2: 215-264.
- MURASHGIGE, T. 1974. Plant Propagation through Tissue Cultures. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.
  - MURFET, I.C. 1977. The Physiological Genetics of Flowering. En: Sutcliffe, J. F. Pate S.G. The Physiology of the Garden pea. Experimental Botany. An Int. Series of Monographs vol. 12 Ed. Academic Press New York.
  - PEARSON, B.D. 1981. Frijol y Chicharo, Manuales para Educacion Agropecuaria (12) Area Produccion Vegetal. SEP Trillas. Mexico
  - PELLEW, C. y E.R. SANSOME. 1932. Genetical and Cytological Studies on the Relation between Asiatic and European varieties of *Pisum sativum*. J.Genet.25, 25-54.
  - PHILLIS, R.L. y S.A. WANG. 1984. Chromosome Analysis. pag.712. En:Vasil, I.K. Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vasil Vol.1 Cap.78
  - RENFROE, M.H. y G.P. BERLYN. 1985. Variation in Nuclear DNA Content in *Pinus taeda* L. Tissue Cultures of Diploid Origin. J. Plant Physiol. Vol. 121. pp 131-139.
  - REYES, M.C. 1987. Compuesto Precoz (VS-409) Nueva Variedad de Maiz para el Noroeste de México. Fitotecnia 10 :34-49
  - RUBLUO, I.A., GOMEZ, A.S., SILVA, E. y P.R. VILLALOBOS. 1978. The MMS Dose Response for Chromosomal Alterations in Barley. An. Inst. Biol. Univ. Nal. Auton. Mex.49, Ser. Biol. Exp (1): 41-58.
  - RUBLUO, I.A. y KARTHA, K.K. 1984. Plant Regeneration from Pea Leaflets Cultured *in vitro* and Genetic Stability of Regenerants. J. Plant Physiol. vol.117: 119-130.
  - RUBLUO, I.A. 1985. Cultivo de Tejidos Vegetales y Recursos Genéticos. En Memorias del Seminario Sobre la Investigación Genética Básica en el Conocimiento de los Recursos Genéticos. Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM.
  - SANSOME, E.R. 1982. Segmental Interchange in *Pisum sativum*. Cytogía 3: 200-219.
  - SHARP, W.R., EVANS, D.A. y M.R. SONDAHL. 1982. Application of Somatic Embryogenesis to Crop Improvement.759-762. En: A. Fujiwara, Plant Tissue and Cell Culture. Proc. 5th in H. Cong. Ed. Japanese Assoc. for Plant Tissue Culture, Tokyo.
  - SHERIDAN, W.F.1975. Plant Regeneration and Chromosome Stability of Tissue Cultures;263-295 En: L. Ledoux. Genetic Manipulation with Plant Material, Ed. Plenum Press: New York.
  - SINOH, B.D. 1972. Cytogenetic Studies on Plant Tissue Cultures. Tesis Profesion, Department of Crop Science. University of Saskatchewan.
  - SNEDECOR, W.G. y G.W. COCHKAN. (1981) Metodos Estadísticos. Compania Editorial Continental.
  - SORIANO, G.J. 1977. Aislamiento de Protoplastos a partir de Cultivo de tejidos de jitomate. Tesis Profesional. Facultad Química. UNAM.

- STEBBINS, G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Edward Arnold LTD. London
- STREET, H.E. 1977. Plant Cell Culture. 393-417. En: H.E. Smith. The Molecular Biology of Plant Cell. Ed. Blackwell Scientific Publ. Oxford.
- SWANSON, M.Y. 1968. Citogenética, UTHEA, México.
- SWARTZBERG, D., IZHAR, S. y S. 1985. Tobacco Callus Line Tolerant to Amitrole: Selection, Regeneration of Plants and Genetic Analysis. J. Plant Physiol. Vol. 121. pp. 29-35.
- TORREY, J.G. 1958. Differential Mitotic Response of Diploid. and Polypoid Nuclei to Auxin and Kinetin Treatment. Science New York 128.
- TORREY, J.G. 1961. Kinetin as Trigger for Mitosis in Mature Endomitotic Plant Cell. Experimental Cell Research 23 :281-299.
- VAJRABHAYA, I. 1977. Variations in Clonal Propagation.: 177-202. En: J. Arditti. Orchid Biology Reviews and Perspectives, Ed. Cornell Univ. Press, Ithaca, New York.
- VILLALOBOS, AV. 1984. Somaclones: Una Alternativa para Incrementar la Variabilidad Genética. Fitotecnia. 4: 87-95.
- WITHNER, L.C. 1974. The Orchids Scientific Studies. ed. John Wiley & Sons. USA. p180.
- YOUNG, E.C., THORPE, T.A. and C.J. JENSEN. 1981. *in vitro* Fertilization and Embryo Culture. En: T.A. Thorpe. Plant Tissue Culture Methods and Applications in Agriculture. Ed. Academic Press. New York.