



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

**Aislamiento y respuesta *in vitro* de diferentes
estadios embrionarios inmaduros de
Chenopodium quinoa Willd.**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE
B I O L O G O
P R E S E N T A
OCTAVIO GONZALEZ CABALLERO

DIRECTOR DE TESIS:
DR. VICTOR MANUEL CHAVEZ AVILA
CO-DIRECTOR:
BIOL. JOSEFINA GONZALEZ JIMENEZ





Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

ESTA TESIS NO SALE
DE LA BIBLIOTECA



ESTADOS UNIDOS MEXICANOS
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

ACT. MAURICIO AGUILAR GONZÁLEZ
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.
NOMBRE: González Caballero Octavio
FECHA: 29-enero-2005/
FIRMA: Octavio Glez.C.

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo escrito:

Aislamiento y respuesta in vitro de diferentes estadios embrionarios inmaduros de *Chenopodium quinoa* Willd.

realizado por Octavio González Caballero

con número de cuenta 9338141-3 , quien cubrió los créditos de la carrera de: Biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Víctor Manuel Chávez Avila

Propietario

Co-dirección

Biól. Josefina González Jiménez

Propietario

Ing. Agro. María Teresa de Jesús Olivera Flores

Suplente

M. en C. Juana Mabel Hernández Altamirano

Suplente

Biól. Ana Claudia Sánchez Espinosa

Consejo Departamental de Biología

M. en C. Juan Manuel Rodríguez Chávez



El presente estudio fue realizado en el Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales del ⁽¹⁾ Jardín Botánico del Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México y en el ⁽²⁾ Laboratorio de Genética Vegetal del Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares, inicialmente bajo la dirección del Dr. Abraham Rubluo Islas (†) y posteriormente concluido con la dirección del ⁽¹⁾Dr. Víctor Manuel Chávez Avila y la co-dirección de la Biól. Josefina González Jiménez y subsidiado por una beca del CONACYT perteneciente al proyecto 33285-B.

Agradecimientos

Agradezco al Jardín Botánico del Instituto de Biología de la UNAM y al Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares por facilitarme el uso de sus instalaciones durante el desarrollo de este trabajo.

Agradezco a los integrantes del jurado por su valiosa cooperación en la revisión de este trabajo sobre todo por su ayuda y muy amable disposición ante el tiempo apremiante.

Dr. Víctor Chávez Avila

Biól. Josefina González Jiménez

Ing. Agro. Mayte Olivera Flores

M. en C. Mabel Hernández Altamirano

Biól. Claudia Sánchez Espinosa

Al Dr. Abraham Rubluo Islas por haberme iniciado en el conocimiento del cultivo de tejidos vegetales y haberme dado la oportunidad de participar en el proyecto de quinua.

Al Dr. Víctor Chávez por su constante y valiosa asesoría así como por su interés mostrado en mi formación profesional.

Agradezco a cada uno de mis compañeros del Laboratorio de Cultivo de Tejidos Vegetales, Fernando, Marco, Mabel, Claudia, Isaac y muy en especial a Julio César quienes siempre me brindaron su ayuda y apoyo.

A la Biól. Bárbara Estrada por su ayuda en la parte experimental y por todas sus atenciones

Al Ing. Eulogio de la Cruz por el material vegetal proporcionado

A Miguel del Laboratorio de Genética Vegetal del ININ por su amable ayuda y disposición en la parte experimental de mi trabajo

Al CONACYT por el apoyo económico brindado para llevar a cabo esta investigación

Dedicatoria:

A mis padres Emilio González y Silvia Caballero, por todo el apoyo, amor y comprensión que me han dado, porque sin ellos no hubiera sido posible la culminación de esta etapa de mi vida

A mi hermana Lorena que siempre me ha apoyado y animado a seguir adelante

A mis abuelos, Gregorio y Virginia y tíos Alberto, Mauricio y Mary con mucho cariño por creer en mi

A mi amigos Nashelly y Julio César por una sincera amistad durante todos este tiempo

A ti Wendy por tu amor y paciencia por ver realizada una de mis metas

Abreviaturas

2,4-D	ácido 2,4-diclofenoxiacético
AIA	ácido indol acético
ANA	ácido naftalenacético
B5	Medio de cultivo Gamborg, Miller y Ojima (1968)
BA	6 bencil aminopurina
FAO	Food and Agriculture Organization
GA ₃	ácido giberélico
ININ	Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares
K	Kinetina
MS	medio de cultivo Murashige y Skoog (1962)
OMS	Organización Mundial de la Salud
UAEM	Universidad Autónoma del Estado de México
TIBA	ácido triiodobenzoico

Contenido

	Página
Resumen	1
I. Introducción	2
A. Antecedentes	5
Generalidades de la quinua. Origen y distribución geográfica	4
Clasificación taxonómica	5
Morfología	6
Fenología de la quinua	8
Biología floral	8
Usos	9
Ventajas	11
Mejoramiento genético de quinua	11
Cultivo de Tejidos vegetales	13
Cultivo de embriones	13
Aplicaciones prácticas del cultivo <i>in vitro</i> de embriones	13
Requerimientos para el cultivo in vitro de embriones	15
Cultivo de Tejidos de la Familia Chenopodiaceae	18
Cultivo de Tejidos de <i>Chenopodium quinoa</i> Willd.	20
B. Justificación	21
C. Objetivos	21
II. Materiales y métodos	22
Material Biológico	22
Determinación de las características morfológicas de las flores asociadas a la presencia de embriones	22
Desinfección del material biológico	24
Método de siembra	24
Disección de los embriones	25
Medios de cultivo	25
III. Resultados y discusión	31
IV. Conclusiones	57
V. Apéndices	58
VI. Bibliografía	60

Resumen

En el presente trabajo se analizó la respuesta *in vitro* de diferentes estadios embrionarios de ***Chenopodium quinoa*** Willd. variedad Barandales para lo cual fue necesario determinar las características morfológicas externas de las panojas asociadas a la presencia de embriones. Posteriormente se efectuó el aislamiento de diferentes panojas y se notó una maduración asincrónica de las flores. Se vio que la ubicación del embrión inmaduro es hacia el centro del fruto y cuando este llegó a la madurez fue hacia la periferia provocado por la acumulación de material de reserva. Se identificaron 5 estadios embrionarios: globular, corazón, torpedo, torpedo tardío y herradura.

Inicialmente se probaron cuatro medios de cultivo, dos de los cuales tuvieron como composición el medio B5 y los otros el MS y se sembraron embriones en estadio torpedo, los embriones presentaron oxidación en todos los medios sin embargo los que fueron sembrados en el medio 4 alcanzaron la mayor longitud.

Se sembraron los cinco estadios en los cuatro medios de cultivo; y en el medio 4 se obtuvo mayor porcentaje de germinación de los estadios torpedo, torpedo tardío y herradura con 30, 100 y 100 % respectivamente, para la optimización se modificó el medio 4 y se generó el medio 4A.

En el medio 4A se sembraron los estadios globular, corazón, torpedo y torpedo tardío y se logró la germinación del estadio corazón (20%) que en ninguno de los otros medios se había logrado y se incrementó el porcentaje de germinación en los otros dos estadios.

Se efectuaron dos barridos hormonales utilizando el estadio torpedo tardío, uno con ANA y BA, en donde no se encontraron diferencias significativas entre los tratamientos aunque se observó que se obtenía una mayor longitud a mayores concentraciones de citocininas sin embargo los embriones presentaron hiperhidratación. En el segundo barrido se usaron los reguladores de crecimiento, AIA y K y se dio un pulso hormonal de 7 días y posteriormente los embriones subcultivaron en medio MS al 50% y se encontró que la mejor respuesta fue a una concentración de 12 mg/l de K.

El tratamiento donde se presentó el mayor número de raíces fue el de 12 mg/l de AIA

Los resultados obtenidos contribuyen al conocimiento del desarrollo *in vitro* de los embriones, lo cual podría ayudar al recate *in vitro* de embriones híbridos producto de las cruces de ***C. quinoa*** y ***C. berlandieri spp nuttaliae*** (cvs. huauzontle y chíá roja).

I. INTRODUCCIÓN

Chenopodium quinoa es una especie que se originó en Sudamérica y recientemente ha despertado el interés como un “nuevo” cultivo debido principalmente a sus altos valores nutritivos y sus características agronómicas, sin embargo contiene saponinas, sustancias que representan un problema para su comercialización, una de las alternativas es la hibridación con otras especies afines que no producen saponinas, por esta razón es importante conocer el comportamiento de embriones cigóticos inmaduros de la quinua cultivados *in vitro* ya que en investigaciones futuras los híbridos podrían presentar problemas para lograr su madurez y su rescate *in vitro* sería necesario.

La búsqueda de alternativas de cultivos que brinden productos nutritivos con reducidos insumos, de rápido crecimiento y mínimo deterioro del medio ambiente se ha convertido en una necesidad apremiante para afrontar la creciente demanda de alimentos y la necesidad de conservar el entorno mediante la práctica de una agricultura sustentable, por tanto la generación de nuevas variedades y el uso de especies que reúnan estas características es necesario.

Muchas plantas han sido cultivadas de manera tradicional por diversas culturas un claro ejemplo es el huauzontle (***Chenopodium berlandieri* spp. *nuttalliae***) que tuvo un importante papel alimenticio y religioso para los habitantes del México prehispánico pero fue reemplazado por los cereales con la llegada de los españoles, de la misma manera ***Chenopodium quinoa*** ha sido de gran importancia en la región de los Andes.

A este tipo de especies de alto valor nutritivo y bajo costo, se les considera como “nuevos” cultivos o cultivos del futuro, los cuales tienen el potencial para contribuir a resolver algunas de las problemáticas como es el abastecimiento de alimentos de calidad y evitar al máximo el deterioro de los recursos naturales.

Chenopodium quinoa Willd., (quinua) al igual que el amaranto, ha sido clasificada como pseudocereal ya que tiene características similares a las de los granos de cereales verdaderos, pero además la FAO y la OMS la califican como un alimento muy importante para consumo humano por su altísimo valor nutricional, que puede sustituir notablemente a las proteínas de origen animal, pues contiene un balance de proteínas y nutrientes más cercano al ideal que cualquier otro alimento (Tapia, 1979).

Sin embargo una de las principales limitaciones del cultivo se debe a que casi la totalidad de las variedades tradicionales, poseen una clase de glucósido triterpenoide denominado saponina localizado en el pericarpo que envuelve a la semilla, estos compuestos consisten de un arreglo lineal de una a seis hexosas o pentosas unidas a derivados de sistemas de anillos policíclicos llamados aglicones, las saponinas están presentes como una protección natural contra insectos y aves (Price, 1994), pero dan un sabor amargo al ser consumidas.

En algunas variedades, la presencia de saponinas, es alta, esto representa un problema para la comercialización y consumo de la quinua, ya que es necesaria su remoción a través de abrasivos o mediante lavados vigorosos por lo que puede aumentar los costos de su producción y reducirle competitividad respecto a los cereales (Peñañiel, 1988).

Por lo anterior una de las perspectivas más importantes es el mejoramiento genético y agronómico de la quinua para la obtención de variedades con bajo contenido de saponinas (Bournof-Radosevich, 1988).

Recientemente se ha podido establecer la afinidad genética entre la quinua y otra especie mexicana: ***Chenopodium berlandieri* spp. *nuttaliae*** (cvs. huauzontle y chía roja) (Ruas et al 1999), por lo que se pretenden efectuar hibridaciones interespecificas a efecto de incorporar genes de interés; sin embargo, en muchas especies, al efectuar las hibridaciones a través de técnicas convencionales de cruce, no se obtienen resultados satisfactorios debido a las barreras post-cigóticas que se presentan, sobre todo la malformación del tejido de almacenamiento (endospermo) que nutre al embrión en desarrollo y que conduce frecuentemente al aborto embrionario, por tanto la aplicación del cultivo de tejidos vegetales se presenta como una herramienta muy útil para la obtención de plantas viables (Tablas 1 y 2).

El presente trabajo tuvo como objetivos: Establecer condiciones para el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros de ***Chenopodium quinoa* Willd.** var. Barandales que incluyen procesos de desinfección, aislamiento y establecimiento de medios nutritivos para continuar su desarrollo y determinar algunas características externas de las flores asociadas a la presencia de embriones.

A. ANTECEDENTES

Generalidades de la quinua. Origen y distribución geográfica

La quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*) es un cultivo de grano pequeño considerado como un seudocereal, domesticado en los Andes, recibe diferentes nombres en el área andina que varían entre localidades y de un país a otro, así como también recibe nombres fuera del área andina que varían con los diferentes idiomas (Mujica, 1996). En inglés: Quinoa, Quinoa, Kinoa, Swet quinoa, Peruvian rice, Inca rice; en español: Quinoa, Quinoa, Quingua, Triguillo, Trigo inca, Arrocillo, Arroz del Perú, Kinoa.

Chenopodium es el principal género dentro de la familia Chenopodiaceae, tiene una amplia distribución a nivel mundial y comprende alrededor de 250 especies (Giusti, 1970). *Chenopodium quinoa* ha sido cultivada en los Andes desde hace 3000 años a.C. por las culturas prehispánicas. El origen de la especie está alrededor del lago Titicaca, entre la frontera de Perú y Bolivia donde se encuentra la mayor diversidad genética (Jacobsen, 2002).

Por su parecido con el arroz, los primeros españoles en América la denominaron "arrocillo americano" o "trigo de los Incas", sin embargo en muy poco tiempo su cultivo fue sustituido por el maíz y las papas hasta que la producción de quinua prácticamente desapareció, excepto en una pequeña fracción nativa que continuó con su cultivo por tradición.

Actualmente se cultiva en los Andes, en regiones relativamente extensas de Perú y Bolivia y en pequeñas extensiones de Colombia, Ecuador, Argentina y Chile (Gandarillas, 1979); también en otros países como Australia, Inglaterra, Canadá y Estados Unidos de América. Las causas de esta recuperación son que es un alimento altamente nutritivo y de fácil producción por su adaptabilidad, además de ser fácilmente asimilable por el organismo y versátil desde el punto de vista industrial y culinario.



Figura 1. *Chenopodium quinoa* Willd.

Clasificación taxonómica

El conocimiento de la diversidad genética en *Chenopodium* es limitado y está basado en caracteres morfológicos. Aellen en 1960, denominó a *Chenopodium berlandieri*, que se encuentra en México y *Chenopodium quinoa* como la misma especie debido a su gran similitud morfológica sobre todo de la semilla, por lo que Simmonds (1976) consideró que se trató de una introducción de *Chenopodium quinoa* proveniente de los Andes a Mesoamérica; sin embargo estudios que involucran cruces entre individuos domesticados y formas silvestres relacionadas de México y Sudamérica, indican que se tratan de dos especies diferentes.

Clasificación de *Chenopodium quinoa* Willd.

División: Magnoliophyta

Clase: Magnoliopsida

Subclase: Caryophyllidae

Orden: Caryophyllales

Familia: Chenopodiaceae

Género: ***Chenopodium***

Especie: ***Chenopodium quinoa* Willdenow**

Morfología

Presenta una raíz que se ramifica en raíces secundarias, terciarias, etc. La longitud de la raíz principal alcanza hasta 1.5 m. Tanto la ramificación como la profundidad le confieren a la planta resistencia a la sequía (Gandarillas, 1979).

Tallo

El tallo es cilíndrico, recto y la altura va de 0.5 a 3.8 m dependiendo de la variedad y condiciones ambientales, siendo firme la corteza pero suave la médula. El color del tallo varía y puede ser verde, amarillo, rojo, púrpura o anaranjado (Gandarillas, 1979).

A lo largo del tallo se encuentran ramas con disposición alterna.

Hojas

En posición alterna a lo largo y alrededor del tallo, de forma romboidal o triangular, con bordes dentados, lisos o aserrados, de color rojo, púrpura o verde y están recubiertas de cristales de oxalato de calcio (Gandarillas, 1979).

Inflorescencia

Es una panoja típica, constituida por ejes central, secundarios, terciarios y pedicelos que sostienen a los glomérulos, es característica la disposición de las flores y el eje principal está más desarrollado que los secundarios. La panoja puede ser laxa (amarantiforme) o compacta (glomerulada), o de forma intermedia.

La longitud de la panoja es variable, ya que depende del genotipo, del lugar donde se desarrolla y de las condiciones de fertilidad del suelo; alcanza de 30 a 80 cm de longitud, el número de glomérulos por panoja varía de 80 a 120 y el número de semillas en toda la inflorescencia es de 100 a 3000 (Gandarillas, 1979).

Flores

Son pequeñas, incompletas, sésiles y desprovistas de pétalos, constituidas por una corola formada por cinco piezas florales tepaloides.

Las flores presentan un perigonio sepaloide rodeado de cristales de oxalato de calcio, un androceo con cinco estambres y filamentos cortos y un gineceo con estigma central, plumoso y ramificado con dos o tres ramificaciones estigmáticas, ovario elipsoidal, súpero, unilocular, las flores hermafroditas, en el glomérulo son apicales y sobresalen a las pistiladas (Gandarillas, 1979).

Fruto

El fruto maduro es un aquenio de simetría dorsiventral, tiene forma cilíndrico-lenticular, levemente ensanchado hacia el centro; su diámetro promedio es de 2.5 mm y su espesor de 1 mm, está constituido por el perigonio que envuelve a la semilla por completo y contiene una sola semilla, de coloración variable (Gallardo, 1997).

Semilla

Es de forma lenticular, proviene de un óvulo de tipo campilotropo y presenta tres partes bien definidas que de afuera hacia adentro son: la testa, el endospermo, el embrión y el perispermo. El endospermo está constituido por cuatro capas: la externa de superficie rugosa quebradiza, con sustancias denominadas saponinas que le dan un sabor amargo al grano (Villacorta y Talavera, 1976).

En el embrión sobresalen sus dos cotiledones y la radícula y constituye el 30% del volumen total de la semilla madura (Carrillo, 1992).

Fenología de la quinua

Presenta fases fenológicas marcadas y diferenciables, las cuales permiten identificar los cambios que ocurren durante el desarrollo de la planta. Mujica y Canahua (1989) han determinado doce fases fenológicas: (1) de emergencia (7-10 días después de la siembra); (2) 2 hojas verdaderas (15-20 días después de la siembra); (3) 4 hojas verdaderas (25-35 días después de la siembra); (4) 6 hojas verdaderas (35-45 días después de la siembra); (5) ramificación (45-50 días después de la siembra); (6) inicio de la formación de la panoja (55- 60 días después de la siembra); (7) plena formación de la panoja (65-70 días después de la siembra); (8) inicio de la floración (75-80 días después de la siembra); (9) antesis (90-100 días después de la siembra); (10) grano lechoso, cuando los frutos que se encuentran en los glomérulos adquieren un aspecto blanquecino y cuando se presionan dejan salir el perispermo, un líquido lechoso (100-130 días después de la siembra); (11) grano pastoso, el perispermo que antes tenía un aspecto lechoso ahora presenta una consistencia más sólida, de tipo pastosa de color blanco (de 130-160 días después de la siembra); (12) madurez fisiológica (160-180 días después de la siembra).

Biología floral

En la misma panoja se encuentran flores hermafroditas, pistiladas (femeninas) y androestériles, lo que indica que *Chenopodium quinoa* podría tener hábito tanto autógeno como alógeno. Falta determinar con precisión el porcentaje de alogamia para algunos genotipos, sin embargo se estima que tienen 10% de polinización cruzada (Rea, 1969).

Las flores pueden abrir al mismo tiempo (homogamia) aunque también se presenta protoginia y protandria (Gandarillas, 1967) por lo que en una misma planta se pueden encontrar óvulos y embriones en los diferentes estadios.

Gandarillas (1967), encontró que las flores de la quinua permanecen abiertas de 5 a 7 días, observó presencia de flores hermafroditas y pistiladas, cuyo porcentaje fue variable, el tiempo en que dura la floración en una misma inflorescencia es de 12 a 15 días, así mismo, las flores hermafroditas y pistiladas en la misma panoja abren al mismo tiempo (homogamia).

Usos

Planta

La quinua tiene múltiples usos: alimenticio, medicinal, ornamental e industrial. En la alimentación humana se emplea como hortaliza de hoja e inflorescencia y como forraje para los animales. En cuanto a su uso medicinal, los nativos de los Andes utilizan las cenizas del tallo en cataplasmas contra fracturas y torceduras, además de que el agua donde lavan la planta es usada para evitar la caída del cabello (Fernández, 1969), también le dan un uso en el control de plagas y parásitos que afectan a los animales domésticos. Su uso industrial consiste en que el tallo obtenido después de la cosecha del grano se emplea como combustible así como para la elaboración de cartón y triplay debido a su concentración de celulosa.

También se usa como tutor en siembras asociadas, y hasta en ritos ceremoniales y creencias populares (Ortega, 1992).

En el caso de la alimentación humana las semillas se utilizan previa eliminación del contenido amargo en ensaladas, entradas, guisos, sopas, postres, bebidas, pan, galletas, tortas, pudiendo prepararse en más de cien formas diferentes (Ortega, 1992).

La proteína de la quinua es de excepcional calidad, que supera, en crudo y en cocido a la de la caseína, por lo que las tortas de germen exprimido pueden transformarse en un importante complemento proteico para mejorar la calidad nutricional de la alimentación de seres humanos y de ganado (Kiwigen, 2001).

Las semillas germinadas son también un alimento exquisito y muy nutritivo sobre todo para las personas vegetarianas.

Un cultivo espacial

La quinua fue seleccionada por la NASA para alimentar a los astronautas debido a su alto valor nutritivo, por su aprovechamiento integral, por la brevedad del ciclo de cultivo y por su capacidad de crecer en condiciones adversas. Por todo ello, fue considerada por la agencia espacial norteamericana como cultivo CELSS (Controlled Ecological Life Support System). El concepto CELSS se aplica a las plantas que sirven para remover el dióxido de carbono de la atmósfera y al mismo tiempo, generan alimentos, oxígeno y agua para las tripulaciones durante las misiones espaciales de larga duración. Los criterios para

seleccionar estos cultivos incluyen la composición de nutrientes, el índice de cosecha, su estatura y la duración del ciclo de vida (Durtschi, 1999).

Estos granos se cultivan en los viajes espaciales desde 1989. Ese año, la quinua germinó y floreció en el espacio durante el vuelo orbital de la Estación Espacial Alpha. Por sus magníficas cualidades pasó a formar parte habitual del menú de los astronautas (Durtschi, 1999).

Aceite

Además de su importante valor proteico, la quinua se destaca del resto de los cereales por su importante contenido y calidad de aceite. Se estima que el aceite de quinua podría seguir el camino del maíz, que se difundió por un lado, gracias al contenido y composición del aceite, pero fundamentalmente por la demanda de otros productos derivados de este grano, tales como edulcorantes, etanol y almidón (Pantanelli, 1999).

El grano de quinua posee un contenido de aceite promedio del 6%, superior al del maíz. La composición de ácidos grasos del aceite de la quinua es similar a la del maíz. Las altas concentraciones de ácido oleico y linolénico los hacen muy susceptibles a la rancidez, pero ambos aceites tienen altos contenidos de antioxidantes naturales llamados isómeros de tocoferol (Pantanelli, 1999).

Saponinas

Son sustancias que se encuentran en la superficie del grano, poseen propiedades detergentes muy fuertes, forman espuma estable en soluciones acuosas y presentan actividad hemolítica y sabor amargo son tóxicas para animales de sangre fría. Estas saponinas pueden encontrar nichos de mercado en la industria farmacéutica o en la de pesticidas. Actualmente existe algún uso de saponinas en la industria farmacéutica, de cosméticos, de alimentos, en detergentes y en la industria minera. Por ejemplo, en las formulación de jabones, champúes y sales de baño, frecuentemente se utilizan concentraciones de 5-6% de saponinas. Otras aplicaciones incluyen su uso en dentífricos y como emulsificantes. Debido a su toxicidad diferencial en diversos organismos, estos compuestos fueron estudiados como posibles insecticidas naturales que no generarían efectos adversos animales y en el hombre. Los investigadores también se interesan en las propiedades antibióticas y fungistáticas, pero fundamentalmente farmacológicas de las

saponinas, dado que tienen la capacidad de inducir cambios en la permeabilidad intestinal, lo que podría ayudar en la absorción de ciertas drogas y de generar efectos hipocolesterolémicos (Kiwigen, 2001).

Ventajas

La quinua presenta por un lado una importancia de tipo alimenticio debido a su alto valor nutritivo, y por otro lado tiene ventaja sobre otros cultivos por ser resistente a condiciones adversas, tales como: sequías, heladas, radiaciones solares intensas y cambios de temperatura.

Se desarrolla en suelos alcalinos o ácidos y en regiones con altitudes de 0 a 4,000 m, por tanto, la quinua puede cultivarse en zonas que presentan problemas tanto climáticos como edáficos. Se cultiva en forma extensiva y no requiere tecnología y cuidados laborales especiales en su cultivo (Gandarillas, 1979).

Mejoramiento genético de quinua

En nuestro país se han realizado pocos trabajos en quinua, en El Colegio de Postgraduados, se generaron varios estudios relacionados con la adaptabilidad a salinidad y sequía (Pérez, 1988) y con las respuestas morfológicas y fisiológicas al déficit hídrico (Espíndola, 1986).

En 1987 se estableció en el Centro de Investigación y Desarrollo Agropecuario del municipio de Metepec, Estado de México (ICAMEX), en conjunto con el Instituto Nacional de Investigaciones Nucleares (ININ), un programa de evaluación de la adaptabilidad de distintas variedades de quinua para ofrecerlas como alternativa a los agricultores de zonas marginales en México. Como resultado, se seleccionaron a las variedades Sierra Blanca, Isluga, Barandales y Lipez como las de mayor adaptabilidad al Valle de Toluca, Estado de México (Hernández y Rodríguez, 1992).

Sin embargo, la presencia de las saponinas en el episperma del grano representa un problema para la comercialización y consumo de la quinua.

Por lo anterior una de las líneas más importantes de mejoramiento genético de este seudocereal es la reducción del contenido de saponinas vía la búsqueda de variedades de bajo contenido de estos metabolitos (Burnouf-Radosevich, 1988).

En 1992 el ININ inició un programa del cual se obtuvieron líneas mutantes con reducción de hasta 45% de saponinas en las variedades Isluga y Barandales (Fernández, 1996) y en 1999 la División Conjunta FAO/OEA sobre la aplicación de Técnicas Nucleares en la Agricultura y la alimentación, auspició un programa sobre cultivos olvidados, apoyando a México en la investigación de la quinua a través de un programa conjunto entre la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), el ININ, ICAMEX y la Facultad de Ciencias Agrícolas de la UAEM, en donde se contempló el rescate de las líneas generadas por mutagénesis, la incorporación de nuevas líneas cedidas por el Banco Nacional de Germoplasma, así como el estudio de los recursos genéticos de especies del género *Chenopodium* afines a la quinua.

Recientemente se ha podido establecer la afinidad genética entre la quinua y otras especies como *Chenopodium berlandieri* (cvs. huauzontle y chíá roja). Ruas *et al* (1999) estableció mediante el uso de marcadores moleculares (RAPD's) las relaciones filogenéticas entre estas especies y determinó la cercanía genética entre ambas, abriendo la posibilidad de hibridaciones y transferencia de genes de interés; en vista de que los cultivares huauzontle y chíá al ser de bajo contenido de saponinas, pueden ser usados para obtener variedades que también sean de una proporción muy baja de saponinas pero que sean de un alto valor nutritivo como la quinua.

En otras especies se han utilizado el Cultivo de Tejidos Vegetales como una herramienta en los programas de mejoramiento genético ya que permite el rescate de embriones híbridos provenientes de cruza intergenéricas e interespecíficas, así como por problemas de incompatibilidad genética o androesterilidades.

Cultivo de Tejidos Vegetales

El cultivo de tejidos vegetales es una rama de la Biología que basada en la totipotencialidad celular ha establecido un conjunto de técnicas que hacen posible dividir un organismo en sus bloques constituyentes y cultivar asépticamente *in vitro*: protoplastos, células, tejidos, órganos, embriones y plántulas en condiciones controladas (medio nutritivo, luz, temperatura, atmósfera, pH, reguladores de crecimiento, etc.) permitiendo al investigador variar las condiciones de cultivo y/o el tipo de explante y llegar a dirigir las respuestas morfogénicas y biosintéticas de las células, pudiendo lograr una gran variedad de objetivos tanto en investigación básico como aplicada (Chávez, 2001). El cultivo *in vitro* se ha empleado en la regeneración de plántulas de diferentes especies ayudando a resolver limitantes en la propagación de nuevas variedades, especies o cultivos alternativos para la producción de alimentos de alta calidad (Conger, 1987).

Cultivo de embriones

Dentro de las técnicas de cultivo de tejidos existe el cultivo de embriones cigóticos que consiste en el aislamiento y crecimiento *in vitro*, en condiciones estériles en un medio nutritivo de un embrión cigótico maduro o inmaduro con el fin de obtener una planta viable (Bridgen, 1994).

Aplicaciones prácticas del cultivo *in vitro* de embriones

El cultivo de embriones cigóticos *in vitro* puede acortar el ciclo reproductivo al superar la dormancia de las semillas, también resulta una excelente forma de estudiar diversos procesos como su nutrición y metabolismo en diferentes estadios de desarrollo, así como para localizar sitios de promotores e inhibidores de la germinación para estudios de embriogénesis y criopreservación (Grout, 1986).

El cultivo de embriones permite la germinación de semillas de orquídeas sin la presencia de organismos simbióticos que de otra manera no permitiría superar la dormancia natural de estas semillas impuesta por el embrión rudimentario que presentan; ***Cattleya elongata***, ***Dendrobium stratiotes***, ***Epidendrum tampense***, son sólo algunos ejemplos

de especies de orquídeas cuyas semillas han sido germinadas mediante el cultivo de embriones (Raghavan, 1982).

De las aplicaciones del cultivo de embriones, la que ha tenido más importancia ha sido el rescate de embriones que vienen del producto de cruzas intergenéricas e interespecíficas (Tabla 1). Muchos híbridos valiosos son abortados como embriones inmaduros por diversos mecanismos de incompatibilidad sexual existente entre plantas que impiden una adecuada nutrición(Thorpe, 1978).

Tabla 1. Embriones híbridos cultivados *in vitro* producto de cruzas intergenéricas e interespecíficas

Especie	Explante	Medio de cultivo	Respuesta	Referencia
<i>Vigna unguiculata</i> X <i>V. vexillata</i>	embrión cigótico inmaduro	MS + reguladores de crecimiento	plántulas	Gomathinayagam, 1998
<i>Pelargonium</i> X <i>hortorum</i>	embrión cigótico maduro	White sin reguladores de crecimiento	plántulas	Scemama, 1989
<i>Brachiaria ruzizensis</i> X <i>B. brizantha</i>	embrión cigótico inmaduro	MS modificado+ reguladores de crecimiento	brotos y callo	Rodrigues-Otubo, 2000
<i>Fragaria vesca</i> X <i>Potentilla fruticosa</i>	embrión cigótico inmaduro	MS + reguladores de crecimiento	callo y brotes	Silva, 1996

Tabla 2. Cultivo *in vitro* de embriones híbridos en el que se ha logrado un mejoramiento

Especie	Explante	Mejoramiento	Referencia
<i>Vigna unguiculata</i> X <i>V. vexillata</i>	embrión en estadio corazón	resistencia contra patógenos	Gomathinayagam, 1998
<i>Brachiaria ruziziensis</i> X <i>B. brizantha</i>	embrión inmaduro	adaptación a suelos infértiles resistencia a insectos	Rodrigues-Otubo, 2000
<i>Brassica</i> X <i>Sinapis</i>	embrión en estado corazón	individuos que sintetizan 2 compuestos utilizados como condimentos	Momotaz, 1998
<i>Brassica campestris</i> X <i>Brassica oleracea</i>	embrión en estado torpedo	resistencia a <i>Plasmodiophora brassicae</i>	Ross, 1980

El aislamiento y cultivo en un medio nutritivo adecuado permite superar estas barreras post-cigóticas, por lo que se han podido obtener híbridos interespecíficos de especies de interés agronómico (Tabla2), las cuales permiten reunir en un solo individuo, las características deseables de dos especies o géneros diferentes, por lo que de lo anterior se puede notar que la más importante aplicación de las técnicas de cultivo *in vitro* de embriones, es la de poder superar la inviabilidad de los embriones híbridos (Thorpe, 1978).

Requerimientos para el cultivo in vitro de embriones

El éxito del cultivo de embriones depende de ciertos factores como pueden ser: (1) El genotipo de la planta; es decir que existen grandes diferencias en cuanto a la capacidad de división celular y regeneración entre embriones de una misma especie; en algunas ocasiones las respuestas observadas se han relacionado solo a los genes nucleares pero también son debidas a la interacción de numerosos genes. (2) Las condiciones de

crecimiento de la planta donadora, ya que George (1993) menciona que es necesario que los explantes deben ser obtenidos de plantas vigorosas que han sido mantenidas en crecimiento activo sin estrés de manera que se obtenga un material uniforme al momento de efectuar el cultivo *in vitro* por tanto es necesario mantener a las plantas bajo condiciones controladas de invernadero. (3) Su estado de desarrollo al momento del aislamiento, generalmente se menciona que cuando se cultivan embriones en una etapa embrionaria muy temprana tienen una gran capacidad de división celular lo que lleva a formar callo que en muchas ocasiones es embriogénico, sin embargo de acuerdo a Monnier (1980) los embriones en una etapa muy temprana de desarrollo son virtualmente imposibles de ser cultivados *in vitro* debido a sus requerimientos nutricionales. (4) La composición del medio nutritivo, ya que los embriones inmaduros tienen necesidades más críticas por el cambio de una etapa heterótrofa a una autótrofa (Pierik, 1990).

Para el cultivo *in vitro* de embriones es necesario considerar varios aspectos:

A. Desinfección: ya que en muchos casos, los embriones están localizados en un ambiente estéril dentro del fruto inmaduro y la desinfección de los embriones no es necesaria, más bien los frutos inmaduros son desinfectados superficialmente y los embriones son disectados asépticamente de los tejidos circundantes.

B. disección: presenta mayor número de problemas; es posible disectar embriones grandes sin la ayuda de microscopio, pero hay que recurrir a éste en el caso de que los embriones sean muy pequeños. El método de disección de embriones inmaduros varía dependiendo de la especie, pero siempre se debe conocer su posición dentro del fruto inmaduro para saber el punto en donde realizar la incisión, la cual, en muchas especies se realiza en el polo micropilar y se aplica un poco de presión en el lado opuesto para obligar la expulsión del embrión.

C. Medio nutritivo: Monnier (1995) señaló que los embriones en cultivo son muy sensibles a las soluciones, y que se recomienda usar ajustes y modificaciones empíricas para diseñar un medio de cultivo que promueva un crecimiento embrionario con un mínimo de toxicidad. El nitrógeno aportado a los embriones en cultivo puede ser de dos formas: orgánico e inorgánico, la forma que se emplea con más frecuencia es la inorgánica, siendo el nitrato de amonio y el nitrato de potasio las fuentes nitrógeno inorgánico más usadas. Según Hu (1986) se requiere la presencia de algunas formas de nitrógeno

reducido en el medio para mantener el crecimiento de embriones cigóticos ya que el nitrato solo es insuficiente. El amonio es esencial en el medio para un adecuado crecimiento y diferenciación de embriones inmaduros (Matsubara, 1964), y en combinación con un ácido orgánico particularmente con el malato o citrato.

También se puede añadir algunos aminoácidos o bien amidas como fuente de nitrógeno, y entre ellas la glutamina es la más efectiva en estimular el crecimiento de embriones inmaduros *in vitro*.

Muchos autores coinciden en que la sacarosa es la mejor fuente de carbón para los embriones en cultivo y en general se requiere de una alta concentración de sacarosa en el cultivo de embriones inmaduros (Sharma, 1996).

Los carbohidratos aparte de ser una fuente de energía, tiene un papel en el potencial osmótico del medio en el cultivo de embriones jóvenes; en general se emplean altas concentraciones para embriones inmaduros al tratar de imitar el elevado potencial osmótico dentro del saco embrionario (Bridgen, 1994).

Los embriones maduros se cultivan generalmente sobre un medio con sacarosa al 2-3%; no obstante algunos investigadores también han empleado otras sustancias como manitol o glicerol (Rietsema, 1953) mientras que los embriones inmaduros tienen un mejor comportamiento con concentraciones más elevadas del 8-18% produciéndose inhibiciones en el crecimiento si se utilizan concentraciones más altas.

D. Reguladores de crecimiento: los reguladores de crecimiento son necesarios para el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros y para una propagación masiva (Hu, 1986). Entre los reguladores de crecimiento reportados para el cultivo de embriones inmaduros se encuentran giberelinas como el ácido giberélico, auxinas, como el AIA y ANA y citocininas como BA y K. Cuando las citocininas son empleadas como la única fuente exógena de hormonas promueven la división y alargamiento y cuando se combinan con algunas auxinas, pueden favorecer tanto el crecimiento como la diferenciación de los embriones (Brigden, 1994).

Hu (1986) menciona que el ácido abscísico suplementado al medio de cultivo puede evitar la germinación precoz de embriones y estimular el crecimiento embrionario.

Sharma (1996) indica que los efectos de los reguladores de crecimiento muy probablemente están relacionados de alguna manera con la permeabilidad celular y la entrada de iones a las células.

E. Luz: para el cultivo de embriones inmaduros, muchos investigadores realizan un experimento preliminar para determinar si la incubación en luz u oscuridad es la más conveniente para una determinada especie, sin embargo algunos emplean un método que consiste en examinar *in situ* la estructura de las cubiertas protectoras que rodean al embrión en desarrollo en la flor. Es decir, se podría realizar la incubación en oscuridad si la cubierta externa del óvulo fecundado es lo suficientemente gruesa, de manera que no permita el paso de la luz del sol, o en luz si las capas son permeables a ella, se debe recordar que múltiples reportes de embriogénesis somática señalan que las condiciones de incubación fueron en oscuridad, imitando las condiciones naturales (Litz et al., 1998) aunque esto no significa que si la incubación se realiza de manera opuesta a las condiciones que se observan no se pueda obtener un buen crecimiento (Hu, 1986).

Cultivo de Tejidos de la Familia Chenopodiaceae

El trabajo acerca de métodos de cultivo *in vitro* aplicados a la familia Chenopodiaceae ha sido muy limitado. Los trabajos publicados se refieren en gran medida a ***Beta vulgaris*** (betabel) y algunos a ***Spinacia*** (espinaca) y ***Atriplex*** (Tabla 3).

Tabla 3. Diversas especies de familia Chenopodiaceae que han sido propagadas mediante Cultivo de Tejidos Vegetales

Espece	Explante	Medio de cultivo	Reguladores de crecimiento	Respuesta	Referencia
<i>Beta vulgaris</i>	embriones cigóticos maduros	MS modificado	-	embriones somáticos	Tenning, 1992
<i>Beta vulgaris</i>	hojas	MS	TIBA	embriones somáticos	Moghaddam, 2000
<i>Beta vulgaris</i>	ovarios no fecundados	MS	BA, ANA	brotos	Gurel, 1998

<i>Beta vulgaris</i>	peciolos	Medio B5, MS modificado	BA, IBA	brotos	Freytag, 1988
<i>Spinacia oleracea</i>	hojas	MS	BA, 2,4-D	protoplastos	Goto, 1999
<i>Spinacia oleracea</i>	raíces adventicias	MS	ANA, GA ₃	brotos	Komai, 1996
<i>Spinacia oleracea</i>	cotiledones hipocótilos raíces y hojas	MS 50%	AIA, K, GA ₃	embriones somáticos	Komai, 1996
<i>Atriplex canescens</i>	hojas	MS	IBA, GA ₃	brotos	Mei, 1997
<i>Atriplex nummularia</i>	-	MS	K	brotos	Reddy, 1996
<i>Salicornia bigelovii</i>	yemas axilares	MS y vitaminas del medio Gamborg	BA, ANA	brotos	Lee, 1992

Así mismo, Hussemann y Barz (1977) obtuvieron la inducción de callo a partir de segmentos de hipocótilo foto-autótrofo de ***Chenopodium rubrum***, que puede ser empleado en estudios de diferenciación en cloroplastos y fotosíntesis.

Cultivo de Tejidos de *Chenopodium quinoa* Willd.

En 1982 Burnouf-Radosevich describió la propagación vegetativa de dos variedades de quinua (Real de Puno y Blanca de Junin) a partir de segmentos de hipocótilo como fuente de explantes, 18 días después de la germinación y cultivados en medio MS probando el efecto de auxinas como el 2,4-D, ANA e IBA y después en combinación con la Kinetina (Burnouf-Radosevich, 1988).

En 1985 nuevamente Burnouf- Radosevich realizó la propagación de estas dos variedades de quinua a partir de yemas axilares probó tres medios de cultivo, la solución de Knop, el medio MS y el medio B5, obtuvo una gran cantidad de brotes en el medio MS en comparación con los otros sin embargo presentaron clorosis por lo que decidió efectuar una modificación del medio B5 no sólo para obtener los brotes sino para disminuir la clorosis.

Usó como reguladores de crecimiento BA, ANA y GA₃, sin embargo se tuvieron algunos problemas en cuanto el enraizamiento.

Gómez (1990) realizó una investigación con el fin de caracterizar la tolerancia relativa a la salinidad de callos y células en suspensión de quinua comparando diferentes variables estimadoras de crecimiento y dos estados físicos del medio de cultivo.

Por otro lado, hasta donde se sabe no se ha reportado el cultivo *in vitro* de embriones en **C. quinoa**, ni se han descrito las distintas etapas embrionarias.

B. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la presencia de saponinas representa una fuerte limitante para el uso de **C. quinoa**, y a que trabajos recientes han establecido que la especie **C. berlandierii** (cv. chia roja) está cercanamente emparentada con la quinua y no contiene saponinas, la posibilidad de hibridizarlas se presenta como una alternativa viable y a corto plazo para de esta manera mejorar a **C. quinoa** y obtener plantas con bajo o nulo contenido de saponinas. Por esta razón es importante conocer el comportamiento de embriones cigóticos inmaduros de la quinua cultivados *in vitro* ya que en investigaciones futuras los híbridos podrían presentar problemas para lograr su madurez y su rescate *in vitro* sería necesario.

C. OBJETIVOS

Objetivo general

- Establecer condiciones para el cultivo *in vitro* de embriones cigóticos inmaduros de **Chenopodium quinoa Willd.** var. Barandales.

Objetivos particulares

- Describir las características morfológicas que presentan las flores asociadas con la presencia de embriones de **Chenopodium quinoa Willd.** var. Barandales
- Establecer el método de desinfección y aislamiento, así como los medios nutritivos para activar el desarrollo de los embriones
- Describir la respuesta *in vitro* de cada uno de los estadios embrionarios
- Establecer los reguladores de crecimiento y los tratamientos en los cuales existe la mejor respuesta morfogenética.

II. MATERIALES Y METODOS

Material biológico

A partir de 7 individuos maduros con aproximadamente 120 días de desarrollo de ***Chenopodium quinoa Willd.*** variedad Barandales, cultivados a partir de semillas bajo condiciones de invernadero en la Universidad Autónoma del Estado de México y posteriormente subcultivadas en una parcela del ININ; se obtuvieron semillas en diferentes estados de desarrollo.

Las plantas tuvieron las siguientes características: una altura entre 70 y 80 cm desde el suelo hasta el ápice, en la base presentaban amarillamiento de algunas hojas y un tallo entre 9 y 12 mm de grosor y con inflorescencias de tipo glomerulada en la parte apical, media y basal .

Los pasos seguidos en la caracterización de las flores asociada a la presencia de embriones y su cultivo *in vitro* se muestran en la Figura 2.

Determinación de las características morfológicas de las flores asociadas a la presencia de embriones

Se seleccionaron inflorescencias al azar de la parte apical, media y basal de las plantas con una longitud de 3.5 cm, posteriormente dichas panojas se colocaron en cajas Petri, se observaron las flores mediante un microscopio estereoscópico y se anotaron sus características como diámetro, color y presencia de cristales de oxalato de calcio, posteriormente se efectuaron disecciones de entre 10 y 15 flores, se retiraron los sépalos y se observó la presencia de las anteras, tamaño y color del gineceo y la semilla inmadura. La selección y observación de las panojas continuó durante 3 semanas y en todos los casos se efectuaron ensayos para el aislamiento de los embriones, se realizaron cortes transversales del ovario empezando en la región del micrópilo, se ubicó su posición en el ovario y una vez aislados los embriones se anotaron su color, forma y tamaño mediante una cámara de Neubauer de manera que se pudo establecer la serie de estadios embrionarios asociados a las flores de las cuales fueron aislados.

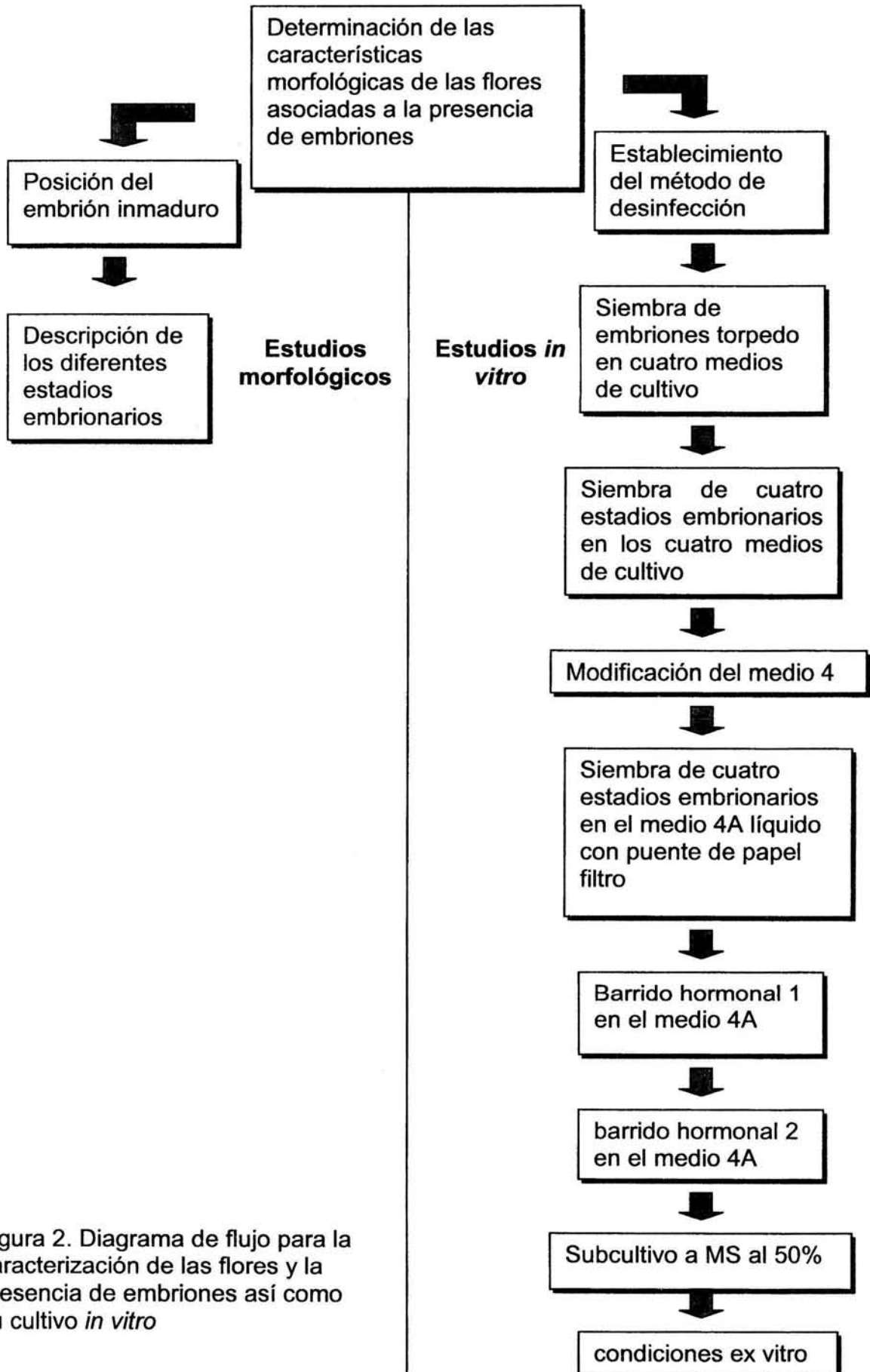


Figura 2. Diagrama de flujo para la caracterización de las flores y la presencia de embriones así como su cultivo *in vitro*

Desinfección del material biológico

La desinfección superficial de las inflorescencias se detalla en la Figura 3.

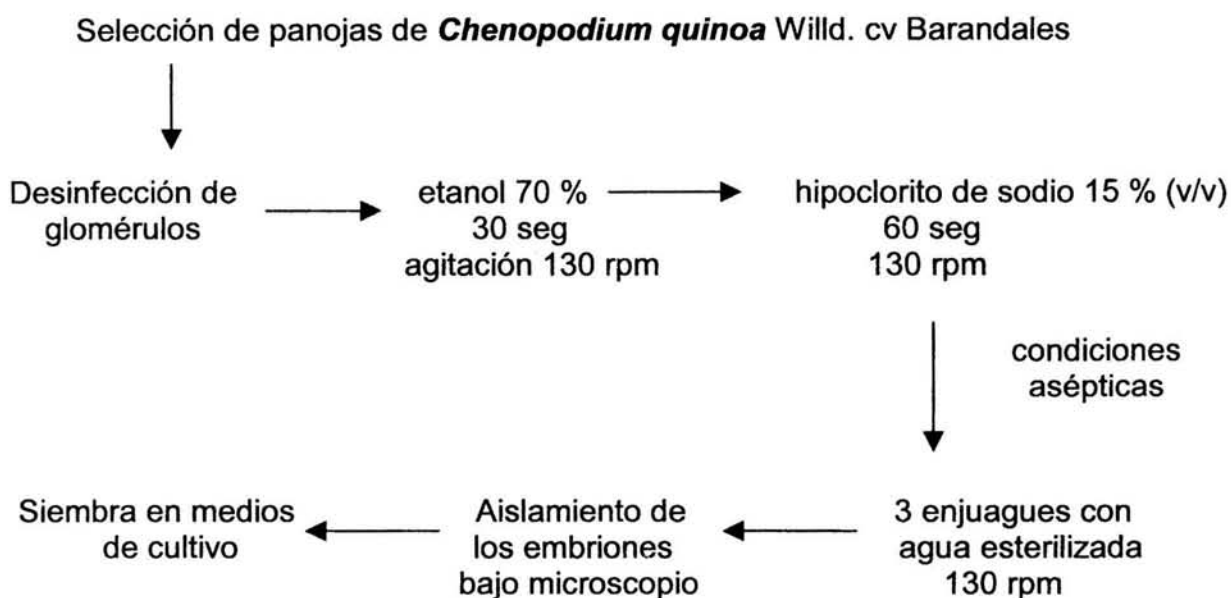


Figura 3. Método empleado para la desinfección y aislamiento de los glomérulos

Método de siembra

Posteriormente, se procedió a la disección de los explantes lo cual se realizó en el área aséptica de una campana de flujo laminar.

El material requerido para la siembra (en el que se incluyen los recipientes con el medio nutritivo, microscopio estereoscópico, pinzas, cubre-bocas y el matraz con las panojas ya desinfectadas) se colocó dentro de la campana de flujo laminar para su esterilización superficial por radiación de luz ultravioleta con una longitud de onda de 2,500 U.Å. durante un periodo de 15 minutos.

Dissección de los embriones

Se colocaron 2 panojas en una de las valvas de la caja Petri y se le añadieron 5 ml de solución de ácido ascórbico (10 mg/l) para evitar la oxidación de los embriones, la disección del embrión se realizó bajo un microscopio estereoscópico con ayuda de pinzas de microdisección.

De la panoja se seleccionó una de las flores y se separó del resto de la inflorescencia, posteriormente se procedió a la disección del perigonio, los cinco sépalos y los restos del androceo (en caso de estar presente) para dejar únicamente el gineceo central.

Una vez hecho lo anterior se retiró la pared más externa del ovario (color verde y de estructura alveolar) para después retirar una segunda capa (más clara que la anterior), finalmente se efectuó una pequeña incisión en la zona ventral, en la cicatriz del receptáculo floral y dirigida hacia la región del funículo y con las pinzas se separó en dos partes y se presionó ligeramente hasta liberar al embrión (Fig 4).

Una vez liberado, el embrión se tomó con las pinzas y se sembró en el medio de cultivo.

Para evitar una alteración en la respuesta sólo se emplearon embriones íntegros en todas sus partes y con el suspensor intacto para los estadios muy inmaduros.

Medios de cultivo

Los medios utilizados fueron 5 (1,2,3,4 y 4A) para su preparación se elaboraron soluciones concentradas de sus diferentes constituyentes orgánicos e inorgánicos, así como de los reguladores de crecimiento en diferentes concentraciones (Apéndice 1).

Los reguladores de crecimiento utilizados fueron las auxinas: AIA y ANA, y la citocininas: BA y K, su elaboración se detalla en el Apéndice 2.

Inicialmente se ensayaron 4 medios de cultivo sólido (1,2,3 y 4) (Tabla 4); los medios 1 y 2 fueron usados por Burnouf-Radosevich (1985) para propagar diversas variedades de quinua a partir de segmentos de hipocótilo, mientras que los medios 3 y 4 fueron empleados por Bennici (1992) para el establecimiento y regeneración de plantas de varias especies de amaranto y que en el Laboratorio de Genética Vegetal del ININ, han sido

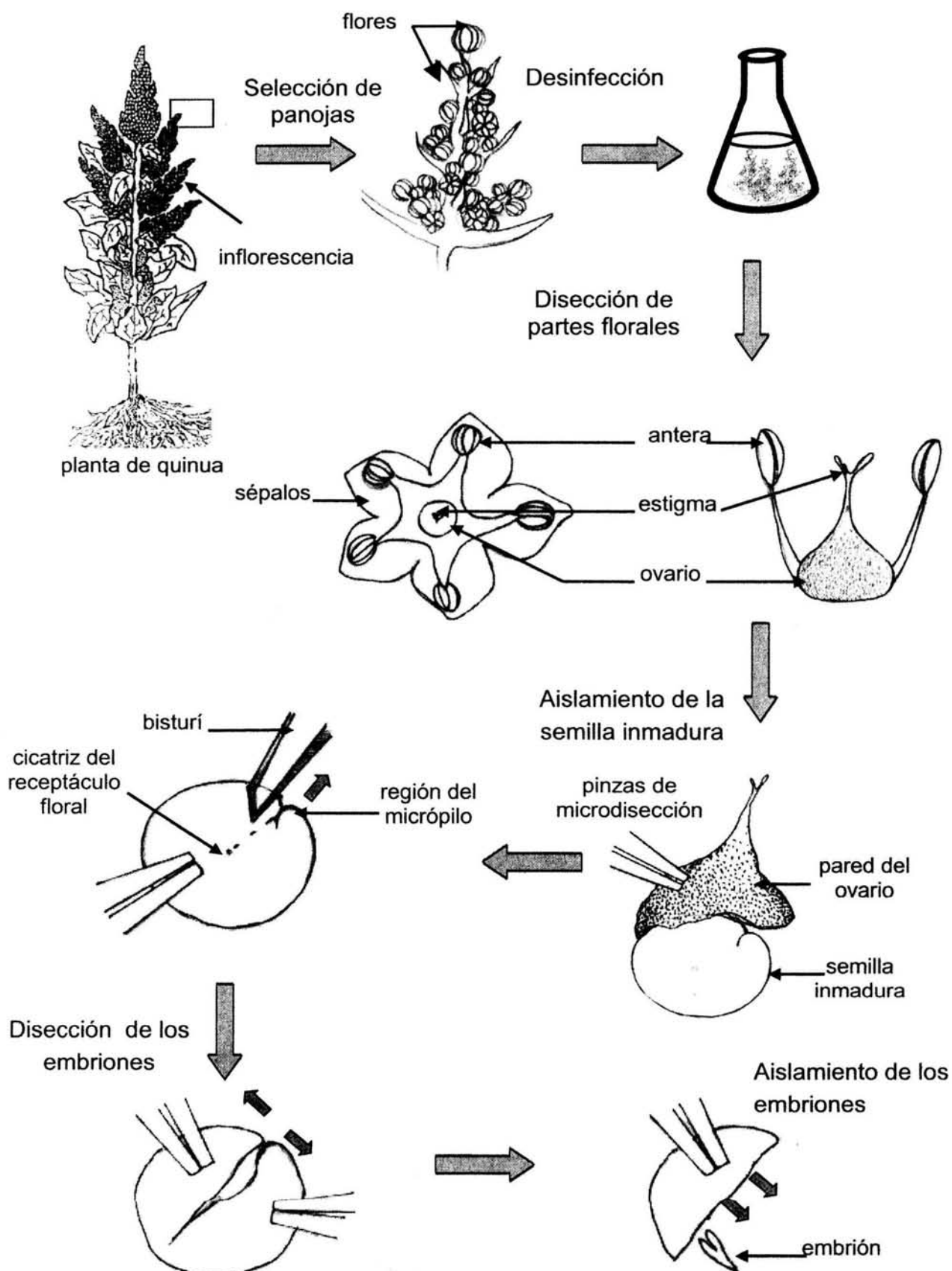


Figura 4. Aislamiento y disección de los embriones inmaduros de *C. quinoa* Willd.

empleados con éxito para la germinación de semillas de algunas variedades de ***Chenopodium quinoa***.

Tabla 4. Medios nutritivos utilizados inicialmente para el cultivo *in vitro* de embriones inmaduros de ***C. quinoa***. (Apéndice 1)

1	2	3	4
sales del medio B5	sales del medio B5 modificadas	sales del medio MS al al 50%	sales del medio MS al 100%
vitaminas del medio B5	vitaminas del medio B5 <i>myo</i> -inositol	sin vitaminas	vitaminas del MS
sacarosa 100% pH 5.5	sacarosa 50% pH 5.5	sacarosa 50% pH 5.5	sacarosa 100% pH 5.6
BA 0.22 mg/l ANA 0.9 mg/l agar 8.5 g/l	BA 0.22 mg/l ANA 0.18 mg/l agar 8.5 g/l	sin reguladores de crecimiento agar 8 g/l	kinetina 3 mg/l AIA 0.3 mg/l agar 8 g/l

En todos los casos el medio se vertió en charolas de plástico estériles modelo *Phytatray* (*Sigma*) dentro de la campana de flujo laminar.

Se sembraron 10 embriones en estado torpedo en cada charola y en total fueron 6 charolas por cada medio nutritivo, es decir 60 embriones por medio; a éstas se les colocó "egapack" para que cerraran de manera hermética y se incubaron en una cámara de cultivo en oscuridad, a una temperatura de 25 ± 2 ° C. Después de ocho días se cuantificó el porcentaje de contaminación en todos los cultivos.

Se observó la apariencia de los embriones después de 8 y 26 días en todos los medios. Se cuantificó su longitud después de 10 días de cultivo.

Para comparar la respuesta obtenida en los medios 1, 2, 3 y 4 en cuanto a oxidación y longitud de los embriones se efectuó un análisis de varianza.

Posteriormente, en los primeros 4 medios de cultivo se sembraron 4 estadios embrionarios: corazón, torpedo, torpedo tardío y herradura 10 embriones por cada estado en frascos "Gerber" con 20 ml de medio solidificado con agar *Sigma*, se incubaron en oscuridad envolviéndolos en papel durante 7 días, se colocaron a una temperatura de 25 ± 2 ° C y se evaluó su germinación.

Se efectuaron modificaciones al medio 4 en base a lo recomendado por Monnier (1995) que consistieron en disminuir la concentración de nitrato de amonio, emplear nitrato de potasio; se duplicaron las concentraciones del cloruro de calcio y de los micronutrientes, se disminuyeron las concentraciones de sulfato de fierro y EDTA, se adicionó L-glutamina (Rijven, 1956) y ácido ascórbico. A este medio se le denominó 4A; en el cual se sembraron 30 embriones de los estadios globular, corazón, torpedo y torpedo tardío, el medio fue líquido con puentes de papel filtro.

Se realizó un barrido hormonal (Tabla 5) en el medio 4A líquido con puentes de papel filtro y se utilizaron las combinaciones de distintas concentraciones de dos reguladores de crecimiento: ANA y BA y se sembraron 4 embriones torpedo por frasco, fueron 2 frascos por cada tratamiento hormonal. Se incubación bajo condiciones de 16 h luz y 8 h de oscuridad una temperatura de 25 ± 2 ° C. Se evaluó la respuesta después de 7 y 14 días de cultivo midiendo la longitud de los embriones.

Tabla 5. Tratamientos con reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de embriones en estado torpedo de *C. quinoa* en el medio 4A líquido con puentes de papel filtro.

		ANA (mg/l)			
		0	3	6	9
BA (mg/l)	0				
	3				
	6				
	9				

Se procedió a efectuar un segundo barrido hormonal (Tabla 6) utilizando el mismo medio 4A pero con diferentes reguladores de crecimiento, estos fueron el AIA y la K incrementando las concentraciones, el medio continuó siendo líquido con puentes de papel y se le añadió 10 mg/l de ácido ascórbico. Las condiciones de incubación utilizadas fueron las mismas que en el ensayo anterior.

Después de 7 días en el medio 4A, los embriones fueron subcultivados al medio de cultivo MS sólido al 50 % de sales y sacarosa sin reguladores de crecimiento a las mismas condiciones de incubación; se midió su longitud cada 7 días durante 49 días; se realizó un análisis de varianza y una prueba de Tukey para determinar si existían diferencias significativas entre los tratamientos. También se determinó si existía la presencia de callo y el número de raíces.

Tabla 6. Tratamientos con reguladores de crecimiento para el cultivo *in vitro* de embriones en estado torpedo de *C. quinoa* en el medio 4A líquido con puentes de papel filtro. Periodo de inducción de 7 días y condiciones de incubación de $25 \pm 2^\circ \text{C}$, 16 h luz

		AIA (mg/l)					
		0	3	6	9	12	15
K (mg/l)	0	1	2	3	4	5	6
	3	7	8	9	10	11	12
	6	13	14	15	16	17	18
	9	19	20	21	22	23	24
	12	25	26	27	28	29	30
	15	31	32	33	34	35	36

Finalmente se sacaron las plántulas de los frascos y se colocaron en macetas con una mezcla de suelo rica en materia orgánica esterilizada en un autoclave a 1.5 kg/cm^2 de presión y una temperatura de 120°C durante 20 minutos, para lograr la aclimatización ex

vitro las macetas se cubrieron con una bolsa de plástico transparente la cual se perforó cada 5 días y a los 20 se removi6 completamente.

III. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Características morfológicas externas de las panojas asociadas a la presencia de embriones

De las flores seleccionadas para la disección de los embriones se observaron en ellas una serie de características morfológicas externas que ayudaron a determinar el estadio de desarrollo embrionario.

Al observar las panojas se notó una maduración asincrónica de las flores, las que estaban ubicadas en la parte más basal fueron las primeras en madurar, (20 días después de la primera observación) y posteriormente las de la región media de la planta (aproximadamente 28 días después de la primera observación) y finalmente las de la región apical fueron las últimas que maduraron (35 días después de la primera observación)

Las panojas con las semillas inmaduras formaban grupos compactos y esféricos con pedicelos cortos y muy juntos, presentaron entre 4 y 6 hojas extendidas hacia la base de la inflorescencia de forma triangular bordes dentados con una longitud de 5 cm en promedio y de color verde claro. En la inflorescencia se presentaron entre 11 y 16 hojas lanceoladas de 1.5 cm en la zona basal y en la región apical de 0.5 cm, la flores estaban cerradas y ya no se veían a las anteras sobresalir del perigonio, las flores presentaron un diámetro entre 2 y 2.5 mm con un color verde oscuro así como poca presencia de cristales de oxalato de calcio; las flores en estado inmaduro presentaron una gran cantidad de estos cristales dándoles una apariencia cristalina blanquecina (Figura 5a) y en el interior del ovario se presentó un óvulo de tipo campilótropo (Figura 5c). Después de la antesis conforme transcurrió el desarrollo embrionario, hubo una reducción notable de la cantidad de los cristales en las flores (Figuras 5b y 5d), por tanto para el aislamiento de los embriones se seleccionaron flores que presentaron poca cantidad de dichos cristales. La escasa presencia de cristales se utilizó como primer criterio para determinar la presencia de embriones en las flores.

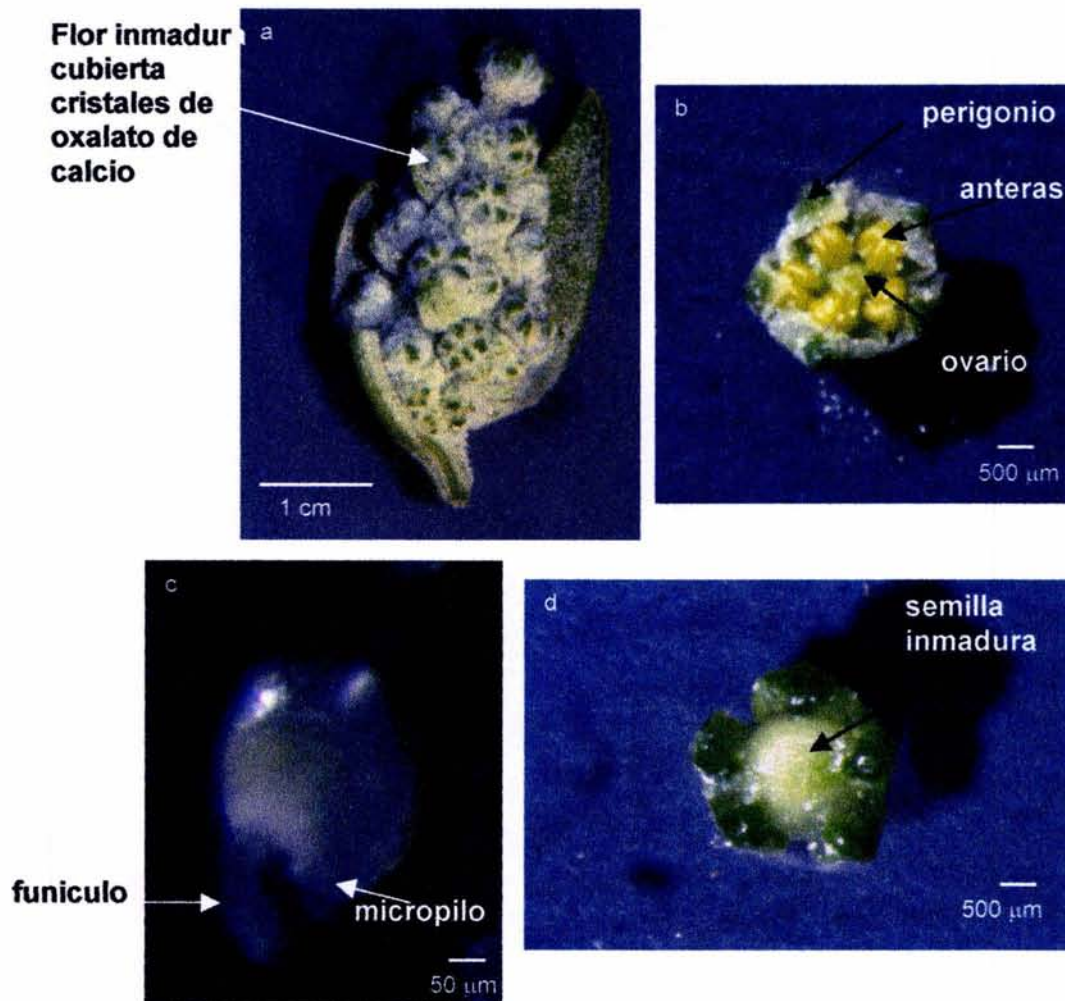


Figura 5. (a) Panoja con flores inmaduras cubiertas con cristales de oxalato de calcio. (b) Flor en anthesis, donde al centro se observa el ovario rodeado por las anteras. (c) Óvulo de tipo campilótropo. (d) Flor con semilla inmadura

Características morfológicas de la semilla inmadura

En muchas de las flores ya no se presentaron las anteras, pero hacia la región central, el fruto inmaduro presentó otras particularidades como se muestra en la Figura 6, las ramificaciones estigmáticas, tuvieron un color café claro y estaban poco turgentes, a diferencia de las flores con anthesis reciente en las que los estigmas tenían un color verde claro translúcido muy turgentes y sobresalían del perigonio.

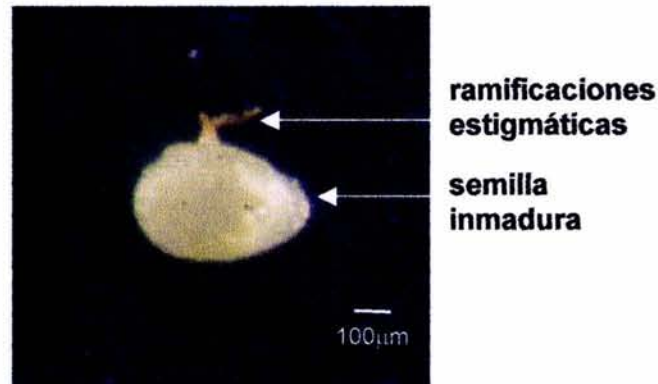


Figura 6. Semilla inmadura donde se muestran las ramificaciones estigmáticas de color café

La pared del ovario presentó una coloración verde clara translúcida con estructura alveolar y dentro se observó la semilla inmadura.

Todas las características anteriores, sirvieron como indicadores de que la fecundación había ocurrido, por lo que a continuación se localizó la posición del embrión en desarrollo.

Posición del embrión en desarrollo

Se encontró que es hacia el centro de la semilla inmadura y al llegar a la madurez, el embrión llega hasta la periferia de la semilla madura provocada por la acumulación del material de reserva.

Una vez ubicada la posición del embrión se identificaron los diferentes estadios embrionarios presentes en los frutos jóvenes así como las características de cada uno (Tabla 7) para posteriormente ser sembrados en los medios nutritivos.

Los estadios embrionarios identificados fueron: globular, corazón, torpedo, torpedo tardío y herradura (maduro).

Tabla 7. Características morfológicas de las flores asociadas con los diferentes estadios embrionarios de *C. quinoa*

Edad (días después de la siembra)	Descripción de la flor	Etapa embrionaria
120	Flor de aproximadamente 1.5 mm de diámetro cerrada con presencia de cristales de oxalato en el perigonio, anteras de color amarillo y ramificaciones estigmáticas de color café	estadio globular
135	Flor de aproximadamente 2 mm de diámetro poca presencia de cristales de oxalato de calcio en el perigonio, el fruto inmaduro de color verde claro y donde la semilla inmadura aun no llena por completo la cavidad del fruto	estadio corazón
150	Flor con un diámetro aproximado de 2.5 mm poca presencia de cristales de oxalato de calcio anteras rara vez presentes y cuando se presentan tuvieron una apariencia oscura, sin ramificaciones estigmáticas y el ovario de color verde	estadio torpedo
165	La flor presentó un diámetro de aproximadamente 2.5 mm muy escasa presencia de cristales de oxalato de calcio, dentro la cavidad del fruto casi era llenada por la semilla inmadura la cual presentaba un color verde pero con algunas zonas de color blanquecino hacia la parte central	estadio torpedo tardío
175	La flor tuvo un diámetro aproximado de 2.5 a 3 mm no presentaron anteras muy escasa cantidad de cristales de oxalato de calcio, sin ramificaciones estigmáticas, la cavidad del fruto se encuentra ocupado en su totalidad por la semilla inmadura la cual tiene un color blanco	estadio herradura

Estadio globular

Las semillas inmaduras que contuvieron embriones en estado globular consistió en que presentaron una longitud promedio de 300 μm con un color verde muy claro y translucido, el embrión no presentó cotiledones y estuvo conformado por un grupo de células con forma algo ovalada y aspecto hialino midió entre 100 y 125 μm de longitud, en ambos polos del embrión se observaron grupos de células y las del extremo basal pudieron corresponder al suspensor, tenían una forma alargada y translúcida (Figura 7).

Es conveniente señalar que el estadio globular fue la última fase que se identificó debido al tamaño tan reducido que presenta el embrión y que aun con el microscopio estereoscópico resultaba difícil de identificar.

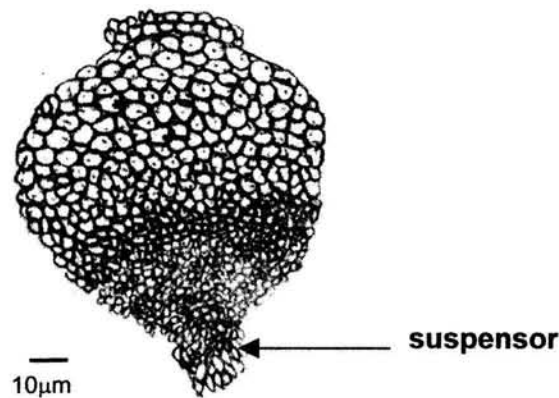


Figura 7. Embrión en estadio globular de *C. quinoa* en la parte inferior se observa el suspensor

Estadio corazón

En este estadio la semilla inmadura tuvo un diámetro promedio de 400 μm y se caracterizó por presentar color verde un poco más oscuro que en el estadio anterior (Figura 8a), el embrión presentó una forma trilobular y se apreciaban los cotiledones aunque como dos prominencias en la parte apical con aproximadamente 250 μm de largo y 150 μm de ancho, aun tenía un aspecto hialino pero de mayor consistencia que el estadio globular y hacia la base se distinguió el suspensor, que se observó como una prolongación longitudinal (Figura 8b).

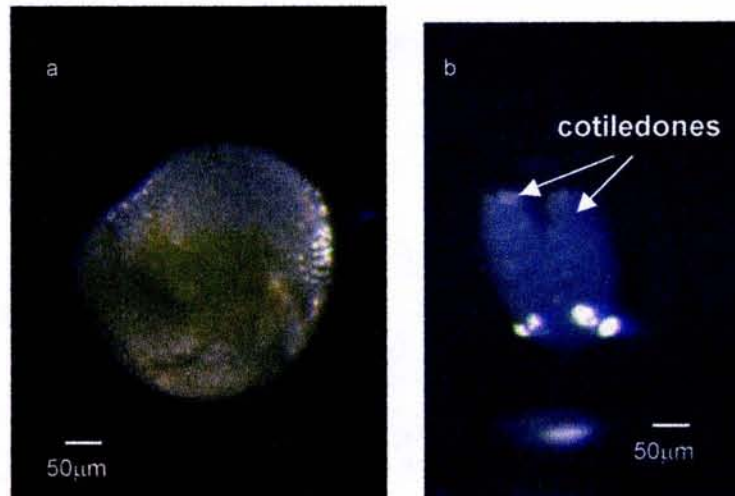


Figura 8. (a) Semilla inmadura que contiene el embrión en estadio corazón (b) de *C. quinoa*

Estadio torpedo

En este estadio la semilla inmadura tuvo un diámetro promedio de 650 μm y se caracterizó por presentar una coloración verde un poco más oscura hacia el centro y más clara y translúcida hacia la periferia (Figura 9a) el embrión también presentó una forma trilobular pero más alargada que la anterior con una longitud de entre 500 a 550 μm y ancho de entre 200 μm , se observó más blanco y compacto que el estadio anterior (Figura 9b).

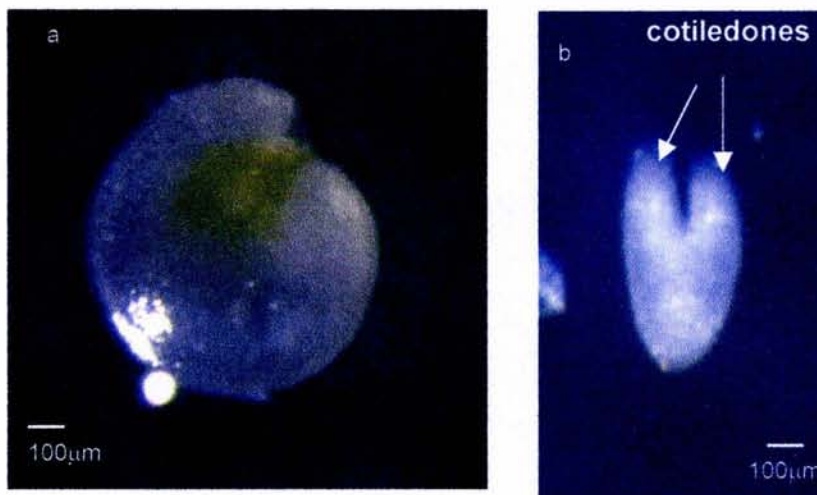


Figura 9. (a) Semilla inmadura que contiene al embrión en estadio torpedo(b) de *C. quinoa*

Estadio torpedo tardío

En esta etapa de desarrollo, la semilla inmadura tuvo un diámetro aproximado de 700 μm (Figura 10a) ocupando la mayor parte del fruto, presentó una coloración verde hacia la periferia y hacia el centro se observaron algunas zonas de color blanquecino, el embrión midió 600 μm de largo y 250 μm de ancho y se distinguieron los cotiledones con una forma ligeramente más alargada que el estadio anterior y representaron un poco menos de la mitad de la longitud del cuerpo del embrión y en medio de los dos se comenzó a distinguir el ápice del brote. El suspensor ya no se observó (Figura 10b).

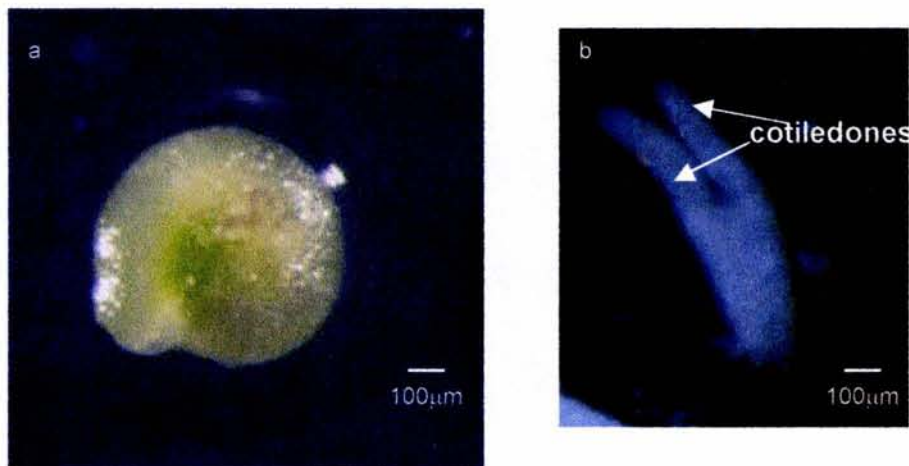


Figura 10. (a) Semilla inmadura que contiene al estado torpedo tardío (b) de *C. quinoa*.

Herradura

En el último estadio, la semilla ya madura había alcanzado un tamaño promedio de 1,500 μm y al aislar el embrión salió un líquido denso de color blanquecino (el perispermo) (Figura 11a).

El embrión se observó alargado en sus cotiledones y región radicular alcanzando una longitud de aproximadamente 2,500 μm y su eje mayor curvo y con una posición periférica con respecto al perispermo de manera que el extremo de los cotiledones se encuentra muy cerca del extremo radicular. El embrión tuvo una coloración blanquecina y opaca presentó la consistencia más sólida que todos los estadios embrionarios anteriores (figura 11b).

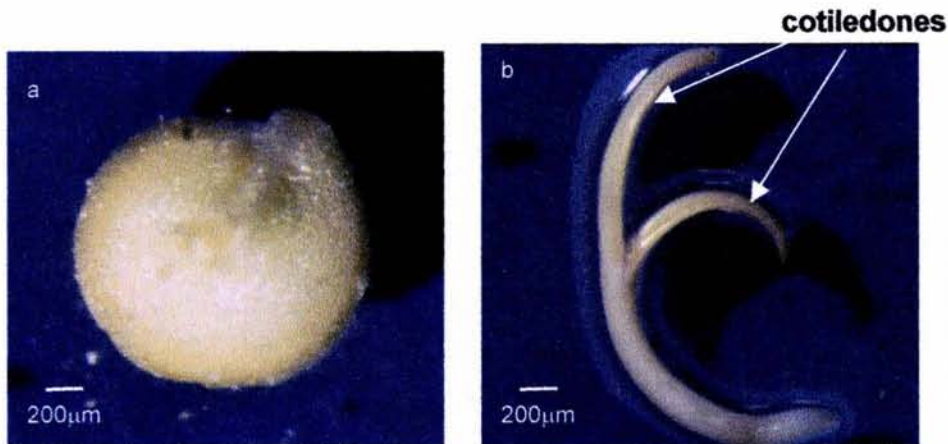


Figura 11. (a) Semilla madura que contiene al embrión en estadio herradura (b) de *C. quinoa*

La descripción de las características morfológicas de las flores asociadas a la presencia de embriones fueron necesarias ya que se debían sembrar embriones inmaduros en diferentes etapas de desarrollo por lo tanto fue necesario conocer aspectos morfológicos como apariencia y tamaño de los embriones así como su posición en el fruto inmaduro además de que no existe ningún trabajo previo de quinua que ayudara a tal reconocimiento y al aislamiento de los explantes.

Bertero (1996) describió la secuencia de cambios en la morfología del meristemo apical del estado vegetativo hasta la antesis y existen varios trabajos referentes a la morfología del fruto y la semilla maduros de quinua (Gallardo, 1997) e incluso uno en el que se detalla la ultraestructura de la semilla madura mediante microscopía electrónica de barrido (Varriano-Marston, 1984) no obstante en ninguno se hace referencia a la etapas previas del desarrollo embrionario, por tanto fue necesario efectuar la descripción de los diferentes estadios embrionarios de la quinua para su cultivo *in vitro*, Monnier (1995) menciona que muchos de los estudios en cultivo de embriones se han efectuado en *Capsella bursa-pastoris* debido a que su desarrollo embrionario ha sido muy bien descrito lo que ha propiciado el cultivo de embriones en etapas muy inmaduras, por ello se considera importante el conocimiento de etapas embrionarias inmaduras de quinua que permitan trabajos futuros ya sea fisiológicos, nutricionales, de propagación masiva o con fines de mejoramiento.

En el presente trabajo, fue importante determinar algunas de las características florales asociadas a la presencia de embriones así como la descripción de las semillas inmaduras y los estadios embrionarios asociados a ellas ya que serán de gran apoyo cuando se tengan que aislar los embriones híbridos porque tendrán que ser en una etapa muy precisa previa a un posible aborto embrionario. En esta variedad (Barandales) se observó una apertura asincrónica de las flores; por lo que una vez que nos familiarizamos con algunos caracteres morfológicos tanto de la flor como de la semilla inmadura, fue más fácil seleccionar los embriones en una precisa etapa de desarrollo para su siembra *in vitro* sin tener que estar efectuando disecciones al azar; esto concuerda con lo que señala Monnier (1986) al efectuar el aislamiento de embriones inmaduros de ***Capsella*** ya que pudo elegir el estado embrionario exacto al considerar el tamaño del fruto.

Otro aspecto importante fue determinar la posición del embrión en la semilla inmadura, Bridgen (1994) señaló que el proceso de disección de embriones inmaduros varía de acuerdo a las especies por lo que es necesario conocer la posición del embrión durante su desarrollo. En quinua se observó que la posición del embrión en desarrollo tiende a ser hacia el centro de la semilla inmadura pero conforme se lleva a cabo la acumulación del tejido de almacenamiento (perispermo), el embrión finalmente rodea completamente al perispermo y queda en la periferia de la semilla al llegar a la madurez; de tal modo que los extremos de los cotiledones se encuentran muy cerca del extremo radicular.

Los caracteres de los cinco estadios embrionarios identificados podrán servir en estudios de rescate de embriones para compararlos con los embriones híbridos y ver si existe alguna alteración en los estadios que serán cultivados *in vitro*, Ashley (1972) observó diferencias entre los embriones de ***Hibiscus costatus*** y embriones híbridos de ***H. costatus* X *H. aculeatus*** y ***H. costatus* X *H. furcellatus***, al ser los híbridos más pequeños que los embriones que no vienen de las cruces interespecíficas y por tanto después de un tiempo notó que los híbridos no continuaron su desarrollo.

En general Johri (1992) menciona que se reconocen 4 estadios embrionarios que son comunes durante el desarrollo de las dicotiledóneas, dichos estadios son: globular, corazón, torpedo y herradura lo cuales coinciden con los encontrados en las semillas inmaduras de quinua. Fischer (2001) señala que en las plantas superiores el desarrollo embrionario implica una secuencia compleja de eventos que puede ser divididos en tres

estadios que se sobrelapan, la primera en la que el cigoto sufre una serie de divisiones mitóticas y en la segunda fase, las células resultantes se diferencian para formar el plan básico del embrión y en la última en la que la maduración involucra la expansión celular y la deposición de los tejidos de reserva.

En el cultivo de embriones se pueden establecer diversos estadios embrionarios dependiendo de la respuesta que se obtenga. Ross (1980) determinó varios estadios en el cultivo de embriones híbridos inmaduros de ***Brassica*** en los que se incluyen el estadio globular, el corazón y tres estadios de la etapa de torpedo y tres para la etapa madura y es de uno de los estadios torpedo en los que obtuvo germinación de los embriones mientras, que Monnier (1995) estableció 6 estadios embrionarios para la germinación de ***Capsella***.

En el presente estudio, para la variedad de quinua que exploramos se encontró una etapa después del torpedo que denominamos torpedo tardío en la que no sólo se da un aumento de tamaño del embrión sino que hay un ligero opacamiento de las células al mismo tiempo que se empiezan a distinguir zonas blanquecinas correspondientes al perispermo; este estadio fue el que presentó mayor porcentaje de germinación en los cuatro medios inicialmente ensayados.

Desinfección

El método de desinfección superficial empleado (Fig. 3) fue suficiente para conseguir la eliminación de contaminantes fúngicos y bacterianos de las semillas inmaduras de ***C. quinoa*** de las cuales en los ensayos iniciales se aislaron los 60 embriones en estadio torpedo que fueron sembrados en los cuatro medios nutritivos (1, 2, 3 y 4) por lo que no se presentó contaminación. Este método se aplicó en las siembras posteriores.

Hu (1986) y Bridgen (1994) mencionan que la desinfección directa de los embriones no es necesaria debido a que se encuentran rodeados por una serie de tejidos que hacen que el entorno en donde se desarrollan sea estéril. Por lo anterior son los tejidos que rodean a los embriones los que son desinfectados y los embriones son aislados asépticamente, por ello el porcentaje de contaminación en los cultivos de embriones es muy bajo a diferencia de otros tipos de cultivos *in vitro*.

Los agentes desinfectantes más utilizados incluyen al hipoclorito de sodio y etanol sin embargo por la protección que le confieren al embrión los tejidos circundantes del fruto

inmaduro, los desinfectantes y los tiempos de aplicación pueden variar, Gomathinayagam (1998) sólo utilizó etanol al 70% durante 30 segundos para desinfectar los frutos inmaduros provenientes de una cruce interespecifica de *Vigna*, mientras que Sujatha (2001) empleó cloruro de mercurio al 0.1% durante 8 minutos para la desinfección de aquenios de *Helianthus*, para el aislamiento de embriones de quinua la aplicación del etanol e hipoclorito de sodio fue suficiente para lograr la desinfección de los tejidos circundantes no obstante el tamaño pequeño de las flores.

La desinfección de la semillas inmaduras de quinuas incluyó a las partes florales, no obstante, en varios trabajos la desinfección sólo incluyo el fruto inmaduro aislado previamente de las partes florales como Sujatha (2001) lo efectuó para *Helianthus*, Hu (1986) también señaló que cuando los frutos albergan microorganismos en la parte interna, los embriones pueden contaminarse durante la disección por lo que es necesaria su reesterilización como lo efectuó Mock *et al* (1981) con la esterilización de embriones aislados de maíz.

Para efectuar la desinfección se usó una plataforma de agitación con velocidad ajustable, se aplicó una velocidad de 130 rpm ya que aunque Hu (1986) menciona que se pueden utilizar elementos como parrillas de agitación magnética ó aparatos para generar vacío o vibración ultrasónica, se decidió no emplear parrilla de agitación debido a que las flores al ser tan pequeñas pudieran ser dañadas las semillas inmaduras por el magneto.

Fue importante considerar el volumen de los desinfectantes etanol e hipoclorito de sodio añadidos a un matraz de 125 ml estos debieron ser de 30 a 35 ml ya que si se sobrepasaba esa cantidad no se lograba una agitación adecuada.

Medios nutritivos

Los medios nutritivos utilizados, B5 (medio 1) y una modificación del mismo (medio 2) fueron seleccionados porque habían sido empleados previamente para realizar la propagación de dos variedades de quinua, Blanca de Junin y Real de Puno, a partir de yemas axilares (Burnouf- Radosevich, 1985) además Hu (1986) menciona que entre los medios más comúnmente empleados para el cultivo de embriones se han reportado precisamente el B5 (1968), el MS (1962) y el White (1963).

Los medios nutritivos 3 y 4 tuvieron como base el medio MS. Estos fueron empleados por Bennici (1992) para la propagación de varias especies de amaranto y han sido empleados

en el Laboratorio de Genética Vegetal del ININ para la germinación de semillas de **C. quinoa** de diferentes variedades. En el medio 3 la concentración de las sales minerales y la sacarosa fueron al 50% y no incluyó vitaminas, mientras que en el medio 4 las sales minerales fueron al 100% con vitaminas y se adicionó ácido ascórbico.

Las siembras en los medios 1, 2, 3 y 4 sólo incluyeron a los estadios corazón, torpedo, torpedo tardío y herradura ya que el estadio globular fue identificado posteriormente y es que el tamaño de los embriones en esta fase dificultaba en gran medida su aislamiento, sobretodo porque el embrión era hialino y se perdía al momento de tratar de transferirlo al frasco con medio de cultivo.

Oxidación

En cuanto al oscurecimiento de los embriones, provocado por oxidación los porcentajes que ocurrieron en los distintos medios de cultivo se presentan en la Tabla 8, en la cual se observa que en todos los casos existió un oscurecimiento al cabo de ocho días después de la siembra, los explantes empezaron a presentar un ligero oscurecimiento hacia la base y éste se extendió hacia todo el embrión e incluso de la zona del medio de cultivo cercana a ellos y fue letal sin que se pudieran recuperarse y sobrevivir.

Tabla 8. Porcentaje de embriones torpedo de **C. quinoa** Willd. oxidados durante el cultivo *in vitro*

Medio nutritivo	total de embriones sembrados	embriones oxidados a los 8 días de la siembra	Embriones oxidados a los 26 días de la siembra
Medio 1	60	18	32
Medio 2	60	12	38
Medio 3	60	13	46
Medio 4	60	10	28

Al efectuar el análisis de varianza para comparar la oxidación de los embriones de quinua en los diferentes medios (Tabla 9), no se encontraron diferencias significativas, esto lleva a pensar que la oxidación muy posiblemente es debida al contacto de los explantes con el aire durante la disección esto concuerda con lo que señala George (1993) en cuanto a que los tejidos pueden sufrir una oxidación después de su aislamiento provocado principalmente por la presencia de oxígeno, esto, aunado a las condiciones de siembra en la campana de flujo y al reducido tamaño de los embriones muy probablemente provocó la oxidación de los mismos, por lo tanto se decidió utilizar una solución de ácido ascórbico al 10 mg/l para realizar el aislamiento.

Tabla 9. Comparación de la oxidación en los embriones torpedo de *C. quinoa* cultivados *in vitro* en los medios nutritivos 1, 2, 3 y 4 a los 26 días de la siembra

causas	GL	SC	CM	F	F tablas
	3	0.1186	0.03955	1.422	3.10
ERROR	20	0.5573	0.0278		
TOTAL	23	0.676			

$$F_{\text{calculada}} 1.422 < F_{0.05 (3, 20)} = 3.10$$

George (1993) mencionó que el uso del ácido L-ascórbico les proporciona una defensa a los explantes contra la oxidación al actuar como reductor mediante una asociación con las membranas celulares.

Es conveniente señalar que en gran parte de los trabajos de cultivo de embriones no se hace referencia a demasiados problemas en cuanto a la oxidación de los embriones debido a que las especies empleadas presentan estadios embrionarios inmaduros de un tamaño relativamente grande; por ejemplo Tétu (1990) al cultivar embriones inmaduros de *Pisum sativum* el embrión más pequeño que cultivó presentaba un tamaño de 1mm; de igual manera Sujatha (2001) cultivó embriones inmaduros de *Helianthus annuus* y el estadio más pequeño presentaba un tamaño de 2mm y el más grande de 8 mm, al igual que Kosturkova (1997) quien regeneró plantas de embriones inmaduros de *Pisum arvense*, los cuales presentaban un tamaño mínimo de 6 mm sin embargo; sólo Rochón (1998) al efectuar el aislamiento de embriones inmaduros de maíz encontró que el tamaño

de estos estaba entre $250\ \mu\text{m}$ y $400\ \mu\text{m}$ y por tanto fue necesario el empleo de MS líquido como medio de inmersión, para evitar la deshidratación y oxidación de los explantes.

En cuanto a la longitud de los embriones en la figura 12 podemos ver que la mayor longitud fue alcanzada en el medio 4 y no obstante la oxidación que se presentó, la composición del medio con los reguladores de crecimiento lograron un incremento en el tamaño de los mismos.

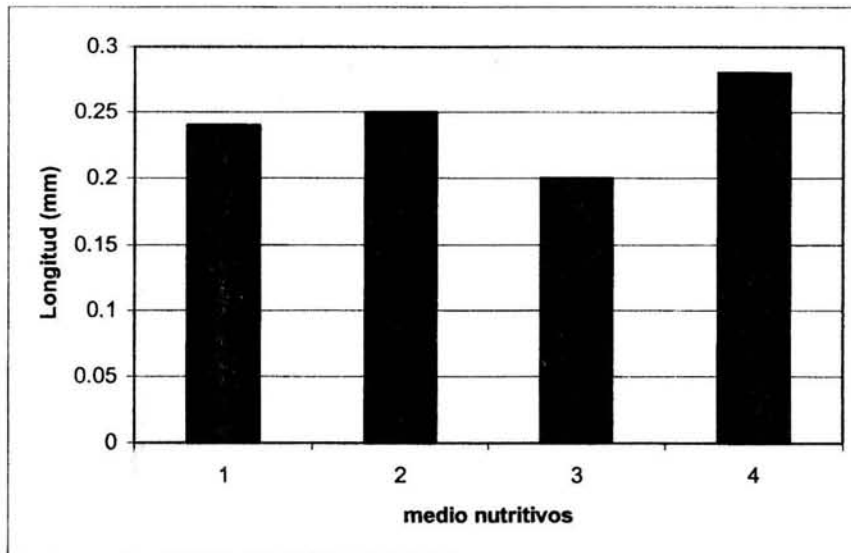


Figura 12. Longitud promedio de los embriones torpedo de ***C. quinoa*** cultivados *in vitro* en los medios 1,2, 3 y 4 a 10 días de la siembra

El análisis de varianza que se muestra en la Tabla 10 demostró que efectivamente hubo diferencias significativas y que las más importantes correspondieron al medio 3 y 4, mientras que entre los medios 1 y 2 no hubo diferencias significativas (Tabla 10).

Tabla 10 .Comparación de la longitud de los embriones torpedo de **C. quinoa** cultivados *in vitro* en los medios nutritivos 1, 2, 3 y 4 a los 10 días de la siembra

causas	GL	SC	CM	F	F tablas
	3	0.0815	0.02771	13.782	2.68
ERROR	196	0.3942	0.0020		
TOTAL	199	0.4774			

$$F_{\text{calculada}} 13.78 > F_{0.05 (3, 199)} = 2.68$$

Tabla 11. Efecto de los medios de cultivo sobre la longitud de los embriones torpedo de **C. quinoa** cultivados *in vitro* a los 10 días de la siembra

medios	embriones inoculados	longitud promedio (mm)
1	60	0.24 a
2	60	0.25 a
3	60	0.22 b
4	60	0.28 c

No obstante que se presentó un incremento en la longitud de los embriones al cabo de 26 días de cultivo más del 60% del total de los explantes presentaban un oscurecimiento del cual no se recuperaron lo que muy probablemente evitó continuaran su desarrollo.

Una vez establecidos los diferentes estadios embrionarios, se pudieron sembrar los embriones en los medios de cultivo seleccionados (Tabla 12) y donde se vio que hubo diferencias en cuanto al estado de desarrollo y el medio de cultivo; se puede decir que en los estadios más tempranos se presentó un menor porcentaje de germinación que los estadios más maduros, el estadio herradura germinó en todos los medios no importando su composición, incluso en el medio 3 que tuvo las sales minerales del MS al 50% esto muy posiblemente se debe a que los embriones habían completado su desarrollo además de que no presentaron una resistencia física de la semilla, en cuanto a la falta de una

mayor cantidad de oxígeno, de agua y de luz por lo al ser aislados y colocados en el medio 3 posiblemente pudieron germinar por las condiciones de luz, cantidad de oxígeno pero sobre todo mayor humedad proporcionadas por el medio que favoreció su crecimiento y su paso a una condición autotrófica.

En el medio B5 modificado (medio 2), fue donde Burnouf-Radosevich (1985) obtuvo la mejor respuesta para la propagación de quinua pero al usarlo para el cultivo de los embriones no logró la germinación de embriones en estadio muy tempranos (Tabla 12) a diferencia del medio B5 sin modificar en el que se presentó la germinación de embriones en estadio torpedo, Varotto (1997) también empleó el medio B5 sin modificaciones y logró la regeneración de embriones inmaduros en estado torpedo de *Cichorium* sin embargo no logró la regeneración de estadios anteriores al estadio torpedo.

Las principales modificaciones efectuadas por Burnouf-Radosevich (1985) al medio B5 consistieron en aumentar la concentración de nitrato de potasio en un tercio y adicionar fosfato ácido de sodio, estos cambios fueron efectuadas debido a que Burnouf-Radosevich (1985) señaló que la familia Chenopodiaceae en condiciones naturales tiene una gran afinidad por los nitratos y fosfatos, por tanto mencionó que aunque el medio B5 es particularmente rico en nitratos (2,500 mg/l) en comparación con el medio MS (1,900 mg/l) se modificó el B5 para evaluar concentraciones más elevadas de nitratos y en donde se obtuviera la mejor concentración para la propagación de la quinua; no obstante, aunque este medio modificado resultó efectivo para la obtención de brotes de quinua al probarlo para el cultivo de los embriones inmaduros no fue suficiente para que estos continuaran su desarrollo, a diferencia del medio 4 cuya composición mineral se asemejaba al MS esto se apoya en lo mencionado por Monnier (1995) en que los embriones inmaduros son muy sensibles a la solución mineral empleada lo que afecta su crecimiento y sobrevivencia particularmente señala al nitrato de amonio por tanto es posible que los estadios muy inmaduros resultaran afectados por la composición del medio ya que en el medio B5 sin modificar sí se obtuvo la germinación de estadios mas tempranos.

Tabla 12. Porcentaje de germinación de los diferentes estadios embrionarios en los medios seleccionados después de 20 días de cultivo *in vitro*, incubados en oscuridad durante 7 días y posteriormente con un fotoperiodo de 16h luz y 25 ± 2 ° C de temperatura

Medios utilizados	Estadios de desarrollo			
	Corazón	Torpedo	Torpedo tardío	Herradura
Medio 1	0	20	80	90
Medio 2	0	0	40	90
Medio 3	0	10	50	100
Medio 4	0	30	100	100

El medio en el que se obtuvo mayor porcentaje de germinación fue en el medio 4 (tabla 10) ya que se logró la activación de un estadio más inmaduro que fue el torpedo y se incrementó el porcentaje en el estadio torpedo tardío, una probable explicación de este resultado es que la composición mineral y reguladores de crecimiento en el medio 4 lograron que los embriones pudieran avanzar en su crecimiento a diferencia del medio 3 que fue un medio basal que no logró aportar los elementos necesarios para la sobrevivencia y crecimiento de los embriones en estadio corazón ni torpedo por tanto sólo se presentó la germinación de 2 estadios, el del torpedo tardío y herradura.

Los resultados obtenidos al sembrar los diferentes estadios en los cuatro medios de cultivo permitió ver que en el medio 4 se obtuvieron los mejores resultados así mismo se pudo inferir que una composición mineral cercana al MS resultaba más adecuada para el cultivo de los embriones de quinua, sin embargo, Monnier (1995) mencionó que no obstante que la composición del MS permite un mayor crecimiento de los embriones también se presenta un bajo porcentaje de sobrevivencia, esto lo observó al cultivar embriones de

Capsella en medio MS y en la solución Knop. En el medio MS se presentó el mayor crecimiento pero al mismo tiempo la menor sobrevivencia, la cual fue mucho mayor en la solución de Knop tomando en cuenta estas observaciones se decidió modificar el medio 4 para generar el medio 4A.

Se han tenido respuestas favorables al cultivar embriones de otras especies tomando en cuenta las recomendaciones hechas por Monnier (1995) para el medio de cultivo como lo señala Pinto (1994) al cultivar embriones inmaduros de *Prunus persica* y Crouch (1995) al lograr la maduración de embriones de *Brassica*.

En la Tabla 13 se muestra el porcentaje de germinación de los diferentes estadios embrionarios sembrados en el medio 4A. Se decidió emplear medio líquido con puentes de papel filtro para ayudar a la sobrevivencia de los embriones muy pequeños durante las primeras etapas del cultivo, George (1993) recomienda el empleo de medio líquido para el cultivo de embriones inmaduros que sean muy pequeños por ejemplo Nakajima (1983) cultivó con éxito embriones de *Lilium* sobre puentes de papel filtro y menciona que el medio líquido puede ser una buena alternativa para el cultivo de embriones inmaduros de otras especies, Rochón (1996) sembró embriones inmaduros de maíz de entre 250 μm y 400 μm y aunque el medio de siembra consistió en MS sólido fue necesario adicionar una pequeña cantidad de medio MS líquido sobre los embriones que aseguró su sobrevivencia.

Como se observa en la Tabla 13, se logró la germinación de embriones en estadio corazón que en ninguno de los medios anteriores se había presentado, aparte se adicionaron otros componentes como la L-glutamina la cual ha sido ampliamente usada para el cultivo de embriones de varios géneros, *Capsella*, *Datura*, *Arabidopsis*, *Reseda*, *Medicago*, *Allium* y *Hordeum* (Rijven, 1956) y en todos los casos su aplicación fue muy efectiva en promover el crecimiento de los embriones, por lo que se decidió incorporarla al medio de cultivo 4A, además de que Burnouf- Radosevich (1985) la empleó como fuente de nitrógeno orgánico.

Tabla 13. Porcentaje de germinación de los diferentes estadios embrionarios en el medio 4A después de 20 días de cultivo con un fotoperíodo de 16 h luz y 25 ± 2 ° C de temperatura

Estadios de desarrollo	Germinación
Globular	0
Corazón	20
Torpedo	70
Torpedo tardío	80

En la Tabla 13 también se observa que no se obtuvo la germinación de embriones de quinua en estadio globular al igual que Scemama (1990) no logró la germinación de estadios globulares de híbridos de cruza de *Pelargonium X hortorum*, de la misma manera Ross (1980) no logró la germinación de estadios globulares de embriones híbridos de dos especies de *Brassica* ya anteriormente van Overbeek había intentado el cultivo embriones inmaduros globulares de *Datura*, al utilizar extractos naturales como endospermo de coco, sin embargo los embriones de menos de 0.2 mm de longitud no lograron su crecimiento aun con los suplementos empleados, a este respecto Ragahvan (1986) menciona que resulta muy difícil la germinación de estadios embrionarios muy inmaduros sobre todo el estadio globular principalmente por los requerimientos nutricionales que presentan, también señala que la sobrevivencia y crecimiento de los embriones *in vitro* aumenta con su tamaño y cuando un embrión es mayor a 250 μm , está influenciado en gran parte por las condiciones de cultivo, medio nutritivo, reguladores de crecimiento, luz.

Una vez establecido el medio líquido 4A se decidió ver la respuesta de los embriones con diferentes reguladores de crecimiento y en varias concentraciones, sin embargo sólo se

emplearon embriones en estadio torpedo; en la Figura 13 se observa el efecto del BA y ANA sobre su longitud y se vio que no había diferencias significativas en los diferentes tratamientos como lo demuestra el análisis de varianza efectuado (Tabla 14); se decidió emplear esos reguladores de crecimiento porque fueron para la propagación de ápices y yemas axilares de quinua (Bunouf-Radosevich, 1985) sin embargo aunque no existieron diferencias significativas la tendencia es que los embriones presentaron una mayor longitud a concentraciones más altas de citocininas, esto se debió muy posiblemente al efecto de estas hormonas sobre la división celular, sin dejar de considerar, por supuesto el efecto de la auxina.

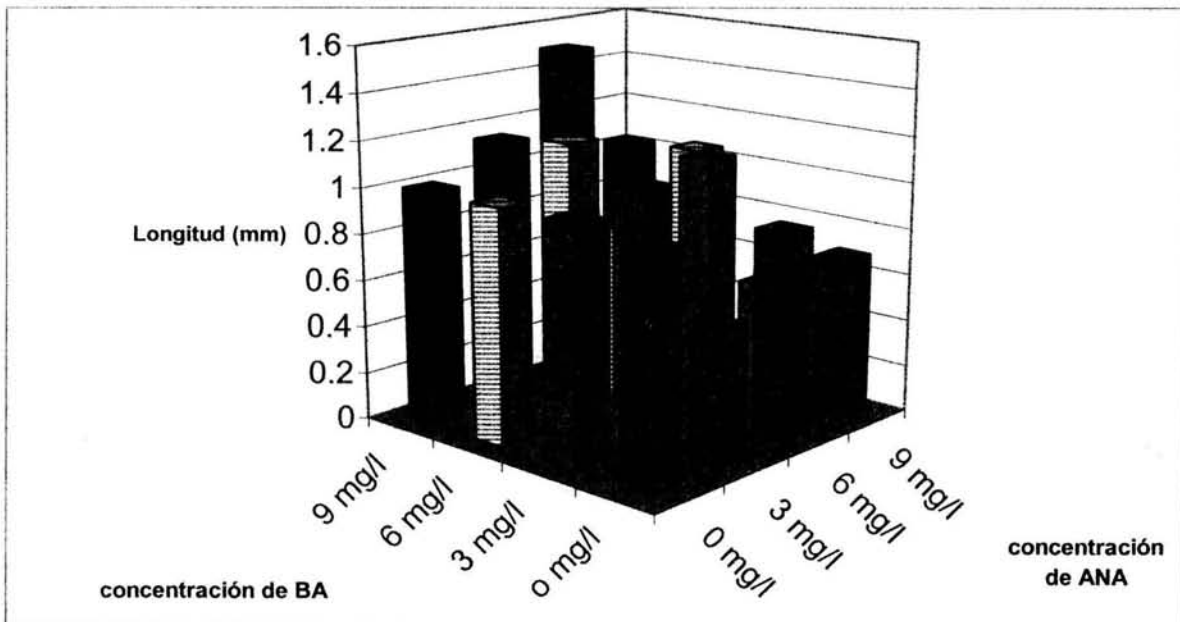


Figura 13. Efecto de la combinación de ANA y BA sobre la longitud de los embriones torpedo tardío de *C. quinoa* cultivados *in vitro* en el medio 4A después de 14 días de cultivo

Tabla 14. Comparación del efecto del ANA y BA sobre la longitud de embriones torpedo tardío de *C. quinoa* cultivados *in vitro* en el medio 4A después de 14 días de cultivo

	GL	SC	CM	F	F tablas
	15	1.8626	0.1241	0.496	2.35
ERROR	16	4.005	0.2503		
TOTAL	31	5.867			

$$F_{\text{calculada}} 0.49 < F_{0.05 (15, 16)} = 2.35$$

No obstante, se debe mencionar que al cabo de 20 días de cultivo, alrededor del 60% de los embriones presentaban una hiperhidratación sobre todo de aquellos sembrados en medio con una elevada concentración de citocininas, 6 y 9 mg/l y esto lo podemos atribuir por un lado al estado líquido del medio de cultivo el cual está relacionado con las diferencias de potencial hídrico entre el tejido y el medio pero por otro lado se puede asociar a lo que señala Ziv (1991) en el que la hiperhidratación también se ha asociado con un desorden fisiológico provocado por un alta concentración de citocininas, en diferentes especies el empleo de elevadas concentraciones de citocininas ha provocado la hiperhidratación de diferentes tejidos, por ejemplo en cultivos de melón al cultivarse con altas concentraciones de BA se provocó que gran parte de los brotes se hiperhidrataran lo cual fue disminuido hasta cierto punto al reducir las concentraciones de la citocinina, sin embargo Ziv (1991) también apunta que en diversas especies la alta concentración de citocininas no tiene ningún efecto significativo en la hiperhidratación de los tejidos y que el efecto de las citocininas podría ser a través de la incrementada división celular o por cambios en los procesos metabólicos de los cultivos *in vitro* los cuales podrían explicar por qué diversas especies responden de manera diferencial a los niveles de estas hormonas.

Por lo anterior se realizó otro barrido hormonal en el que se probaron otras hormonas, AIA y K y no obstante que también se usaron altas concentraciones hormonales y de acuerdo a los resultados obtenidos en el primer barrido en cuanto a la hiperhidratación, se decidió disminuir el tiempo que los embriones permanecían en el medio 4A líquido, a 7 días para

que una vez transcurrido este tiempo fueran subcultivados a medio MS al 50% sin reguladores de crecimiento.

En las Figuras 14 y 15 se observa el resultado del segundo barrido hormonal en el cual hubo diferencias significativas entre 36 tratamientos como lo demuestra el análisis de varianza (Tabla 15); como se mencionó, en el primer barrido (ANA/BA, Tabla 5) se obtuvo una mayor longitud de los explantes a concentraciones altas de citocininas y esto se pudo observar mejor en el segundo barrido donde los tratamientos que tuvieron diferencias fueron los que tenían un alta concentración de citocininas 9 y 12 mg/l y nula o relativamente baja concentración de auxinas para las condiciones del presente estudio de 0 y 3 mg/l, esto concuerda con lo encontrado por Ritcher (1982) que logró el cultivo exitoso de embriones híbridos inmaduros en estadio corazón de cerezo al emplear sólo citocininas y en el que transcurridas dos semanas observó un incremento notable en la longitud de los mismos; varios autores señalan que la adición de auxinas puede no es necesaria para el crecimiento *in vitro* de embriones de diferentes especies (La Rue, 1936; Rijven, 1956; Rietsema, 1953; Veen, 1963).

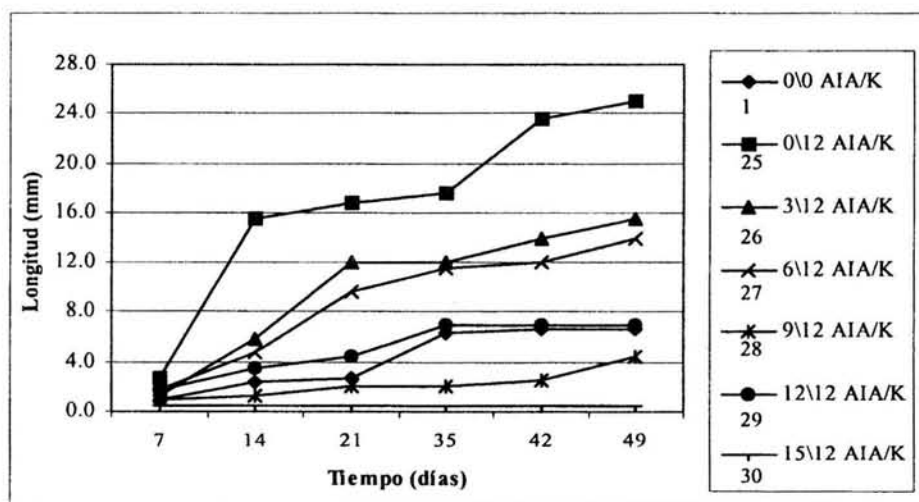


Figura 14. Efecto de la K y de su combinación con el AIA (Tabla 6) sobre la longitud de los embriones torpeda tardío de *C. quinoa* después de 49 días de cultivo *in vitro* en el medio 4A

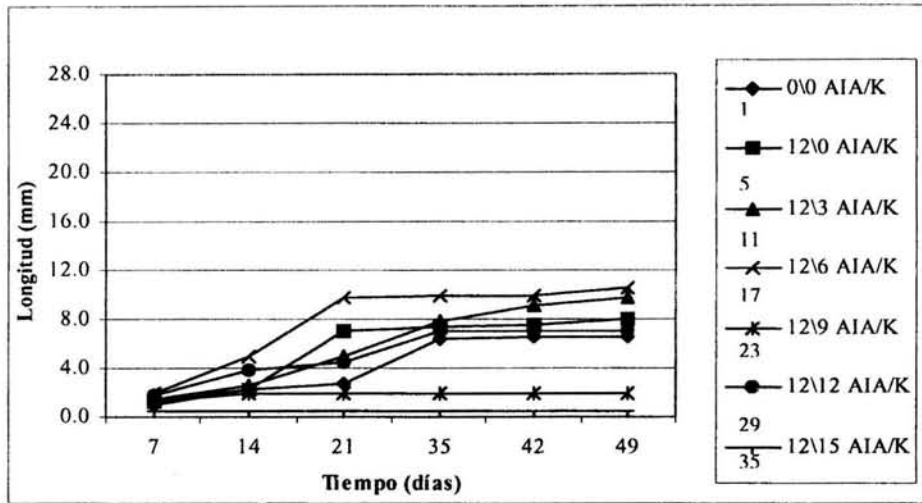


Figura 15. Efecto del AIA y de su combinación con K (Tabla 6) sobre la longitud de los embriones torpedo tardío de *C. quinoa* después de 49 días de cultivo *in vitro* en el medio 4A

Tabla 15. Comparación del efecto del AIA y de su combinación con K sobre la longitud de los embriones torpedo tardío de *C. quinoa* después de 49 días de cultivo *in vitro* en el medio 4A

	GL	SC	CM	F	F tablas
	35	2121.611	60.6174	5.335	1.55
ERROR	180	2045.098	11.3616		
TOTAL	215	4166.71			

$$F_{\text{calculada}} 5.35 > F_{0.05 (35, 180)} = 1.55$$

Al efectuar la prueba de Tukey se encontraron dos tratamientos hormonales en los que se obtuvo mejor respuesta en los embriones torpedo tardío y fueron los que tuvieron las concentraciones de 12 mg/l de K sin AIA con una longitud de 16.8 mm y el que tuvo la combinación de 3 mg/l de AIA y 12 mg/l de K después de 49 días de cultivo *in vitro*, esto concuerda con lo que señala Bridgen (1994) en cuanto a que se requiere de citocininas y algunas auxinas para promover el crecimiento y la diferenciación de los embriones. Fischer-Iglesias (2001), Quatrano (1990) y Werner (2003) mencionan que se ha encontrado una alta concentración de citocininas en el endospermo líquido de numerosas

especies en etapas tempranas del desarrollo y su presencia coincide con el índice más alto de mitosis de manera que se infiere que tienen una importante participación en controlar las divisiones celulares durante el desarrollo embrionario, diversos estudios con mutantes de cebada han demostrado que algunas líneas poseen grandes cantidades de citocininas en etapas tempranas del desarrollo del embrión por lo que basado en este tipo de estudios se ha sugerido que la actividad de las citocininas en esta etapa es responsable de intensificar el tamaño final de la semilla, pero se considera que además de su efecto sobre la división celular también pueden ayudar a la movilización de nutrientes en el embrión inmaduro ya que Sharma (1996) señala que tienen un efecto sobre la permeabilidad de la membrana y la captación de diversos iones.

El tiempo que duró la inducción hormonal de 7 días fue determinado con base a que en el primer barrido hormonal los embriones habían alcanzado una longitud promedio de 1 mm desde la longitud inicial de 0.6 mm en altas concentraciones de BA (6 y 9 mg/l) y habían adquirido un aspecto diferente en cuanto a que la radícula se observó más alargada que cuando fueron sembrados aproximadamente en un tercio de la longitud total del embrión y la consistencia de los mismos fue más sólida por tanto se decidió que en el segundo barrido hormonal se mantendrían en el medio 4A con hormonas durante 7 días y posteriormente fueron subcultivados en medio MS al 50% sin reguladores de crecimiento, en el medio MS los cotiledones se tornaron de color verde después de 5 días en los tratamientos que tuvieron altas concentraciones de citocininas 12 mg/l de K (tratamiento 25, Tabla 6) y el tratamiento de 3 mg de AIA con 12 mg de K (tratamiento 26, Tabla 6); el tiempo de inducción también fue empleado por Bronsema (2001) para el cultivo de embriones inmaduros de maíz los cuales fueron cultivados en un medio de inducción que contenía altas concentraciones de auxinas durante un periodo de 7 días y donde al contrario de lo observado en quinua la germinación se presentó en concentraciones bajas de la auxina 2,4-D (2 mg/l) que se utilizó sin embargo, en trabajos previos, Bronsema (2001) encontró mediante estudio bioquímicos que después de 14 días gran parte del 2,4-D presente en el medio había sido tomado por los embriones de modo que al transvasarlo a medio MS se logró la germinación de los embriones, esto coincidió con lo observado en los embriones de quinua y se observó que después de 20 días de haber sido subcultivados en el MS presentaron las primeras hojas verdaderas (Fig. 16).

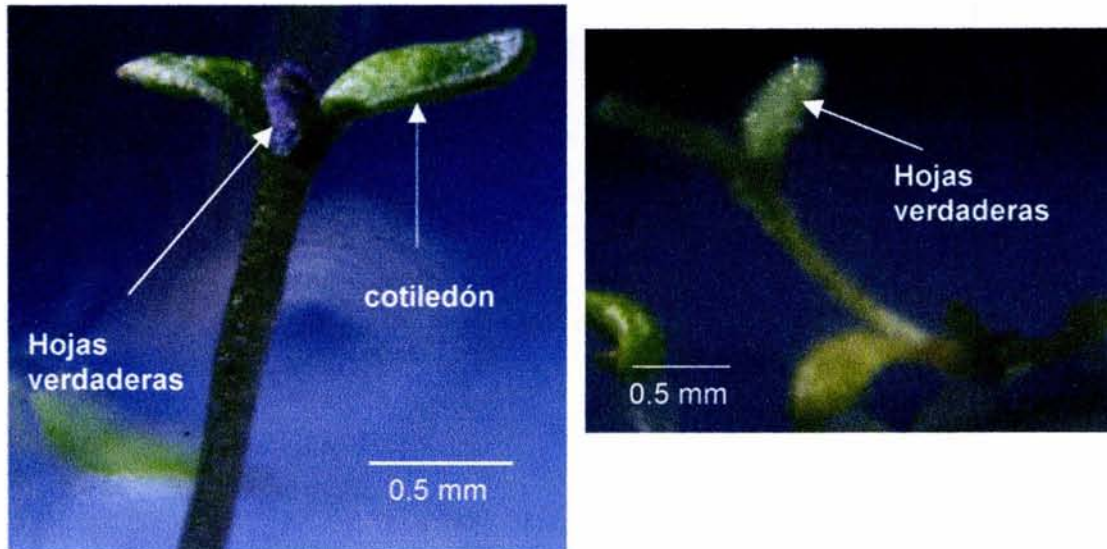


Figura 16. Plántulas provenientes de embriones en estadio torpedo tardío sometidas a un pulso hormonal de 12 mg/l de K y subcultivadas en medio MS al 50% después de 20 días de cultivo con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad y 25 ± 2 ° C

Cuando ambas concentraciones de AIA y K fueron elevadas los embriones subcultivados en el medio MS no continuaron su desarrollo (Figura 15 tratamientos 23 y 35) la probable explicación es que las hormonas podrían haber tenido un efecto inhibitorio sobre los embriones, en este sentido se coincide con lo encontrado por Bronsema (2001) al aplicar altas concentraciones de auxinas en el medio de cultivo y en donde por arriba de 20 mg/l de 3,5-D se provocó la supresión de la germinación de los embriones inmaduros de maíz, a este respecto Bronsema (2001) señala que muy posiblemente se provocó un gran disturbio en el balance hormonal endógeno que resultó en inhibición del desarrollo.

En la Tabla 16 podemos observar el efecto del AIA y K en el número de raíces, cuando las plantas fueron subcultivadas al medio MS al 50% sin reguladores de crecimiento las plantas no presentaron raíces adventicias sino hasta después de 15 días. El tratamiento en el que se presentó un mayor número de raíces fue el que contenía solo AIA 12 mg/l demostrando el efecto rizogénico sin embargo en general se presentaron numerosas raíces en los tratamientos donde existía la interacción auxina citocinina 3/0, 12/6, 12/9 pero la concentración de auxina fue mayor que la citocinina.

Tabla 16. Efecto del AIA y K sobre el promedio de raíces en embriones torpedo tardío de *C. quinoa* después de 49 días de cultivo

	0	3	6	9	12	15
0	0.38	1.18	0.8	0.78	1.15	1.03
3	0.1	0.45	0.75	0.75	2.05	0.9
6	0.38	0.95	0.375	1.15	0.5	0.4
9	0.4	0.625	1.45	1.175	0.15	0
12	0.65	0.25	1.62	0.425	0.4	0
15	0.25	0.3	0.5	0.275	0	0

Burnouf-Radosevich (1985) subcultivó los brotes obtenidos de quinua en medio líquido con puente de papel filtro, con lo que obtuvo el desarrollo de raíces secundarias sin embargo en el caso de los embriones inmaduros de quinua se obtuvieron numerosas raíces en el medio MS sólido siendo al igual que las reportadas por Burnouf- Radosevich (1995) estructuras muy delgadas las cuales menciona que son características de la quinua en condiciones naturales.

IV. CONCLUSIONES

Se identificaron cinco estadios durante el desarrollo embrionario de **C. quinoa** Willd. que fueron: globular, corazón, torpedo, torpedo tardío y herradura (maduro).

El método de desinfección usado: agua, etanol 70%, hipoclorito de sodio 15 % (v/v) 15% y tres lavados con agua destilada estéril resultó el adecuado para conseguir la eliminación de contaminantes fúngicos y bacterianos de las semillas inmaduras de **C. quinoa**.

De los medios ensayados inicialmente, fue en el medio 4 en el que se obtuvo mayor porcentaje de germinación de los estadios torpedo, torpedo tardío y herradura con 30, 100 y 100 % respectivamente.

En el medio 4A se logró la germinación del estadio corazón (20 %) que en ninguno de los otros medios de había logrado y se incrementó el porcentaje de germinación en el estadio torpedo.

No hubo diferencias significativas entre los tratamientos del primer barrido hormonal con BA y ANA aunque se observó una mayor longitud a concentraciones más elevadas de citocininas.

El mejor tratamiento del segundo barrido hormonal en el que se utilizó AIA y K fue de 12 mg/l de K.

El tratamiento donde se obtuvieron mayor número de raíces en promedio fue el de 12 mg/l de AIA

Con este estudio se cuenta con la metodología inicial para el rescate de embriones producidos por la hibridación de **C. quinoa** y **C. berlandieri**

V. APÉNDICES

Apéndice 1

	Medio 1 mg/l	Medio 2 mg/l	Medio 3 mg/l	Medio 4 mg/l	Medio 4A mg/l
KNO ₃	2500	2700	950	1900	1990
MgSO ₄ . 7H ₂ O	250	250	185	370	370
(NH ₄) NO ₃			825	1650	825
NaH ₂ PO ₄ . H ₂ O	150	315			
(NH ₄) ₂ SO ₄	134	134			
KH ₂ PO ₄ monobásico			85	170	170
KCl					350
CaCl ₂ . 2H ₂ O	150	150	220	440	880
H ₃ BO ₃	3	3	3.1	6.2	12.4
MnSO ₄ .H ₂ O	10	10	8.445	16.89	33.6
ZnSO ₄ .7H ₂ O	2	2	4.3	8.6	21
NaMoO ₄ .2H ₂ O	0.25	0.25	0.125	0.25	0.5
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.025	0.0125	0.025	0.05
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0.025	0.025	0.0125	0.025	0.05
KI	0.75	0.75	0.415	0.83	1660
Fe SO ₄ . 7H ₂ O	27.8	27.8	13.9	27.8	11.1
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	18.65	37.3	14.9
Myo- Inositol	100	100	10	10	10
Piridoxina	0.5	0.5		1	1
Tiamina	0.1	0.1			1
Ac. Nicotínico	0.5	0.5		1	1
L- glutamina					400
Ac. Ascórbico				0.1	10
Glicina		4			
Sacarosa	20,000	10,000	15,000	30,000	70
Reguladores de crecimiento	BA 0.22	BA 0.22		K 3	
	ANA 0.09	ANA 0.18		AIA 0.3	
pH	5.5		5.7	5.6	5.6
Agar - Sigma	8 g/l	8 g/l	8 g/l	8 g/l	puentes de papel filtro

Apéndice 2

Los reguladores de crecimiento se prepararon en soluciones concentradas de 50 mg en 50 ml de agua destilada.

Tanto la auxinas, AIA y ANA, como la citocininas, BA y K , se disolvieron en un volumen de 2 ml de una solución 1 N de NaOH y se diluyeron para finalmente aforarlos en 50 ml de agua destilada.

VI. Bibliografía

- Aellen, P. 1960. *Chenopodium*. 2da ed. 3:533-659.
- Ashley, A. 1972. Differences in early embryo development between *Hibiscus* hybrids. In Y.P.S. Bajaj (ed) Applied and Fundamentals Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Bennici, A. and S. Schiff, 1992. *In vitro* culture of species and varieties of four *Amaranthus* L. species. Euphytica 62:181-186
- Bertero, D. and Diego Medan. 1996. Changes in Apical Morphology during Floral Initiation and Reproductive Development in Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Annals of Botany 78:317-324
- Burnouf-Radosevich, M., Paupardin, C.1985. Vegetative Propagation of *Chenopodium quinoa* by Shoot Tip Culture. American Journal of Botany 72(2):278-283
- Burnouf-Radosevich, M. 1988. Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd): A potential New Crop pp 389-404. In Y.P.S. Bajaj (ed) Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. 6 Crops II. Springer-Verlag Berlin Heidelberg
- Bridgen, M.P.1994. A review of plant embryo culture. HortScience 29: 1243-1245.
- Bronsema, F.and W. van Oostven. 2001. Influence of 2,4-D, TIBA and 3,5-D on the growth response of cultured maize embryos. Plant Cell Tissue and Organ Culture 65: 45-56
- Carrillo, A. 1992. Anatomía de la semilla de *Chenopodium berlandieri* ssp. *nuttalliae* (Chenopodiaceae) Huauzontle. Tesis Maestro en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Botánica. Montecillo, México. 87 p.
- Chávez, V. 2001. Morfogénesis experimental *in vitro* de Plantas Tropicales y Subtropicales (amenazadas y alimenticias)
- Collins, G.B. 1984. Culture of Embryos pp 241-253. In: I. Vasil (ed.) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Vol 1 Academic Press. Orlando, Florida.
- Conger, 1987. Cloning Agricultural Plants via *In Vitro* Techniques. CRC Press, Florida
- Crouch, M., Sussex, I. 1995. Development of *Brassica napus* embryos *in vitro*. Planta 153.

- Dunwell, J. M. 1981. Dormancy and Germination in Embryos of *Hordeum vulgare* L.- Effect of Dissection, Incubation, Temperature and Hormone Application. *Annals of Botany*. 48:203-213
- Durtschi, A. 1999. Quinoa: candidate crop for NASA's Controlled Ecological Progress in New Crops.
- Espíndola, C.G. 1986. Respuestas fisiológicas, morfológicas y agronómicas de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) al déficit hídrico. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo. México 100 p.
- Fernández, M. 1969. Adaptación, rendimiento y valor nutritivo de la quinua cultivada en varias regiones de Guatemala. Tesis de Licenciatura. Universidad de San Carlos. Guatemala
- Fernández V. S. 1996. Selección de mutantes de *Chenopodium quinoa* Willd. en la generación M₂, cuantificación de saponinas en las variedades Isluga y Barandales adaptadas al valle de Toluca. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. 61p
- Fischer-Iglesias, C.2001. Zygotic Embryogenesis. Hormonal Control of Embryo Development pp 223-247. In: S. Bhojwani and W. Soh (ed.) *Current Trends in the Embryology of Angiosperms*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands
- Flores, H. and A. Thier. 1982. In vitro culture of grain and vegetable amaranths (*Amaranthus spp.*). *American Journal of Botany* 69(7):1049-1054
- Freytag, A. H. Anand, S. C. Rao-Arelli, A. P. Owens, L. D. 1988. An improved medium for adventitious shoot formation and callus induction in *Beta vulgaris* L. in vitro. *Plant Cell Reports*. 7: 1, 30-34
- Fridborg, G. and T.Eriksson. 1975. Effects of Activated Charcoal on Growth and Morphogenesis in Cell Cultures. *Physiol.Plant*. 34:306-308
- Fukimura, T. and A. Komamine. 1975 Effects of various growths regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Science Letters* 5:359-364
- Gallardo, M. 1997. Morfología del fruto y semilla de *Chenopodium quinoa* Willd (quinoa). *Chenopodiaceae. Lilloa* 39 (1): 71-80
- Gamborg, O. R.A. Miller, and K. Ojima. 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cultures. *Exp. Cell Res*. 50: 151-158

- Gandarillas, H. 1967. Observaciones sobre la biología reproductiva de la quinua, Rev. Sayaña, 5:6-7, Bolivia.
- Gandarillas, H. 1979. Botánica. En: Quinoa y kañiwa, cultivos andinos. Publ. CIID, Bogotá, Colombia.
- George, E. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. 2nd Edition Exegetics LTD. England
- Gomathinayagam, P. and S. Ganesh ram. 1998. Interspecific hybridization between *Vigna unguiculata* (L.) Walp. and *V. vexillata* (L.) A. Rich. through *in vitro* embryo culture. Euphytica 102: 203-209
- Gómez, O. 1990. caracterización *in vitro* de la tolerancia de *Chenopodium quinoa* Willd. a la salinidad (NaCl). Tesis de Maestría. Colegio de Postgraduados. Centro de Genética. Montecillo Mexico.
- Giusti, K. 1970. El género *Chenopodium* en la Argentina. I. Número de cromosomas. Darwiniana 16: 98-105.
- Goto, T., Miyazaki, M. and M. Oku. 1999. Stimulation of protoplast division of spinach (*Spinacia oleracea* L.) by the addition of citric acid. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science.68: 4, 762-767
- Grout, B. 1986. Embryo culture and cryopreservation for the conservation of genetic resources of species with recalcitrant seed. p 303-309. In: L.A. Withers and P. Alderson (eds.) Plant Tissue Culture and it agricultural applications. London
- Gurel, E. Gurel, S. 1998. Plant regeneration from unfertilized ovaries of sugar beet (*Beta vulgaris* L.) cultured *in vitro*. Turkish Journal of Botany. 22: 4, 233-238
- Heiser, C.H. 1985. Chenopods: From weeds to the halls of Montezuma pp 82-99. In: Of the plants and people. University of Oklahoma press.
- Hernández A. M. y D. R. Rodríguez. 1992. Mejoramiento genético por mutagénesis de la quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) p. 28. Primer Encuentro de Ciencia y Tecnología del Sector Agropecuario y Forestal del Estado de México. Resúmenes
- Hirai, G., and N. Kasai. 1997. Somatic embryogenesis in mature zygotic embryo culture of *Glehnia littoralis*. Plant Cell Tissue and Organ Culture 48:175-180
- Hu, C. and P. Wang, 1986. Embryo Culture: Techniques and Applications pp.43-95. In: D.A. Evans, W.R. Sharp, P.V. Ammirato and Y. Yamada (Eds.) Handbook of Plant

Tissue Culture, Vol. 4, Techniques for Propagation and Breeding. Mc Millan Publishing Co., New York

- Husemann, W. and W. Barz, 1977 Photoautotrophic growth and photosynthesis in cell suspension cultures of *Chenopodium rubrum*. *Physiol Plant*. 40:77-81
- Jacobsen, S. and A. Mujica. 2002. Genetic resources and breeding of the Andean grain crop quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Plant Genetic Resources Newsletter*. No. 130: 54-61
- Johri, B.M., and K.B Ambegaokar. 1992. Comparative Embryology of Angiosperms pp 222-224. In P. S. Sivistava (ed). Vol 1. New York.
- Kenneth, C. 1989. Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Nostran Reinhold Publisher pp 3-26
- Kiwigen, 2001. Características Generales del Amaranto y la Quinoa. Academia de Ciencias de Estados Unidos
- Komai, F., K. Masuda, T. Harada and I. Okuse. 1996. Plant regeneration from adventitious roots of spinach (*Spinacia oleracea* L.) grown from protoplasts. *Plant Science*. 120: 1, 89-94.
- Komai, F., I. Okuse and T. Harada. 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration in culture of root segments of spinach (*Spinacia oleracea* L.). *Plant Science*. 113: 2, 203-208
- Kosturkova, G. and A. Mehandjiev. 1997. Regeneration systems from immature embryos of Bulgarian pea genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 48:139-142
- Kumlehn, J. 1995. Plant regeneration from isolated ovules of Italian ryegrass (*Lolium multiflorum* Lam.): effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and different cytokinins to the ovule culture medium. *Plant Science* 111:107-116
- Lee, C. W., E. P. Glenn and J. W. O'Leary. 1992. In vitro propagation of *Salicornia bigelovii* by shoot-tip cultures. *Hortscience*. 27: 5, 472
- Litz, R., V. Chávez and P. Moon. 1998. Induction of Embryogenic cultures from mature-phase tropical and subtropical trees and control of somatic embryo maturation and germination pp 232-243 In: Recent Advances in Biotechnology for Tree Conservation and Management. Proceeding of an IFS Workshop

- Matsubara, S. 1964. Effect of nitrogen compounds on the growth of isolated young embryos of *Datura*. Bot. Mag. 77:253-259
- Matthys-Rochon, E. and F. Piola, 1998. *In vitro* development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. Journal of Experimental Botany. 49(322):839-845
- Mei, B., E. L. McWilliams and J. H. Gould. 1997. *In vitro* regeneration of fourwing saltbush [*Atriplex canescens* (Pursh) Nutt.]. Journal of Range Management. 50: 4, 413-418
- Moghaddam, B. E. M. Mesbah and N. Yavari. 2000. The effect of in planta TIBA and proline treatment on somatic embryogenesis of sugar beet (*Beta vulgaris* L.). Euphytica. 112: 2, 151-156
- Momotaz, A. and K. Masahiro. 1998. Production of intergeneric hybrids between *Brassica* and *Sinapis* species by means of embryo rescue techniques. Euphytica 103:123-130
- Monnier, M. and J. Lagriffol, 1986. Effect of Ovular Tissue on the Development of *Capsella* Embryos Cultivated *in vitro*. J. Plant Physiology. Vol. 122 pp.17-24
- Monnier, M. 1995. Embryo Culture. In: T. Thorpe, (Ed.) *In Vitro* Embryogenesis in Plants pp. 117-153. Kluwer Academic Publishers. Netherlands
- Mujica, A. 1983. Selección de Variedades de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) en Chapingo, México. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Centro de Genética. Chapingo. México.
- Mujica, A. y A. Canahua. 1989 Fases fenológicas del cultivo de la quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) pp. 23-27. En Curso Taller, Fenología de cultivos andinos y uso de la información agrometeorológica. Salcedo, 7-10 agosto, INAA, EEZA-ILLPA, PICA, PISA. Puno, Perú.
- Mujica, A. 1996. Genetic Resources of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). FAO. Roma, Italia.
- Murashige, T. And F. Skoog. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497

- Ortega, L. 1992. Usos y valor nutritivo de los cultivos Andinos. Instituto Nacional de Investigación Agraria, Programa Nacional de Cultivos Andinos. INIA, PICA. Puno, Perú. pp. 15-96.
- Pantanelli, 1999. El Cultivo Espacial. Revista de Alimentos Argentinos. Dirección de Industria Alimentaria- S.A.G.P. y A. Vol. 18
- Peñafiel, C. 1988. Determinación Espectrofotométrica de Acido Oleanólico y Saponinas de Quinoa. Instituto Nacional de Desarrollo Agroindustrial Lima, Perú. Archivos Latinoamericanos de Nutrición Vol. XXXVIII (marzo. 1988) N° 1
- Pérez, J. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biotecnología de las Plantas. Vol 1 Villa Clara. Cuba
- Pérez, P. R.1988. Efecto de la salinidad y sequía en quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) pp. 49-117. Tesis de Maestría en Ciencias. Colegio de Postgraduados, Montecillo, México.
- Pierik, R. 1990. In Vitro Culture of Higher Plants. 4ª edición .Kluwer Academic Publishers.
- Price, K. 1994. A TLC method for the analysis of quinoa (*Chenopodium quinoa*) saponins. Food Chemistry. 49:311-315
- Raghavan, V. and G. Torrey, 1963. Growth and Morphogenesis of Globular and Older Embryos of *Capsella* in Culture. American Journal of Botany. 50 540-551
- Raghavan, V. 1965. Hormonal control of embryogenesis in *Capsella* pp.43-95. In: Proceedings of an International Conference on Plant Tissue Culture. P.R. White and A. Grove (ed.) pp 414-424 Berkeley California
- Raghavan, V. and P. Srivastava, 1982. Embryo culture pp 328. In: R. Sharma (ed) Embryo rescue in plants- a review. Euphytica 89: 325-337
- Raghavan, V. 1986. Embryogenesis in Angiosperms. Cambridge Univ. Press, Cambridge, U.K.
- Raghavan, V. and K. Sharma. 1995. Zygotic Embryogenesis in Gymnosperms and Angiosperms pp 73-115. In: T. Thorpe (ed) *In Vitro* Embryogenesis in Plants. Kluwer Academic Publishers, Netherlands
- Rea, J. 1969. Biología floral de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Turrialba 19: 91-96. Rodríguez, R. 1978. Determinación del porcentaje de autopolinización y

- cruzamientos naturales en tres variedades comerciales de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.). Tesis de Ing. Agro. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional del Altiplano. Puno, Perú. 86 p.
- Reddy, M. P., U. S. Rao and E. R. R. Iyengar. 1996. In vitro propagation and related biochemical changes in *Atriplex nummularia* Lindl. in saline conditions. Indian Journal of Plant Physiology. 1: 1, 10-13
 - Rietsema, J. 1953. The effect of sucrose on the growth of *Datura stramonium* embryos *in vitro* Amer. J. Bot. 40:538-545
 - Rijven, 1956. Glutamine, asparagine as nitrogen sources for the growth of plant embryos *in vitro*. A comparative study of 12 species p 51. Austral. J. Biol. Sci.
 - Reyes, I. 1990. Efecto morfogénico de la relación auxina citocinina en el cultivo *in vitro* de embriones zigóticos de *Datura stramonium* L. Tesis de Licenciatura. UNAM
 - Robert. M. y V. Loyola, 1985. El cultivo de tejidos vegetales en México. CONACyT, CiCY. México
 - Rochón, E. 1998. In vitro development of maize immature embryos: a tool for embryogenesis analysis. Journal of Experimental Botany. 49 (322): 839-845
 - Rodríguez-Garay, B. 2000. Embriogénesis sexual y somática en plantas. Hort. Mex. 8(1):104-113
 - Rodrigues-Otubo, B. and M. Penteado. 2000. Embryo rescue of interspecific hybrids of *Brachiaria* spp. Plant Cell Tissue and Organ Culture 61:175-182
 - Ross, C. 1980. Embryo culture in the production of disease-resistant brassicas. In D. Ingram (ed) Tissue Culture Methods for Plant Pathologists Blackwell Scientific Publications Oxford.
 - Ruas, M.P., A. Bonifacio, F. C. Ruas and D. J. Fairbanks. 1999. Genetic relationship among 19 accessions of six species of *Chenopodium* L., by Random Amplified Polymorphic DNA fragments. *Euphytica* 105:25-32
 - Scemama, C. 1990. An improved Method for Rescuing Zygotic Embryos of *Pelargonium X hortorum* Bailey. J. Plant Physiology 135:763-765
 - Shi-Rong, J. 1992. Somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryo culture of *Pharbitis nil*. 1992. Plant Science 87:215-223

- Sharma, R. and R. Kaur. 1996. Embryo rescue in plants- a review. *Euphytica* 89: 325-327
- Silva, T. and J. Jones. 1996. *In vitro* production and propagation of *Fragaria vesca* X *Potentilla fruticosa* hybrids. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 46:51-58
- Simmonds (1976) The grain chenopods of tropical American Highlands. *Economic Botany*, 19 (3): 223-235.
- Stewart, J. 1981. *In Vitro* Fertilization and Embryo Rescue. *Environmental and Experimental Botany*. (3):21 301-315
- Stoltz, L.1977. Growth Regulator Effects on Growth and Development of Excised Mature *Iris* Embryos *in Vitro*. *HortScience*. 12(5):495-496
- Sujatha, M. 2001. High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65:23-29
- Tapia, 1979. Quinoa y Kamiria: cultivos andinos, CIID. Bogotá
- Tenning, P., W. Wremerth and M. Lelu. 1992. Somatic embryogenesis from zygotic embryos of sugar beet (*Beta vulagris* L.). *Plant Science* 81:102-109
- Tetú, R. and S. Sangwan. 1990. Direct Somatic Embryogenesis and Organogenesis in Cultured immature Zygotic Embryos of *Pisum sativum* L. *J. Plant Physiology*. Vol.137 102-109
- Thorpe, T. 1978. *Frontiers of Plant Tissue Culture*. Proceedings of the 4th International Congress of Plant Tissue and Cell Culture held at the University of Calgary, Alberta, Canada. Calgary Offset printing services
- Van Overbeek, and J. M.E. Conklin. 1942. Cultivation *in vitro* of Small *Datura* Embryos. *American Journal of Botany*. 29:472-477
- Varotto, S. and M. Lucchin. 1997. Plant regeneration from Italian red chicory (*Cichorium intybus*). *Plant Breed*. 51:17-22
- Varriano-Martson, E. 1984. Ultrastructure of Quinoa Fruit (*Chenopodium quinoa* Willd.) *Food Microstructure*. 3:165-173
- Veen, H. 1963. The effect of various growth regulators on embryos of *Capsella bursa-pastoris* growing *in vitro* pp.43-95. *Acta Bot. Neerl*. 12:129-171
- Villacorta, L. y V. Talavera. 1976. Anatomía del grano de quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Anales científicos*. Vol. XIV: 39-45. Universidad Nacional Agraria. Lima, Perú.

- Werner, T. and V. Motyka. 2003. Cytokinin-Deficient Transgenic *Arabidopsis* Plants Show Multiple Development Alterations Indicating Opposite Functions of Cytokinins in the Regulation of Shoot and Root Meristem Activity. *Plant Cell*. Vol. 15 2532- 2550
- Wilson, D. H. 1980. Artificial hybridization among species of *Chenopodium* sect. *Chenopodium*. *Systematic Botany*. 5(3):253-263
- Zhao, J. and C. Zhou. 1999. *In vitro* development of early proembryos and plant regeneration via microculture in *Oryza sativa*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*
- Ziv, M.1991. Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants pp45-69. In: P. Debergh and R. Zimmerman (eds.) *Micropropagation*. Kluwer Academic Publishers. Netherlands